

DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO

**MICOSES EM IMUNODEPRIMIDOS, ATIVIDADE PROTEÁSICA E ESPECTRO
DE AÇÃO DA ITURINA-A FRENTE AOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

RECIFE-PE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**MICOSES EM IMUNODEPRIMIDOS, ATIVIDADE PROTEÁSICA E ESPECTRO
DE AÇÃO DA ITURINA-A FRENTE AOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientanda: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo

Orientadora: Prof^ª Dr^a Rejane Pereira Neves

Co-orientadora: Prof^ª Dr^a Lusinete A. de Queiroz

LOCAIS DE DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA

Laboratório de Micologia Médica - UFPE

Coleção de Culturas (Micoteca URM) – UFPE

Macêdo, Danielle Patrícia Cerqueira

Micoses em imunodeprimidos, atividade proteásica e espectro de ação da iturina - A frente aos agentes etiológicos / Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo - Recife: O Autor, 2007.

119 folhas : il., fig.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de fungos, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Micoses. 2. Iturina - A . 3. Atividade proteásica I. Título.

**616.992
616.969**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

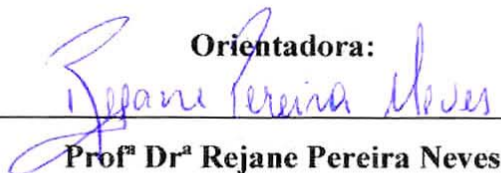
**UFPE
CCB – 2007 – 032**

DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO

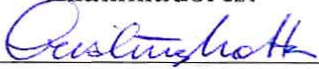
**MICOSES EM IMUNODEPRIMIDOS, ATIVIDADE PROTEÁSICA E ESPECTRO
DE AÇÃO DA ITURINA-A FRENTE AOS AGENTES ETIOLÓGICOS**

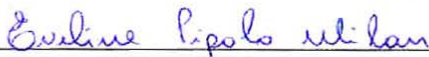
Dissertação defendida e aprovada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Orientadora:


Profª Drª Rejane Pereira Neves

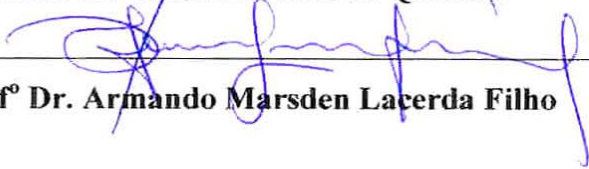
Examinadores:


Profª Drª Cristina Maria de Souza-Motta


Profª Drª Eveline Pípulo Milan

Suplentes:


Profª Drª Lusinete Acile de Queiroz


Profº Dr. Armando Marsden Lacerda Filho

RECIFE

2007

*“Existe um tempo pra cada coisa,
Existe um momento debaixo do céu...
Tempo pra plantar, tempo pra colher
Tempo pra ganhar, tempo pra perder
Tempo pra nascer, tempo pra morrer
Tempo pra chegar, tempo pra partir
Tempo pra apartar, tempo pra unir
Tempo pra chorar, tempo pra sorrir!”*

Eclesiastes

DEDICO

Ao verdadeiro Mestre e Pai, ao amado Filho e ao Espírito Santo de amor.

*Aos meus pais Alfredo e Liliane e ao meu irmão Paulo,
pelo amor e apoio incondicionais.*

OFEREÇO

*Ao meu esposo amado, meu verdadeiro
companheiro Alexandre, minha
imensa gratidão. Amo você!*

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela força nos momentos difíceis de cansaço e pela vibração durante as conquistas.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela real contribuição durante toda minha caminhada acadêmica e à Pós-graduação em Biologia de Fungos por todo apoio científico.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES) pela confiança e apoio financeiro.

À minha querida orientadora e amiga Rejane, pelo exemplo de profissionalismo e perseverança, pelo suporte em todos os sentidos durante esta conquista, que é nossa.

Aos professores Oliane, Cristina, Lusinete, Armando, Maria José e Débora, pelos ensinamentos e contribuições valiosas.

Ao Laboratório de Micologia Médica, pela acolhida e estima, em especial aos amigos Polyanna, Reginaldo, Idalina, André, Patrícia, Alexandre, Fabíola, Flávia, Ana Maria, Suellen, Carol, Rubem, Heloísa, Vanessa, Aline, Ana Beatriz, Bruno entre tantos outros queridos.

A todos os meus queridos professores e amigos de turma do mestrado em Biologia de Fungos que contribuíram diretamente na minha formação acadêmica e profissional.

Ao Departamento de Micologia desta Universidade e à Micoteca URM pela total disponibilidade e contribuições para a conclusão deste trabalho.

Às amigas religiosas da Instrução Cristã pelo apoio e orações durante todos os momentos.

Aos familiares que me acompanharam e ajudaram a perseverar nos momentos de cansaço: meus pais, meu irmão, meu Xande, voinha Nitinha e voinho querido (*in memorian*), voinha Marlene e vovô Alfredo (*in memorian*), meus tios e tias, Jaqueline, Cláudio, Verônica, Carol, Kiko, Samuel, Deco, tia Fatinha, Clóvis e Edgelma Militão, tia Cris e Otília Macêdo.

Aos meus irmãos e amigos de todas as horas Saulo e Juliana Medeiros, Flavinha e Diógenes, Marcos e Gema, Filipe, Eugênia e Laudelino, Luciana, Paulo e Gabriela, Jane, Malena e Eros, Dani e Cecília Dubeux, Débora e família, Catarina e Roberto Dias, entre tantos outros queridos que me fizeram perceber que não estava sozinha na caminhada.

MICOSES EM IMUNODEPRIMIDOS, ATIVIDADE PROTEÁSICA E ESPECTRO DE AÇÃO DA ITURINA-A FRENTE AOS AGENTES ETIOLÓGICOS

RESUMO

Pacientes imunodeprimidos são susceptíveis a infecções fúngicas. A patogênese e consequência das micoses oportunistas dependem dos fatores de virulência das espécies e da habilidade de sobrepor os sistemas de defesa do hospedeiro e danificar os tecidos. Atividade proteásica contribui para esta patogênese. Novos agentes antifúngicos precisam ser testados para o tratamento das micoses mais resistentes, tais como iturina-A, um peptidolípido extraído do *Bacillus subtilis*. O objetivo desta pesquisa foi detectar micoses oportunistas em imunodeprimidos, determinar a atividade proteásica e o perfil antifúngico de iturina-A frente aos agentes etiológicos. Diferentes amostras clínicas foram investigadas incluindo escamas epidérmicas, esputo, fezes, urina, lavado broncoalveolar, sangue e fragmentos de tecidos. Soro de albumina bovina (BSA), caseína e gelatina foram os substratos testados para atividade proteásica. O teste de susceptibilidade foi desenvolvido utilizando-se iturina-A em três concentrações diferentes. Trinta e cinco isolados foram obtidos incluindo as espécies: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon cutaneum*; *Paracoccidioides brasiliensis*, *Fusarium verticillioides*, *F. solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* e *Engyodontium album* (patógeno emergente). Produção de protease foi demonstrada em vinte e sete isolados com melhores resultados evidenciados em BSA, especialmente com as espécies de *Candida*. Os isolados de leveduras foram sensíveis a iturina-A apenas na concentração testada mais alta (7,7mg/mL) e o perfil de susceptibilidade dos fungos filamentosos variaram entre as espécies. *P. brasiliensis* apresentou os melhores resultados, sendo susceptível nas três concentrações testadas.

Palavras-chave: Micoses oportunistas, atividade proteásica, iturina-A.

MYCOSES IN IMUNODEPRESSED PATIENTS, PROTEINASE ACTIVITY AND ITURIN-A ANTIGUNFAL PROFILE AGAINST THE AETHIOLOGICAL AGENTS

ABSTRACT

Immunodepressed patients are susceptible to fungal infections. The pathogenesis and outcome of the opportunistic mycoses are dependent on the virulence factors of the species and the ability to overwhelm the host's defense systems and damage the tissues. Proteinase activity contributes to this pathogenesis. New antifungal agents need to be tested for the treatment of the more-resistant mycoses such as iturin-A, a peptidolipid extracted from *Bacillus subtilis*. The aim of this research was to detect mycoses in immunodepressed patients, determine the proteinase activity and iturin-A antifungal profile against the aethiological agents. Different clinical samples were investigated. Bovine serum albumin (BSA), casein and gelatin were the tested substrates for proteinase activity. Susceptibility test was developed using iturin-A in three different concentrations. Thirty-five isolates were obtained including the species: *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *Trichosporon cutaneum*; *Paracoccidioides brasiliensis*, *Fusarium verticillioides*, *F. solani*, *Aspergillus fumigatus*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* and *Engyodontium album* (emerging pathogen). Proteinase production was demonstrated in 27 isolates with best results evidenced on BSA, especially with *Candida* species. Yeasts isolates were sensitive to iturin-A only at highest tested concentration (7.7mg/mL) and the profile of susceptibility of filamentous fungi varied between the species. *P. brasiliensis* showed the best results, being susceptible at all tested concentrations.

Key words: Opportunistic mycoses, proteinase activity, iturin-A.

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO GERAL	09
1.1 MICOSES OPORTUNISTAS	09
1.1.1 ASPERGILOSE	10
1.1.2 FUSARIOSE	14
1.1.3 LEVEDUROSE	17
1.1.4 MICOSE EMERGENTE – FUNGO EMERGENTE	20
1.1.5 MICOSES EM CARÁTER OPORTUNISTA	23
1.1.5.1 DERMATOFITOSE	23
1.1.5.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE	25
1.2 CARACTERÍSTICAS DE PATOGENICIDADE	28
1.3 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	31
1.3.1 ITURINA-A	32
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
3 UM CASO INCOMUM DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL	51
4 FUNGEMIA POR <i>ENGYODONTIUM ALBUM</i> : PRIMEIRO CASO REPORTADO	61
5 RINOSINUSITE INVASIVA POR <i>FUSARIUM MONILIFORME</i> (SHELDON): DIAGNÓSTICO E CONDUTA	70
6 ASPERGILOSE EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS: QUATRO RELATOS CLÍNICOS SOBRE ESTA PATOLOGIA OPORTUNISTA NO BRASIL	80
7 ONICOMICOSE OPORTUNISTA POR <i>TRICHOPHYTON RUBRUM</i> , ATIVIDADE PROTEÁSICA E SUSCEPTIBILIDADE A ITURINA-A	92
8 INIBIÇÃO DE FUNGOS OPORTUNISTAS PELA ITURINA-A: UM PEPTIDOLIPÍDEO PRODUZIDO PELO <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	103
9 CONCLUSÕES GERAIS	113
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO GERAL

Micoses são doenças produzidas por fungos, organismos eucariontes, aclorofilados, sapróbios, simbiontes ou parasitas, que podem no homem causar infecções superficiais, subcutâneas, sistêmicas ou oportunistas (LACAZ et al., 2002; NUCCI; MARR, 2005).

Os fungos sapróbios, em condições favoráveis frente a um hospedeiro imunodeprimido, podem tornam-se patógenos, causando quadros clínicos variáveis, desde processos febris benignos a septicemias, algumas vezes fatais, se não forem diagnosticados e tratados adequadamente (ZAITZ et al., 1998; LACAZ et al., 2002; MACIAS et al., 2004).

Dentre os fatores que contribuem para a patogenicidade, destaca-se a capacidade de produzir enzimas e micotoxinas. Entretanto, a inibição destes metabólitos pode ser induzida através do uso de algumas substâncias como anti-retrovirais e iturina-A, respectivamente (KLICH et al., 1991; MAYSER et al., 1996; SIMPANYA et al., 1996; SINGH, 1997; BORG-VON ZEPELIN et al., 1999; LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

1.1 MICOSES OPORTUNISTAS

A diversidade de manifestações clínicas decorre da patogenicidade do fungo e da resposta imunológica do hospedeiro apresentando gravidade variável, podendo manifestar-se como processo alérgico ou até infecção disseminada tornando fundamental o diagnóstico clínico e micológico na rotina médica dos pacientes, principalmente imunodeprimidos, uma vez que estes indivíduos apresentam diversas patologias severas favorecendo a infecção oportunista (ZAITZ et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2002).

As micoses oportunistas são detectadas em pacientes mais suscetíveis, portadores de disfunção imunológica cujos quadros clínicos severos são importantes causas de morbidade e mortalidade. As causas das imunodepressões determinam desde estados transitórios a permanentes, que comprometem o sistema imunológico (GAUR; FLYNN, 2001; LACAZ et al., 2002; PIERROTTI; BADDOUR, 2002).

A grande incidência das infecções fúngicas oportunistas decorre de fatores intrínsecos ao hospedeiro como pneumopatias, cardiopatias, neoplasias, insuficiência renal crônica, transplantes, hemopatias e a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS), e extrínsecos como uso de procedimentos invasivos, medicamentos imunossupressores assim como internamento prolongado em unidades de terapia intensiva, onde a microbiota nosocomial é rica em fungos (KWON CHUNG; BENNETT, 1992; SABALLS et al., 2000; SCULLY; MONTEIL; SPOSTO, 2000; GAUR; FLYNN, 2001; WEIG; REICHARD; GROB, 2001; PIERROTTI; BADDOUR, 2002; LUMBRERAS; GAVALDÀ, 2003).

As micose oportunistas podem ser causadas por diversos fungos, destacando-se espécies de *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Cryptococcus*, alguns como as leveduras fazem parte da microbiota normal do indivíduo (LATGÉ, 1999; RANDHAWA, 2000; AYMAN et al., 2002; LACOMBE; GIRARD, 2004; ORTIN et al., 2004).

Nos últimos anos estas micose têm se destacado pela diversidade de fungos isolados e pela gravidade, com vários casos documentados. Estes fungos emergiram como patógenos relevantes durante as últimas décadas ao se tornar mais freqüente o diagnóstico de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos (SEELIGER, 1983; BODEY; ANAISSIE, 1989; ASCIOGLU et al., 1999; GAUR; FLYNN, 2001; LACAZ et al., 2002; LUMBRERAS; GAVALDÀ, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004).

O aumento na incidência de infecção fúngica oportunista foi primeiramente avaliado por Stefanini; Allegra (1957), no período entre 1943 e 1947, indicando que 3% dos pacientes com neoplasia (leucemia aguda) desenvolveram micose oportunistas. Todavia, entre 1954 e 1956, estes mesmos autores detectaram um aumento bastante significativo para 22% neste grupo. Bodey (1966), entre 1954 e 1964, após análise de autópsias em pacientes com mesma doença de base reafirmou o aumento no número das micose oportunistas de 10% para 30%.

Bodey; Anaissie (1989) mencionam a quimioterapia intensiva contra câncer, transplantes de órgãos, antibióticos de largo espectro e alimentação parenteral como os fatores que mais contribuem para o aumento na incidência das micose oportunistas.

De acordo com diagnósticos realizados na Índia por Jindal et al. (2000), a apresentação de micose do trato respiratório em pacientes imunodeprimidos muitas vezes se assemelha a infecções oportunistas de outra etiologia, podendo ser causadas por espécies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Sporothrix* e *Aspergillus*.

1.3.1 ASPERGIOSE

Em 1989 Bodey e Vartivarian, consideravam aspergilose quase que exclusiva de pacientes com leucemias, contudo mudanças relacionadas à incidência desta micose em portadores de outras doenças têm sido constatadas. Richardson; Johnson (2000); Oliveira et al. (2002) descrevem aspergilose como uma condição infecciosa, não contagiosa, de etiologia fúngica, determinada por espécies do gênero *Aspergillus*.

Pesquisas recentes indicam a forma pulmonar como a mais freqüente; contudo, formas extrapulmonares podem ocorrer e geralmente são graves, com acometimento cerebral, ocular, cutâneo, ósseo e cardiovascular. Não havendo predileção por zonas climáticas, sexo, idade e

etnia, sendo uma doença de ocorrência universal (RICHARDSON; JOHNSON, 2000; OLIVEIRA et al., 2002).

Após pesquisas desenvolvidas por Mylonakis et al. (1998), foram constatados numerosos casos de aspergilose em adultos infectados pelo vírus HIV; todavia, os autores consideram este tipo de micose menos freqüente em crianças infectadas por este vírus. Patterson et al. (2002) verificaram que a maioria dos casos de aspergilose ocorreu em pacientes com malignidades hematológicas e nos transplantados de medula óssea.

Albelda; Talbot (1988); Chung-ming Chu et al. (2004) indicam aspergiloma como uma forma de aspergilose não-invasiva que pode se desenvolver em hospedeiro saudável, no qual o microrganismo coloniza uma cavidade pré-existente formada por processo destrutivo que envolveu previamente o pulmão, tal como a tuberculose pulmonar.

Vários autores definem aspergiloma ou bola fúngica como uma massa fúngica, constituída de células inflamatórias, fibrina, muco e tecido necrosado, que se desenvolve numa cavidade pulmonar pré-existente, cujas características clínicas são hemoptise recorrente variando de pequenos episódios de escarros hemópticos à hemorragia fatal, particularmente em pacientes com tuberculose cavitária (HORI et al, 2002).

Geftter et al. (1981) concluíram que aspergiloma pode ser visto em aproximadamente metade dos casos clínicos de aspergilose pulmonar e o espessamento pleural adjacente é uma característica encontrada podendo ser uma indicação precoce de processo invasivo localizado.

Para Binder et al. (1982) a minoria dos pacientes pode apresentar aspergilose assintomática com radiografias de tórax exibindo infiltrações nas zonas superiores dos lobos ou nos segmentos superiores dos lobos mais baixos.

De acordo com Chen (1997) e Khan et al. (2000), a maioria dos casos de aspergiloma compromete apenas um dos lobos do pulmão, porém o envolvimento bilateral pode ser percebido em 5 a 10% dos pacientes.

Miller (1996) sugere o questionamento quanto à forma não-invasiva de aspergilose, podendo em alguns casos tratar-se da forma invasiva inicial. Quando na ausência de cavidades pré-existentes, o microrganismo pode criar sua própria cavidade e se desenvolver como um organismo relativamente não-invasivo.

Para Geftter et al. (1981) aspergilose semi-invasiva tende a ocorrer em pacientes cujo sistema imunológico está seriamente deprimido, como na doença pulmonar obstrutiva crônica ou diabetes.

A cultura do escarro segundo Lopes et al. (2004) apresenta uma positividade de 8-34%, devendo-se considerar que nem sempre o isolamento de espécies de *Aspergillus* significa ocorrência de doença, uma vez que pode ocorrer contaminação das amostras ou colonização, sendo comum em pacientes que utilizam antibioticoterapia. Os resultados das culturas devem ser correlacionados à presença de fatores de risco como granulocitopenia, transplante de órgãos, doenças neoplásicas, imunoterapia e corticoterapia.

Estudos com corticoterapia têm demonstrado uma resposta adversa do hospedeiro, estimulando a patogênese da aspergilose pulmonar invasiva. O uso criterioso de drogas profiláticas ajudaria a diminuir as complicações durante o tratamento e reduzir os riscos de adquirir uma micose oportunista. Para melhorar o prognóstico da aspergilose invasiva, torna-se importante reconhecer as características clínicas da aspergilose extrapulmonar e instituir tratamento anti-fúngico agressivo (HORI et al, 2002; LACOMBE; GIRARD, 2004; BALLOY et al., 2005; STEPHENS-ROMERO; MEDNICK; FELDMESSER, 2005).

As terapias imunossupressoras são fatores extrínsecos determinantes para o aumento do número de micoses oportunistas, principalmente por espécies de *Aspergillus*, as quais são cada vez mais invasivas e fatais (LUMBRERAS; GAVALDÀ, 2003; BALLOY et al., 2005; STEPHENS-ROMERO; MEDNICK; FELDMESSER, 2005).

Baseado nos estudos de necropsias de Bodey; Vartivarian (1989), a maior parte dos pacientes que vão a óbito com aspergilose invasiva apresenta a forma disseminada da doença. Segundo Lumbrelas; Gavalda (2003) laringite, endoftalmite, meningite, osteomielite e endocardite são formas clínicas que podem ser evidenciadas neste tipo de infecção por *Aspergillus*.

Endocardite fúngica caracteriza-se por uma infecção que envolve o endocárdio e outras estruturas cardíacas. É uma forma rara de aspergilose disseminada, sendo mais freqüentemente observada como complicação de cirurgia cardíaca, especialmente associada a válvulas protéticas suspeitando-se, nestes casos, de infecção adquirida durante ato cirúrgico. Todavia, o foco primário da infecção é pulmonar (BARST; PRINCE; NEU, 1981; WALSH; BURKLEY, 1982; BAYER; SCHOLD, 2000; GARCÍA; GARCÍA-FERNÁNDEZ; CEBADA, 2005).

Segundo Casson; Riordan; Ladusens (1996) e Pierrotti; Baddour (2002) anormalidades anatômicas do coração, válvulas protéticas, catéter venoso central, antibioticoterapia e corticoidoterapia prolongadas, quimioterapia assim como estados de imunossupressão transitória e permanente, são analisados como fatores predisponentes a micoses oportunistas que envolvem o coração e estruturas relacionadas ao sistema circulatório.

Casson; Riordan; Ladusens (1996) apresentaram o primeiro caso de endocardite por *A. nidulans* em uma criança de três anos do sexo feminino com doença granulomatosa crônica associada a um defeito congênito de septo atrial. Como indícios de fungemia foram diagnosticadas lesões de pele na paciente. Durante procedimento cirúrgico, foi observada a presença de uma massa fúngica na parede lateral do átrio direito e isolado o agente etiológico.

Pierrotti; Baddour (2002) afirmam que a endocardite de etiologia fúngica representa mais de 50% dos casos de óbito. A cirurgia pode ser definida segundo Rueter et al. (2002) como tratamento de escolha para endocardite por espécies de *Aspergillus*.

Verghese et al. (2004) reportaram dois casos fatais de endocardite fúngica adquirida após cirurgia cardiovascular, com o desenvolvimento de embolismo da artéria femoral como apresentação clínica inicial. *A. terreus* e *A. flavus* foram isolados a partir das culturas dos êmbolos e dos tecidos biopsiados das válvulas cardíacas.

García; García-Fernández; Cebada (2005) descreveram um caso de endocardite num paciente de 34 anos do sexo masculino com AIDS, usuário de drogas intravenosas. Após tratamento cirúrgico para pseudoaneurisma com cultura negativa para fungos, o paciente iniciou processo febril intenso de causa desconhecida, com progressão fatal. Através da autópsia, efusão do pericárdio, pele e linfonodos foram positivos para *A. fumigatus*.

Revisão realizada por García; García-Fernández; Cebada (2005) sobre os agentes de endocardite fúngica, revelou que são isoladas mais freqüentemente espécies de *Candida*; *A. fumigatus* foi o principal fungo filamentoso diagnosticado em 15 dos 152 casos analisados.

Embora cerca de 200 espécies diferentes de *Aspergillus* sejam conhecidas, são considerados patógenos humanos *A. flavus*, *A. niger* e *A. fumigatus*, destacando-se esta última. Frequentemente estas espécies estão envolvidas em síndromes do pulmão, desde aspergiloma em pacientes com cavidades pulmonares a aspergilose crônica necrosante em indivíduos seriamente imunocomprometidos. A infecção é adquirida primariamente através do trato respiratório podendo disseminar-se para outros órgãos (BODEY; VARTIVARIAN, 1989; MILLER, 1996; AYMAN et al., 2002).

A. fumigatus é considerado um fungo sapróbio que apresenta um importante papel na reciclagem ambiental de carbono e nitrogênio. Seu nicho ecológico natural é o solo, especialmente rico em materiais orgânicos em decomposição. Esta espécie produz conídios abundantemente, com dimensões de 2 a 3µm capazes de alcançar os alvéolos pulmonares (MILLER, 1996; LATGÉ, 1999; AYMAN et al., 2002).

Chung-Ming Chu et al. (2004) afirmam que a inalação dos conídios por indivíduos imunocompetentes raramente apresenta algum efeito adverso, devido à eliminação

relativamente eficiente através dos mecanismos do sistema imune. *A. fumigatus* tem sido considerado um patógeno responsável pela maioria das formas severas e fatais de aspergilose.

Denning (1998); Latgé (1999) verificaram o envolvimento de *A. fumigatus* em aspergilose invasiva causando um elevado número de mortes em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, portadores do vírus da imunodeficiência humana, leucemias, transplantados. Estes autores chamam a atenção do mau prognóstico da aspergilose.

De acordo com Bouza; Moya; Munoz (2001) e Greenberg (2002), em pacientes com lupus eritematoso sistêmico, peritonites fúngicas são freqüentes, especialmente por *A. fumigatus*.

Hori et al. (2002) destacam *A. fumigatus* como o agente etiológico mais comum nos casos de formação de aspergiloma pulmonar e Balloy et al. (2005); Stephens-Romero; Mednick; Feldmesser (2005) afirmam que esta é a espécie que mais ameaça a vida de pacientes imunocomprometidos através de diferentes formas de infecções oportunistas.

1.3.2 FUSARIOSE

Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* são considerados oportunistas, agentes de infecções superficiais em hospedeiros imunocompetentes e infecções disseminadas graves em imunodeprimidos (FLEMING; WALSH; ANAISSIE, 2002; GARBINO et al., 2005).

A ampla distribuição das espécies pode ser atribuída à habilidade destes fungos de crescer em vários substratos e à presença de vários mecanismos de dispersão (BURGESS, 1981).

Estes organismos são sapróbios do solo e patógenos comuns de plantas os quais, dependendo dos fatores predisponentes, podem causar diversas manifestações clínicas com quadros clínicos variados (MERZ et al., 1988; GUARRO; GENÉ, 1995; DIGNANI; ANAISSIE, 2004; JENSEN et al., 2004).

Fusariose invasiva disseminada foi reportada pela primeira vez em 1973 por Cho et al. Desde então, vários outros casos têm sido relatados em pacientes imunocomprometidos com aumento recente significativo (MUTTON; LUCAS; HARKNESS, 1980; ANAISSIE et al., 1986; NADLER, 1990; ANAISSIE et al., 1992).

Em hospedeiros imunocompetentes as lesões são tipicamente localizadas e precedidas por quebra de barreira cutânea como celulite no local de uma onicomiose, ferida cirúrgica, queimaduras, úlceras profundas ou celulite facial e periorbital em pacientes com sinusite por *Fusarium*. Em contraste, acometem pacientes imunocomprometidos, particularmente aqueles com profunda neutropenia, numa forma de infecção disseminada e grave. Dentre os sintomas

destacam-se os quadros de febre persistente (MERZ et al., 1988; GUARRO; GENÉ, 1995; BOUTATI; ANAÏSSIE, 1997; NUCCI; ANAÏSSIE, 2002; JENSEN et al., 2004).

Os sintomas nos casos de fusariose são febre persistente, apesar dos tratamentos antibacterianos e antifúngicos, e lesões de pele em 60 a 80% dos casos. As lesões acometem comumente as extremidades e aparecem difusas, endurecidas, violáceas ou eritematosas, algumas vezes progredindo à necrose (MERZ et al., 1988; GUARRO; GENÉ, 1995; HANSSON; ROSEN; BRAIDE, 1995; BOUTATI; ANAÏSSIE, 1997).

As lesões de pele causadas por espécies de *Fusarium* apresentam-se dolorosas, na forma de nódulos subcutâneos eritematosos e endurecidos, podendo ter aspecto necrótico. Fraqueza e mialgia podem estar presentes pela ação das toxinas produzidas pelo fungo (GAMIS et al., 1991; BOUTALI; ANAÏSSIE, 1997; GAUR; FLYNN, 2001).

Desde os anos 80, houve um aumento na participação de espécies de *Fusarium* como causa de infecções invasivas e disseminadas. Em pacientes imunocomprometidos, tais como aqueles com malignidades hematológicas, transplantes de medula óssea e anemia aplásica a taxa de mortalidade apresenta-se bastante elevada (GAMIS et al., 1991; ROBODONIRINA et al., 1994; BOUTALI; ANAÏSSIE, 1997; GIRMENIA et al., 1999). *F. solani* é considerada a espécie mais isolada em casos clínicos, seguido pelo *F. moniliforme*, *F. oxysporum* e *F. proliferatum* (MARTINO et al., 1994; BUSHELMAN et al., 1995; BOUTATI; ANAÏSSIE, 1997).

Espécies de *Fusarium* inicialmente foram reconhecidas como patógenos humanos potenciais baseado na capacidade de produção de toxinas e, posteriormente, como agentes de infecção invasiva localizada causando ceratites, endoftalmites, sinusites, paroníquia e infecções de pele (GAMIS et al., 1991; ANAÏSSIE et al. 1992).

A patogênese das infecções disseminadas por espécies de *Fusarium* é um processo ainda pouco conhecido; todavia, alguns autores consideram que a via de infecção mais comum é a pele, após trauma ou doença periungueal e através das vias respiratórias. Infecções relacionadas ao uso de cateteres e problemas do trato gastrointestinal também têm sido propostas (GAMIS et al., 1991; ROBODONIRINA et al., 1994; BOUTALI; ANAÏSSIE, 1997).

A porta de entrada nem sempre é determinada, mas na maioria das vezes a fonte de infecção é a via respiratória, particularmente seios da face, ou cutânea, tendo sido também reportada colonização do trato gastrointestinal e através de cateter venoso central (MARTINO et al., 1994; BOUTATI; ANAÏSSIE, 1997; DIGNANI; ANAÏSSIE, 2004; JENSEN et al., 2004).

Segundo Martino et al. (1994), infecções em seres humanos geralmente ocorrem após a inoculação destes organismos através da superfície corpórea, causando infecção cutânea, onicomicose, ceratite, endoftalmite e artrite. Pacientes com imunodeficiência permanente ou transitória são mais susceptíveis às formas disseminadas de fusariose.

Apesar da suscetibilidade do hospedeiro ser considerado fator determinante no estabelecimento de infecção, espécies de *Fusarium* possuem vários atributos celulares e moleculares que conferem diferentes graus de virulência a estes organismos. Toxinas, produção de enzimas e aderência a materiais prostéticos têm sido postuladas como fatores de virulência. A combinação destes fatores e o estado de imunossupressão do hospedeiro contribuem para o desenvolvimento das infecções invasivas por espécies de *Fusarium* (NELSON; DIGNANI; ANAÏSSIE, 1994).

Bushelman et al. (1995), Kremery et al. (1997) e Paugam et al. (1999) descreveram casos de infecções disseminadas por *F. solani* em pacientes neutropênicos com malignidades hematológicas, câncer e AIDS, respectivamente. Infecção disseminada por *Fusarium*, segundo os autores, é considerada uma condição grave, em especial nos pacientes com doenças graves.

Child et al. (1996) relataram um caso de infecção disseminada por *F. solani* após transplante de medula óssea em um homem de 38 anos com leucemia mielóide crônica. Foram constatados múltiplos nódulos subcutâneos e lesões nos pulmões, as quais deterioraram o paciente levando-o a óbito após três meses.

Por um período de dez anos Boutali; Anaissie (1997) avaliaram 43 pacientes com doença hematológica maligna e infecção invasiva ou disseminada por *Fusarium* sp. internados em centro de câncer no Texas. Destes casos, 72 a 91% apresentaram envolvimento cutâneo confirmado através de cultura, 70 a 84% tiveram envolvimento pulmonar suspeito ou comprovado, e 71 a 79% exibiram envolvimento sinusal através de radiografia dos seios da face.

Estudos retrospectivos confirmam que infecções por *Fusarium* afetam severamente pacientes imunocomprometidos, principalmente com malignidades hematológicas (HENNEQUIN et al., 1997).

Sampathkumar; Paya (2001) descreveram um caso de infecção cutânea com lesões eritematosas por *Fusarium* sp. em receptor de transplante de coração e fígado. Após tratamento com anfotericina B intravenosa e local ocorreu remissão das lesões e dos sintomas da infecção. Após transplante de órgão sólido as infecções por *Fusarium* tendem a ser localizadas e o prognóstico mais favorável que nos casos de neutropenia.

Mansoori et al. (2003) publicaram o primeiro caso de infecção crônica por *Fusarium* sp. em paciente adulto com doença granulomatosa crônica não diagnosticada, uma imunodeficiência primária de células fagocíticas.

Jensen et al. (2004) relataram quatro casos de fungemia em pacientes com leucemia. Todos os pacientes exibiram quadro febril persistente e neutropenia. No primeiro foi isolado *Fusarium* sp., não tendo sido realizada a identificação da espécie envolvida. Nos demais casos, *F. moniliforme* e *F. solani* foram os agentes envolvidos.

Petit et al. (2005) descreveram dois casos de infecção disseminada por *Fusarium* em crianças de 10 anos, neutropênicas, após transplante de medula óssea, durante tratamento para leucemia linfoblástica aguda e leucemia mielóide aguda, respectivamente. O paciente com LLA veio a óbito após tratamento com anfotericina B, não suportando a toxicidade da droga antifúngica.

O aumento na contagem dos neutrófilos e a melhora nas funções da medula óssea são indicadores de um prognóstico favorável nos casos de infecções por *Fusarium* (GAMIS et al., 1991; RABODONIRINA et al., 1994; BOUTALI; ANAÏSSIE, 1997; GIRMENIA et al., 1999).

Debridamento cirúrgico e excisão de lesões localizadas ajudam a limitar a infecção e evitar disseminação para outras partes do corpo, uma vez que essas infecções normalmente são refratárias aos antifúngicos padrão (CONFRANCESCO et al., 1992; BOUTATI; ANAÏSSIE, 1997).

1.3.3 LEVEDUROSE

Infecções oportunistas por leveduras são cada vez mais diagnosticadas em pacientes imunodeprimidos, especialmente aqueles que apresentam doenças de base graves como a AIDS, na qual a levedurose oral pode ser a manifestação primária da síndrome (PORTER et al., 1999).

Nas infecções graves as leveduras assumem papel de destaque, principalmente como importantes patógenos nosocomiais. Em diversos quadros de candidíase são isoladas comumente *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* entre outras (GUPTA et al., 2001; KOVACICOVA et al., 2001; DORKO; PILIPCINEC; TKACIKOVA, 2002; CHAPMAN, 2003; HAWKINS; BADDOUR, 2003; ROILIDES et al., 2004).

Candidíase é uma micose oportunista freqüente em imunodeprimidos, podendo ocorrer em imunocompetentes, com desenvolvimento de quadros clínicos localizados a disseminados graves (SCULLY; EL-KABIR; SAMARANAYAKE, 1994).

Infecções disseminadas foram diagnosticadas por Horan et al. (1984), ao conduzir um estudo de dez anos sobre infecções nosocomiais em um centro para controle de doenças, constatando-se um alto índice de candidemia no grupo de pacientes avaliados.

Diversos processos infecciosos por *C. tropicalis* são relatados em casos de pielonefrite, infecção de trato urinário baixo, tromboflebite, artrite, bursite, meningite, infecção em múltiplos órgãos, pericardite e vulvovaginite (FRADIN; HUBE, 2003; NAGLIK et al., 2004; BRAMONO et al., 2006).

C. tropicalis tem emergido como um fungo oportunista potencialmente perigoso. Esta espécie foi citada como fungo oportunista isolado freqüentemente de espécimes clínicos de pacientes internados em unidade de terapia intensiva (MORGANTI et al., 1982).

De acordo com os experimentos realizados por Fromtling; Abruzzo; Giltinan (1987), *C. tropicalis* foi capaz de lesar rins de camundongos com diabetes e neutropenia induzidos, causando lesões semelhantes àquelas por *C. albicans*. Uma grande quantidade de células de leveduras foi isolada através de cultura dos tecidos lesados, sugerindo os rins como órgãos-alvo em infecções sistêmicas experimentais por esta espécie de levedura.

Odds (1992) verificou infecções bronco-pulmonares, assim como infecções orofaríngeas, esofágicas, fungemia e infecções disseminadas por diversas espécies de *Candida*. Todos os pacientes eram portadores da AIDS e internos do setor de controle de doenças. Foram realizados 101 exames *post mortem* em indivíduos com esta mesma síndrome, e diagnosticada candidíase em 11 deles. *C. albicans* foi considerado o agente mais freqüente.

Maesaki et al. (1993) investigaram a incidência de leveduras em amostras clínicas do trato respiratório de 159 pacientes. Secreção obtida da faringe, esputo, lavado brônquico e biópsia de pulmão foram as amostras clínicas avaliadas. As espécies identificadas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis*. A taxa de isolamento de leveduras foi mais elevada nos pacientes mais graves. Dorko; Pilipcinec; Tkacikova (2002) obtiveram achados semelhantes diagnosticando candidíase por *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, prevalecendo, *C. albicans*.

Vazquez et al. (1995) descreveram um caso de infecção disseminada por *C. guilliermondii* associado à pericardite em mulher de 19 anos com anemia aplásica submetida a

transplante de medula óssea. De acordo com os autores, este caso foi significativo devido ao alto grau de fungemia de duração prolongada, apesar do tratamento com anfotericina B. A baixa resposta terapêutica ocorreu como consequência do alto poder invasivo do isolado, da neutropenia do paciente e à concentração inibitória mínima elevada para anfotericina B.

Tsang et al. (1995) mencionam que *C. albicans*, embora presente na cavidade oral e em outros sítios corpóreos como comensal, está envolvida na maioria dos casos de candidíase devido à presença de inúmeros fatores predisponentes, em especial a imunodepressão.

Totti et al. (1996) consideram que dentre as diversas espécies de *Candida*, *C. albicans* é a mais patogênica, e fatores importantes como capacidade de aderência, colonização, produção de enzimas e interações com as defesas do hospedeiro facilitam o processo infeccioso.

A incidência de micoses oportunistas do trato respiratório foi investigada por Shadzi; Chadeganipour (1996) a partir de exame micológico realizado com 247 amostras de lavado bronco-alveolar de pacientes imunodeprimidos. As leveduras oportunistas isoladas foram *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. beigelii* (*T. cutaneum*). Os fatores predisponentes mais comuns presentes nos pacientes avaliados pelos autores foram câncer, tuberculose e pneumonia, bem como corticoidoterapia e antibioticoterapia prolongadas.

Segundo Ibanez; Serrano-Heranz (1999), espécies de *Candida* podem ser consideradas patógenos intravasculares (corrente sangüínea, endocardite) e extravasculares (artrites, osteomielites, endoftalmite). Todavia, *C. parapsilosis* raramente é agente de infecções intra-abdominais. Os autores relatam um caso de pancreatite aguda fatal por esta espécie em homem de 48 anos.

Almeid; Scully (2002) ressaltam as características clínicas das leveduroses e indicam as lesões orais como as mais variáveis, classificando-as em agudas ou crônicas. Dentre estes quadros clínicos a quelite angular é usualmente um processo crônico, e diabetes mellitus é considerado um fator sistêmico relevante.

Kurnatowska et al. (2003) estimaram a prevalência de infecções por leveduras em receptores de transplante de medula óssea. Infecções multifocais ocorreram em 32 receptores de transplante renal, sendo mais frequentes na cavidade oral, reto e órgãos genitais. Das 41 amostras isoladas, 31 foram de *C. albicans*, cinco de *C. glabrata*, dois de *C. guilliermondii*, dois de *C. kruzei* e um de *Saccharomyces cerevisiae*.

Dorko et al. (2005) examinaram pacientes com diabetes mellitus, infecções do trato urinário, úlceras na pele e otomicoses, diagnosticando através de urina, secreção oral, ocular e de ouvido, escamas ungueais e epidérmicas infecções por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C.*

kruzei e *C. guilliermondii*. *C. albicans* foi a mais freqüentemente associada com onicomicoses, paroníquia e endoftalmítes; *C. parapsilosis*, a segunda espécie mais isolada.

Shetty et al. (2005) determinaram na cidade de Baltimore, no período entre 1998 e 2000, os fatores de risco para candidemia em recém-nascidos, sendo diagnosticados de 35 casos, 19 com infecção por *C. albicans*, nove por *C. parapsilosis* e cinco por *C. glabrata*.

Kannan; Janaki; Selvi (2006) avaliaram 165 pacientes dos quais, 29 (17,1%) apresentavam imunodepressão grave e desenvolveram micoses por diversas espécies de *Candida*.

Legout et al. (2006) reportaram um caso de osteomielite fúngica por um isolado de *C. parapsilosis* resistente a fluconazol, discutindo novos parâmetros de tratamento nas infecções por esta espécie.

Infecções da mucosa oral, especialmente candidíase, são características em pacientes HIV positivos, sugerindo que a mucosa da cavidade oral imunologicamente comprometida é uma consequência da infecção viral (CHALLACOMBE; NAGLIK, 2006).

De acordo com Coogan et al. (2006), candidíase oral é a manifestação mucosa mais freqüente nos pacientes HIV positivos. Estas podem ser recorrentes, resistentes aos tratamentos e multifocais. Os autores afirmam a importância da identificação das leveduras envolvidas nos processos infecciosos para a escolha da terapia antifúngica ideal.

1.3.4 MICOSE EMERGENTE – FUNGO EMERGENTE

Micose emergente denota uma infecção rara causada por um fungo que esporadicamente atua como agente etiológico (MORSE, 1995). Para Nucci; Marr (2005), a ocorrência desta micose está relacionada às alterações imunológicas do hospedeiro que levam à severa imunossupressão com consequente mudança no padrão epidemiológico.

Engyodontium album é um fungo filamentoso que emergiu desde 1972 como agente etiológico de micose em humanos; contudo, atualmente registros esporádicos confirmam este agente como emergente (AUGUSTINSK et al., 1990).

O status taxonômico desta espécie tem passado por várias mudanças. *E. album*, primeiramente classificado como *Beauveria alba* (VUILLEMIM, 1912) foi considerado *Tritirachium album* por Limber (1940). Em 1972, foi nomeado *Engyodontium* e, posteriormente, incluídas duas espécies *E. album* e *E. parvisporum* (DE HOOG, 1972; DE HOOG, 1978).

Cultivado em 1971 de solo de floresta da Ilha de Yaku, no Japão, foi descrito como *T. rectidentatum* (Matsushima) como uma nova espécie que, posteriormente foi classificada como *E. album* (DE HOOG; GUARRO, 1995).

As diferenças morfológicas marcantes entre os gêneros *Engyodontium* e *Beauveria* foram descritas por Gams; De Hoog; Samson (1984) reforçadas por De Hoog et al. (2000), os quais confirmaram a distância taxonômica entre estes gêneros através da biologia molecular.

De acordo com Augustinsk et al. (1990), pode ser isolado *E. album* de água, papel, tecidos e paredes. Sua dispersão pode ser facilitada pela natureza higrofóbica de seus conídios, tendo sido isolado do ar de casas e hospitais.

Infecções humanas com achados para *E. album* são raras, contudo De Hoog (1972) descreveu um caso de infecção por esta espécie em paciente com eczema vesiculoso.

Huhn (1977) reportou um caso de uma paciente com lesões granulomatosas na pele que desenvolveu abscesso cerebral fatal. Os patologistas observaram no tecido necrótico hifas segmentadas e elementos semelhantes a esporos, sendo isolado em cultura um Hyphomycete hialino, considerado por muitos micologistas da época como isolado atípico de *Trichophyton rubrum* ou *T. verrucosum*, embora se tratasse de *E. album*. Parâmetros clínicos semelhantes foram avaliados por Seeliger (1983), o qual constatou lesão cerebral diagnosticando caso de cerebrite por esta mesma espécie.

Lesões de córnea apresentando aspecto de névoa difusa sobrepondo a íris com formação de vasos sanguíneos na camada superficial da córnea foram investigadas por McDonnell et al. (1984) quanto à etiologia de natureza fúngica. Os autores concluíram que se tratava de ceratite causada por *E. album*.

Augustinsk et al. (1990) publicaram um caso de endocardite em válvula cardíaca por *E. album* em paciente de 59 anos com história pregressa de cirurgia para ponte de safena. Clinicamente, o paciente exibia sinais de regurgitação aórtica severa e recorrente falha congestiva do coração. Após cultivo de biópsia da válvula aórtica houve crescimento para fungo hialino, tendo sido identificado como *E. album*.

De Hoog; Guarro (1995) consideraram *E. album* um fungo queratinofílico e descreveram suas características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, assim como Simonovicova; Gódyová; Kunert (2004) que, após identificarem esta mesma espécie isolada de material úmido de prédio histórico do século XVII na Eslováquia, comprovaram sua capacidade queratinolítica ao utilizar cabelo como substrato.

A tricosporonose vem causando impacto cada vez maior como causa de mortalidade em pacientes imunodeprimidos apesar da terapêutica instituída, sendo descritas desde

infecções superficiais a disseminadas causadas por diversas espécies de *Trichosporon* como *T. cutaneum* (*T. beigelli*) (LACAZ et al., 2002). Atualmente esta micose ainda é considerada emergente, com registros de fungemia relacionada principalmente ao uso de cateteres (KONTOYIANNIS et al., 2004; NUCCI; MARR, 2005).

Em 1902 por Vuillemin descreveu *Trichosporon beigelli* como uma levedura blasto artrosporada (LACAZ et al., 2002). Posteriormente, várias espécies foram consideradas sinônimas de *T. beigelli*, sendo citadas a partir de 1890 por Behrend, *T. ovoides*; 1896 Unna, *T. giganteum*; 1921 Rischin, *T. asteroides*; 1927 Ota, *T. cerebriformis*; 1928 Ota, *T. granulosum*; 1929 Akagi, *T. asahii*; 1932 Mazza et Nino, *T. humahnaquensis*; 1935 Dodge, *Piedraia colombiana*; 1940 Arêa Leão *T. minor* e 1969 Ota, *T. cutaneum* (BARNETT; PAINE; YARROW, 2000; LACAZ et al., 2002).

Lodder; Kreger-van Rij em 1952 consideraram *T. beigelli* como sinônimo de *T. cutaneum* (LACAZ et al., 2002) e Barnett; Paine; Yarrow (2000) citam mais de cinquenta sinônimas.

O envolvimento de diversos órgãos por *T. cutaneum* foi citado por Haupt et al. (1983) em infecções incluindo pulmões, olhos, pele e cérebro. De acordo com estes autores, paciente neutropênico febril pode apresentar episódios de tricosporonúria como indício de disseminação.

Walsh et al. (1986) registraram casos de micoses por *T. beigelli* (*T. cutaneum*) em pacientes com neoplasias reforçando que estas infecções quase sempre são fatais. Pesquisas posteriores realizadas por Walsh (1989) reportaram 67 casos de tricosporonose com 82% para infecção disseminada envolvendo pulmões, rins, fígado, pele, baço e coração.

T. cutaneum é considerada uma espécie patogênica encontrada naturalmente no solo. Conhecido como agente da *pedra branca*, esta espécie tem sido citada como causa de micoses graves emergentes em pacientes imunocomprometidos. Tricosporonose foi reportada em paciente com doença neoplásica terminal, cirurgia de válvula prostética, queimaduras e em recém-nascidos prematuros. Neutropenia é considerada um importante fator de risco. Trato gastrointestinal, trato respiratório, uso de cateteres, procedimentos cirúrgicos cardíacos e algumas lesões de pele são portas de entrada para o desenvolvimento da forma invasiva da levedurose (FISHER et al., 1993; TASHIRO et al., 1994; HAJJEH; BLUMBERG, 1995; KATAOKA-NISHIMURA et al., 1998).

Herbrecht et al. (1993) mostraram que *T. beigelli* é capaz de causar lesões superficiais na pele e aparelho digestivo, pneumonite de hipersensibilidade e infecções profundas, principalmente em imunodeprimidos.

Morimoto et al. (1994) desenvolveram uma pesquisa salientando a gravidade e o crescente aumento de infecções fúngicas oportunista por *T. cutaneum* em pacientes imunocomprometidos. A infecção manifestava-se por febre e pneumonia, sendo o diagnóstico esclarecido em 25% dos casos após óbito.

Segundo Tashiro et al. (1994), infecções profundas por *T. cutaneum* estão associadas a uma alta taxa de mortalidade (64 a 88%), relacionando-se a remissão da doença ao restabelecimento das funções da medula óssea.

1.3.5 MICOSES EM CARÁTER OPORTUNISTA

1.3.5.1 DERMATOFITOSE

Variações clínicas atípicas de dermatofitoses são cada vez mais relacionadas às espécies fúngicas, tamanho do inóculo, área do corpo acometida e principalmente ao estado imunológico do hospedeiro (ANTUONO; BARDAZZI; ANDALOU, 2001).

Os agentes etiológicos responsáveis são espécies de dermatófitos, fungos patógenos que produzem predominantemente infecções da pele, unhas e cabelo, cujas lesões podem ser eritematosas, descamativas e facilmente diagnosticadas (SUMMERBELL, 1997; EVANS, 1998; MIDGLEY; CLAYTON; HAY, 1998; AKIBA et al., 2001; CHASTAIN; REED; PANKEY, 2001; ERBAGCI, 2002).

De acordo com Elewski (1992), os fungos pertencentes a este grupo são relacionados entre si pela similaridade fisiológica, morfológica e de patogenicidade. Espécies de *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton floccosum* são comumente implicadas nos casos de dermatofitoses, destacando-se *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *Microsporum gypseum* e *M. canis*. Para Summerbell (1997) e Evans (1998) *T. rubrum* é considerada a mais prevalente.

Estes fungos estão relacionados a organismos do solo, ativos na composição de material queratinizado e apresentam uma predileção ecológica no que diz respeito a sua adaptação ao ambiente. Desta forma, os dermatófitos podem ser divididos em relação ao seu habitat, sendo classificados naqueles que se disseminam do homem para o homem (antropofílicos), do animal para o homem (zoofílicos) ou do solo para o homem (geofílicos) (SIDRIM; ROCHA, 2004; MACHADO et al., 2005).

Novick; Tapia; Bottone (1987) reportaram estudo sobre um receptor de transplante renal, sob tratamento imunossupressor agressivo, que desenvolveu lesões subcutâneas, granulomatosas, com formação de abscessos neutrofílicos. Após exame histológico e cultura

de biópsia foi identificado *T. rubrum* como agente desta micose oportunista numa apresentação clínica atípica.

Pesquisa desenvolvida por Domp martin et al. (1990) sobre dermatofitoses em pacientes com AIDS demonstrou que a maioria dos pacientes apresenta onicomicose proximal superficial. Contudo, associações envolvendo interdígitos foram consideradas raras, diferentemente dos casos relacionados à região plantar que foram freqüentes. Resultados laboratoriais comprovaram que dentre as espécies de dermatófitos, *T. rubrum* foi o agente etiológico mais freqüente.

Haneke (1991) destaca *T. rubrum* como agente etiológico de onicomicose mais freqüente e de difícil tratamento. Os autores mencionam o aumento na incidência desta micose com a idade e ressaltam que as formas clínicas devem ser diferenciadas de onicodistrofia não infecciosa, psoríase das unhas e eczema crônico da unha.

Segundo Goettmann-Bonvallot (2003), onicomicoses superficiais do tipo leuconíquia são causadas predominantemente por *T. interdigitale* e, menos freqüentemente por *T. rubrum*, em crianças e pacientes imunossuprimidos.

Segundo Aly; Berger (1996), Bardazzi et al. (2000) e Antuono; Bardazzi; Andalou (2001), nos pacientes imunodeprimidos as lesões dermatofíticas podem se assemelhar a outras doenças como a dermatite seborréica, lupus eritematoso, granulomas, dermatite herpetiforme, psoríase, foliculite, púrpura, impetigo, sífilis terciária e pitiríase versicolor. *T. rubrum* usualmente desenvolve lesões crônicas, não-inflamatórias, comumente confinadas a estruturas superficiais ricas em queratina.

Baseado em Aly; Berger (1996), dermatofitoses são freqüentes em pacientes HIV-positivos num percentual entre 20 a 40% exibindo variedades clinicamente atípicas de *tinea corporis* e corroborando com a idéia de que as condições imunológicas do hospedeiro podem determinar o curso clínico desta micose.

Dois casos de *tinea corporis* foram relatados por Porro et al. (1997). Os pacientes foram diagnosticados como portadores da AIDS os quais apresentavam lesões dermatofíticas bizarras por *M. gypseum*.

Miranda et al. (1998) descrevem *M. gypseum* como um fungo geofílico de distribuição mundial com prevalência de 0,72 a 5,2% dos casos de infecções humanas, sendo considerada baixa quando comparada com a de outros dermatófitos.

Um caso de infecção invasiva por *T. rubrum* foi descrito por Squeo et al. (1998) em transplantado renal de 55 anos com lesões nos pés e unhas clinicamente compatíveis para

blastomicose. Após histopatológico e cultura dos tecidos foi possível estabelecer o diagnóstico final para dermatofitose.

Kwon et al. (2004) afirmam que infecções fúngicas oportunistas são comumente encontradas em pacientes com AIDS, e as infecções causadas por dermatófitos podem se desenvolver de forma atípica e agressiva nestes pacientes e conduzir a um diagnóstico distorcido. Os autores reportaram infecção por *T. rubrum* em um homem de 44 anos com AIDS que apresentou lesões generalizadas e com aparência de tumores.

Vários autores afirmam que dermatófitos comumente são agentes de micose superficiais; todavia, casos excepcionais de infecção invasiva disseminada por *T. rubrum* são descritos com destaque nos imunodeprimidos (SENTAMILSEVI et al., 1998; NIR-PAZ et al., 2003).

Machado et al. (2005) descrevem um caso de lesão atípica palpebral por *M. gypseum* em uma paciente com 22 anos portadora de psoríase. O aspecto clínico revelava lesão descamativa anelar, infiltrativa e crostosa no olho esquerdo, com piora e persistente a tratamento com corticóides. Os autores concluíram que imunodepressão aumenta a incidência de infecção fúngica com apresentações clínicas atípicas.

Da Silva et al. (2005) compararam a produção de enzimas extracelulares por *T. rubrum* verificando as variações intra-específicas entre os isolados e o status imunológico do hospedeiro. Sessenta isolados obtidos de pacientes com AIDS, HIV-positivos e HIV-negativos foram comparados sendo constatadas diferenças significativas na produção enzimática.

Pei-Lun Sun; Hsin-Tsung Ho (2006) relatam a existência de uma variedade de apresentações clínicas de *tinea corporis* causada por *M. gypseum*. Estes autores acompanharam um caso de *tinea corporis* com aspecto incomum de lesão no abdômen, semelhante a anéis concêntricos, em paciente do sexo feminino com 18 anos. O status imunológico pode ser o responsável por estas variações, todavia alguns pacientes imunocompetentes também podem exibir lesões incomuns.

1.1.5.2 PARACOCIDIOIDOMICOSE

As micose sistêmicas são originadas principalmente pela inalação de propágulos fúngicos, como ocorre na paracoccidioidomicose, a qual é causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, encontrado nos solos das Américas do Sul e Central. Na América do Sul, a maioria dos casos ocorre na Colômbia, Venezuela e, particularmente no

Sudeste do Brasil, onde São Paulo é a área mais prevalente (FRANCO et al., 1989; RESTREPO; MCEWEN; CASTANEDA, 2001).

Este fungo é o agente etiológico da micose sistêmica mais importante na América Latina. Conhecido apenas em sua forma assexuada ou imperfeita, seus conídios encontram-se presentes no solo em sua fase micelial (BURNIER; SANT'ANNA, 1997; HORRÉ et al., 2002; LACAZ et al., 2002).

Restrepo; McEwen; Castaneda (2001) acreditam que a fase filamentosa do fungo é a melhor para formar conídios capazes de penetrar no hospedeiro, produzindo doença.

De acordo com Salazar; Restrepo; Stevens (1988) e Aristizabal et al. (1998), hormônios femininos como o estrógeno, inibem a transformação *in vitro* da fase filamentosa para leveduriforme, sendo esta considerada a razão principal para a baixa incidência desta micose no sexo feminino. Silva et al. (1988) recomendam uma máxima atenção para o diagnóstico desta micose em áreas endêmicas, especialmente em homens com mais de 30 anos de idade e que desempenham atividades com solo e vegetais.

Vários autores concordam que infecção por inoculação direta de *P. brasiliensis* através da pele é bastante rara, levantando-se a hipótese de inoculação do patógeno por trauma ou ação mecânica (DEL NEGRO; LACAZ; FIORILLO, 1982; PINHEIRO; ORÉFICE; MASON, 1987; SILVA et al., 1988; SAN-BLAS; NIÑO-VEGA; ITURRIAGA, 2002).

As manifestações clínicas, segundo Franco et al. (1987) e Blotta et al. (1999), se apresentam com envolvimento mucocutâneo, linfático e visceral, podendo ser agudas, subagudas e crônicas. A maioria dos casos tem evolução crônica, com lesões granulomatosas nos pulmões e outros tecidos.

De acordo com Brummer; Castaneda; Restrepo (1993) e Horrre et al. (2002), a forma juvenil da doença é aguda ou subaguda; quando na forma adulta, se apresenta usualmente crônica com períodos prolongados de latência entre a infecção e a manifestação clínica. Os sintomas respiratórios podem ser não-específicos, porém o envolvimento pulmonar quase sempre existe na forma crônica multifocal da doença além das lesões mucocutâneas especialmente nas cavidades oral e nasal.

Burnier; Sant'Anna (1997) descreveram dois casos de paracoccidioidomicose palpebral nos quais este foi o primeiro sinal da doença. Em ambos os casos, o diagnóstico para infecção fúngica foi realizado apenas após estudo histopatológico do tecido lesado, descartando-se a hipótese para doença neoplásica. O primeiro paciente do sexo masculino, com 68 anos de idade, jardineiro aposentado apresentava lesão ulcerativa na pálpebra superior esquerda com suspeita para carcinoma glandular sebáceo. O histopatológico revelou as

microestruturas típicas para *P. brasiliensis*. O segundo paciente era do sexo masculino, 37 anos de idade com lesão eritemato-crustosa, pouco purulenta no canto do olho direito. A hipótese diagnóstica para este caso era de tumor ulcerativo de célula basal. Após exame histopatológico, confirmou-se a paracoccidioidomicose.

Goldani; Sugar (1995), afirmaram que esta micose é rara em pacientes imunodeprimidos, especialmente associada com a AIDS. Entretanto, alguns casos foram descritos em indivíduos HIV-positivos, com óbito durante a fase aguda e disseminada da doença (PEDRO et al., 1989; MARQUES et al., 1995).

Diagnóstico em pacientes com AIDS pode ser alcançado através da análise direta e cultura de materiais biológicos como: biópsia por aspiração de medula óssea (PEDRO et al., 1989), aspirado de linfonodo (BERNARD et al., 1990), hemocultura (HAAD et al., 1992), exame do esputo (LIMA et al., 1995) e biópsia de pele (GOLDANI et al., 1991; BAGATIN et al., 1992; MARQUES et al., 1995).

Santos et al. (1998) reportaram um caso de paracoccidioidomicose em paciente do sexo feminino com 52 anos de idade e portadora da AIDS, que apresentava lesão nodular restrita no lobo superior do pulmão direito. Os autores relatam que esta micose pode se expressar com padrões radiológicos e clínicos bastante variados em pacientes com algum tipo de imunodeficiência.

Giovani et al. (2000) descreveram um caso de paracoccidioidomicose com envolvimento gengival em mulher portadora do HIV com 29 anos de idade, através de análise microscópica da lesão demonstrando escassez de células gigantes.

Lacaz et al. (2002) afirmam que, penetrando no organismo humano por via aerógena, transcutânea ou através de mucosas, *P. brasiliensis* adquire uma morfologia característica que permite diagnóstico micológico com relativa facilidade. Contudo, podem ser realizados ainda testes intradérmicos com antígeno paracoccidioidina com 60% dos casos de infecções subclínicas em população de áreas endêmicas diagnosticados (FRANCO et al., 1994).

Almeid; Scully (2002) relacionaram a baixa incidência de paracoccidioidomicose em indivíduos HIV-positivos à prevalência desta micose em áreas rurais e ao uso de drogas antifúngicas administradas neste grupo de pacientes.

Horré et al. (2002) reportaram um caso de paracoccidioidomicose crônica em um legionário alemão que viveu em área endêmica no Brasil por 10 anos. O diagnóstico foi estabelecido pela presença de células leveduriformes com brotações multipolares no tecido da cavidade oral lesada. Identificação do fungo foi baseada na morfologia e na genética.

Mendes-Giannini; Moraes; Ricci (1990) registraram capacidade de uma fração

proteolítica (gp43kDa) presente em soro de pacientes com infecção em atividade e no sobrenadante de cultivos de *P. brasiliensis*. A 35°C em pH 6 foi demonstrada a solubilização completa de elastina e hidrólise da caseína. A atividade proteolítica também foi avaliada por Vaz et al. (1994) em amostras virulentas e não-virulentas desta espécie utilizando gelatina como substrato. Tal atividade foi considerada por Matsuo et al. (2005) como intimamente relacionada à presença do antígeno gp43kDa dominante do fungo. Todavia, os autores acreditam que essa fração parece não ter participação na virulência.

Assis; Gambale; Paula (1999), em 20 amostras de *P. brasiliensis*, verificaram que esse fungo produz, *in vitro*, proteinase e fosfolipase, demonstrando que tais enzimas podem estar associadas a patogenicidade do fungo.

Puccia et al. (1998) caracterizaram um componente exocelular do *P. brasiliensis* com atividade proteolítica capaz de provocar a clivagem da membrana basal do fungo, composta de laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanas. Esses dados sugerem o envolvimento desta enzima na degradação da membrana basal do fungo, primeiro passo para sua invasão aos tecidos. Esta proteína (Gp43) foi separada por migração em SDS-PAGE e está localizada entre as regiões 69 e 43kDa, possuindo atividade hidrolítica.

Gp43 é uma glicoproteína de 43kD componente da parede do fungo, secretada extracelularmente, considerada o antígeno mais conhecido da espécie. Inalação dos conídios e transformação em estruturas leveduriformes nos tecidos, com infecção primária dos pulmões e disseminação via linfática e vasos sanguíneos, são os mecanismos de contaminação mais freqüentes. Trabalhos relatam a existência de animais reservatórios e eventuais transmissores da paracoccidioidomicose (BAGAGLI et al., 1998).

1.4 CARACTERÍSTICAS DE PATOGENICIDADE

Entre vários fatores predisponentes extrínsecos ao hospedeiro, existem determinadas características envolvendo os fungos que são indicativos de patogenicidade como a capacidade de crescer a temperatura de 37°C e produzir enzimas como as proteases. Diversos autores consideram a ação enzimática relevante, uma vez que podem causar morte do tecido hospedeiro e iniciar infecção no organismo pela aderência às células gliais do cérebro ou do tecido epitelial respiratório em cobaia (CONANT et al., 1971; RIPPON, 1982; KWON-CHUNG; BENNET, 1992; CHEN et al., 1997; LACAZ et al., 2002).

A caracterização quanto ao potencial patogênico das amostras de fungos oportunistas obtidas de pacientes imunodeprimidos é fundamental para o estabelecimento de um tratamento específico (LACAZ et al., 2002).

Algumas espécies produzem um grande número de enzimas diferindo de outros sob as mesmas condições. A atividade enzimática tanto dos fungos filamentosos quanto das leveduras tem sido descrita por diversos autores através de métodos semiquantitativos, interpretados pela hidrólise de substrato específico através da formação de halos (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975; ADAMS; DEPLOEY, 1978; TRIGIANO; FERGUS, 1979; FEDERICI, 1982).

Ao hidrolisar peptídeos, enzimas como proteases extracelulares desempenham um importante papel no crescimento, multiplicação fúngica e na invasão do tecido hospedeiro (MAYSER et al., 1996; SIMPANYA; BAXTER, 1996; SINGH, 1997; SIDRIM; ROCHA, 2004).

De acordo com Kuriyama; Williams; Lewis (2003) e Bar-Shimon et al. (2004) protease é uma enzima sugerida como fator de virulência de muitas espécies de *Candida* de importância médica; contudo pode estar mais envolvida com a propagação do fungo no hospedeiro durante o processo invasivo do que na atuação como fator de virulência propriamente dito.

Para Schaller et al. (2005), estas enzimas se apresentam como importantes fatores de patogenicidade de fungos durante infecções de mucosa disseminadas, podendo contribuir para a indução na resposta imunológica inflamatória do hospedeiro. Os danos teciduais estão relacionados com a resposta epitélio-induzida pro-inflamatória por citocina, a qual pode ser crucial no controle e tratamento de infecções por fungos.

A caseína pode ser utilizada como substrato para detecção de protease e, ao ser hidrolisada pela casease, é transformada em produtos solúveis pelo processo de peptonização. A presença desta enzima é evidenciada facilmente pela inoculação do microrganismo na superfície do meio ágar-leite e formação de zonas claras em torno das colônias (NEDER, 1992).

Outros substratos protéicos podem ser utilizados na detecção enzimática, como citado por Aoki et al. (1990), que mencionam soro de albumina bovina como substrato bastante sensível para detecção de atividade proteásica em diversas espécies de fungos.

A capacidade de liquefazer gelatina, um substrato protéico, é de limitado uso taxonômico, uma vez que somente algumas leveduras são gelatinase positivas (KREGER-VAN RIJ, 1984; ROSE; HARRISON, 1987).

Bistoni et al (1984) e Ruchel; Boning; Borg (1986) demonstraram a fraca ou ausente virulência de *C. parapsilosis* em testes realizados em animais imunossuprimidos. Contudo,

outros autores afirmam que a produção de proteases por esta espécie pode ser detectada *in vitro* (DE BERNARDIS et al., 1990).

Calvo et al. (1985) avaliaram a capacidade de *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* em produzir enzimas extracelulares através de um método semiquantitativo e verificaram a produção de proteases diversas por todos os gêneros.

Samal et al. (1991) isolaram e purificaram uma protease de *Tritirachium album* (*E. album*) que foi obtida após indução em meio contendo leite desnatado como substrato protéico. Estes mesmos autores designaram proteases R e T, avaliando a estabilidade térmica enzimática.

Segundo Jorge et al. (1993), enzimas como aspartil proteinases e fosfolipases são produzidas pelo gênero *Candida* facilitando o estabelecimento da infecção e podendo causar danos epiteliais.

Carmona et al. (1995) citam a presença de uma protease exocelular na fase leveduriforme de *P. brasiliensis*. Posteriormente, Puccia et al. (1998) e Bramono et al. (2006) caracterizaram a atividade exocelular de protease produzida por *P. brasiliensis* e verificaram que no pico da atividade desta enzima ocorreu quebra de componentes da membrana basal da matriz extracelular, incluindo laminina, fibronectina, colágeno tipo IV e proteoglicanos. Colágeno humano tipo I, fibrinogênio bovino, imunoglobulina G humana, soro de albumina bovina e a proteína Gp43 foram resistentes à proteólise. Os autores sugerem o envolvimento desta enzima durante a primeira fase da invasão tecidual pelo fungo.

Muhsin; Aubaid; al-Duboon (1997) avaliaram a atividade de cinco enzimas extracelulares de 123 isolados, incluindo dermatófitos e leveduras. Foram detectadas em meio sólido elastase, queratinase, protease (gelatinase), lipase e fosfolipase; contudo, gelatinase foi produzida exclusivamente pelos dermatófitos.

Isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* foram testados por Wu; Saramanayake (1999) quanto à expressão de genes SAP's em meio indutor de atividade proteásica (soro de albumina bovina). *C. albicans* foi a espécie que demonstrou atividade proteolítica mais significativa.

Pesquisas recentes analisaram a interferência dos agentes anti-retrovirais utilizados por pacientes com AIDS na produção de proteases por isolados de *Candida*. Proteases secretadas por este gênero são similares às produzidas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), podendo ser inibidas nos pacientes submetidos à terapia anti-retroviral (BORG-VON ZEPELIN et al., 1999; GHANNOUM, 2000).

Gifford; Klippenstein; Moore (2002) investigaram o efeito da adição do soro fetal bovino e do soro de albumina bovina ao meio mínimo essencial para crescimento e produção de protease por *A. fumigatus*. A protease detectada foi capaz de degradar as proteínas da lâmina basal celular, demonstrando a invasividade potencial desta espécie.

De acordo com Monod et al. (1995), a infecção por *Aspergillus* caracteriza-se pela degradação do parênquima pulmonar. Kothary; Chase; Macmillan (1984) demonstraram através de estudos a correlação entre a produção de protease e virulência em modelos de infecção em ratos.

De acordo com Nigam; Ghosh; Sarma (2003), *A. fumigatus* apresenta fatores potenciais de virulência na patogênese da aspergilose, em especial a proteína gp56 com atividade proteolítica.

Chaves; Cavalcanti; Porto (2003) avaliaram a patogenicidade de 15 leveduras de importância médica estocadas sob óleo mineral em coleção de culturas e de 15 recém isoladas de pacientes com AIDS internados em hospital de referência. Nenhum isolado exibiu atividade proteásica em meio caseína, sugerindo inadequada para leveduras a metodologia utilizada.

Chellappan et al. (2006) reportaram a produção de uma protease alcalina por isolado marinho de *E. album*. Os autores observaram uma produção considerável desta enzima ao utilizar sacarose como fonte de carbono e peptona, leite desnatado e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Segundo a pesquisa, esta espécie pode ser considerada uma importante produtora de enzimas que podem ser aplicadas na indústria de detergentes.

1.5 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Notável progresso no tratamento para doenças infecciosas bacterianas têm sido alcançado, diferentemente dos tratamentos antifúngicos, em especial aqueles para micose sistêmicas oportunistas. Medicamentos com toxicidade seletiva às bactérias são desenvolvidos com base na natureza procariótica destes microrganismos; contudo, a formulação de drogas antifúngicas torna-se mais complexa devido à natureza eucariótica das células fúngicas semelhante às células humanas. Desta forma, vários pesquisadores afirmam a necessidade de novos antifúngicos mais potentes e menos tóxicos (RANDHAWA, 2000; LACAZ et al., 2002).

1.3.1 ITURINA-A

Isolados de *Bacillus subtilis* são conhecidos por sua ação antagonista aos fungos. Desde a descoberta da subtilina por Jansen e Hirschmann (1944), três antibióticos adicionais como a bacitracina, bacilina e eumicina têm sido descritos como produtos de cepas de *B. subtilis* (BENEDICT; LANGLYKKE, 1947).

Durante uma pesquisa objetivando encontrar antibióticos contra infecções por *Torula histolytica*, foi isolado de uma cultura contaminada de *Actinomyces griseus* uma cepa de *B. subtilis* que apresentou baixa atividade antibacteriana e propriedades fungistáticas. A substância antibiótica foi designada bacilomicina (JOHNSON; BURDON, 1946; BURDON; JOHNSON, 1947).

Landy et al. (1948) testaram filtrados das culturas em meio líquido de *B. subtilis* contra uma suspensão de *Trichophyton mentagrophytes* inoculada na superfície do meio Sabouraud maltose ágar. A unidade da atividade foi equivalente à zona produzida por 0,1mg da preparação da bacilomicina. A bacilomicina é solúvel em metanol, etanol, n-butanol e acetona. De acordo com estes autores, o espectro de ação da bacilomicina inclui praticamente todos dermatófitos importantes e fungos sistêmicos.

Warren; Rosenman; Colio (1948) isolaram bacilomicina de cultura de *B. subtilis*, inativa contra bactérias e com atividade contra *C. albicans*.

Em 1949, Walton; Woodruff reportaram o isolamento e as propriedades das substâncias fungistáticas de cultura de *B. subtilis*. Sob certas condições em cultura, a atividade fungistática produzida se deve à ação da chamada micosubtilina presente no caldo de subtilina. Foram testadas as atividades da micosubtilina contra diversas espécies de leveduras, entre elas *C. guilliermondii* cuja concentração inibitória foi superior a 20µg/mL, semelhante a fungos filamentosos como *A. niger*. Espécies de dermatófitos como *Microsporum* e *Trichophyton* variaram nas concentrações inibitórias entre 1.5-10.0 µg/mL de micosubtilina. O crescimento do *F. moniliforme* foi inibido a uma concentração de 7.5 µg/mL. Todavia, a adição de soro de cavalo a 10% incorporado ao ágar neutralizou completamente a atividade desta substância. Segundo estes autores foi impossível demonstrar a ação desta substância injetada no sangue de animais devido ao efeito neutralizante do soro sangüíneo na atividade antifúngica.

Raubitschek; Dostrovsky (1950) testaram a atividade do princípio antimicótico de cepas do *B. subtilis* contra dermatófitos em testes de diluição em ágar, demonstrando sua capacidade inibitória.

Em Ituri no Zaire, Delcambe e Devignat (1957), isolaram de meio de cultura contendo uma cepa de *B. subtilis* um polipeptídeo denominado iturina. Esta substância demonstrou alta atividade antifúngica contra leveduras e fungos filamentosos, tendo sido purificada e descrita posteriormente por estes mesmos autores.

Peypoux et al. (1973) através de uma reinvestigação da composição da iturina revelou ser esta uma mistura de iturina-A, iturina-B e iturina-C, as quais foram separadas por cromatografia de coluna. Iturina-A foi considerada o maior constituinte (30%) responsável por toda a atividade antifúngica; iturina-B e iturina-C não apresentaram atividade antifúngica. A fração lipídica da iturina-A apresenta duas longas cadeias de β -aminoácidos, classificando-o como um peptidiolipídio.

Peypoux et al. (1978) definiram a estrutura cíclica da iturina-A através de análise química e espectrometria de massa.

Besson; Peypoux; Michel (1979) testaram a atividade antifúngica da iturina-A, micosubtilina e bacilomicina L contra *Saccharomyces cerevisiae* com boa atividade antifúngica (30 μ g/mL). Além disso, vários lipídios foram testados como inibidores da atividade antifúngica. Colesterol foi considerado o inibidor mais potente alterando a capacidade antifúngica destas substâncias.

Segundo Latoud et al. (1986) e Klich; Lax; Bland (1991) o peptidiolipídio iturina-A possui a capacidade de inibir micotoxinas e a germinação de esporos de uma variedade de fungos. Produzido por algumas cepas de *B. subtilis* tem sido utilizado com sucesso no controle biológico de fungos fitopatogênicos. A atividade antifúngica desta bactéria resulta da produção de compostos antagonistas.

Klich; Lax; Bland (1991) demonstraram as propriedades antifúngicas da iturina-A ao inibir o crescimento de espécies toxigênicas de *Fusarium*, *Penicillium* e *Aspergillus*. A maioria dos isolados foi inibida por concentrações abaixo de 4 μ g/mL.

Thimon et al. (1995) demonstraram a atividade antifúngica da iturina, lipopeptídeo produzido pelo *B. subtilis*, afetando a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras.

2 REFERÊNCIAS

ADAMS, P.R.; DEPLOEY, J.J. Enzymes produced by thermophilic fungi. **Mycologia**, v.70, p.906-910, 1978.

AKIBA, H.; MOTOKI, Y.; SATOH, K.; IWATSUKI, K.; KANEKO, F. Recalcitrant trichophytic granuloma associated with NK-cell deficiency in a SLE patient treated with corticosteroid. **Eur. J. Dermatol.**, v.11, p.58-62, 2001.

ALBELDA, S.M.; TALBOT, G.H. Pulmonary aspergillosis. In: FISHMAN, A.P. **Pulmonary disease and disorders**, 2ª ed. New York, McGraw-Hill Book Co, p.1639-1955, 1988.

ALMEID, O.P.; SCULLY, C. Fungal infections of the mouth. **Braz. J. Oral Sci.**, v.1, n.1, p.19-26, 2002.

ALY, R.; BERGER, T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, v.22, p.128-132, 1996.

ANAISSE, E.; KANTARJIAN, H.; JONES, P.; BARLOGIE, B.; LUNA, M.; LOPEZ-BERENSTEIN, G.; BODEY, G. *Fusarium*, a newly recognized fungal pathogen in immunosuppressed patients. **Cancer**, v.57, p.2141-2145, 1986.

ANAISSE, E.; NELSON, P.; BEREMAND, M.; KONTOYANNIS, D.; RINALDI, M. *Fusarium* caused hyalohyphomycosis, an overview. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.4, p.231-249, 1992.

ANTUONO, A.D.; BARDAZZI, F.; ANDALOU, F. Unusual manifestations of dermatophytosis. **Int. J. Dermatol.**, v.40, p.164-166, 2001.

AOKI, S.; ITO-KUWA, S.; NAKAMURA, Y.; MASUHARA, T. Comparative pathogenicity of wild-type strains and respiratory mutants of *Candida albicans* in mice. **Zol. Bakt.**, v.273, p.332-343, 1990.

ARISTIZABAL, B.H.; CLEMONS, K.V.; STEVENS, D.A.; RESTREPO, A. Morphological transition of *Paracoccidioides brasiliensis* conidia to yeast cells: *in vivo* inhibition in females. **Infect. Immun.**, v.66, p.5587- 5591, 1998.

ASCIOGLU, REX, J.H.; DE PAUW, B.; BENNETT, J.E; BILLE, J.; CROKAERT, F.; DENNING, D.W.; DONNELLY, J.P.; EDWARDS, J.E.; ERJAVEC, Z.; FIERE, D.; LORTHOLARY, O.; MAERTENS, J.; MEIS, J.F.; ASSIS, C.M. et al. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v.145, p.13-17, 1999.

ASSIS, C.M.; GAMBALE, W.; PAULA, C.R. Production of proteinase and phospholipase by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, v. 146, p.13-17, 1999.

AUGUSTINSKY, J.; KAMMEYER, P.; HUSAIN, A.; DE HOOG, G.S.; LIBERTIN, C.R. *Engyodontium album* endocarditis. **J. Clin. Microbiol.**, v.28, n.6, p.1479-1481, 1990.

AYMAN, O.; SOUBANI, M.D.; PRANATHARTHI, H.; CHANDRASEKAR, M.D. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. **Chest**, v.121, p.1988-1999, 2002.

BAGAGLI, E.; SANO, A.; COELHO, K.I.; ALQUATI, S.; MIYAJI, M.; CAMARGO, Z.P.; G.M.; GOMES, MONTENEGRO, M.R. Isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from armadillos (*Dasypus noveminctus*) captured in an endemic area of paracoccidioidomycosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.58, p.505-512, 1998.

BAGATIN, E.; GONÇALVES, V.L.; SABONGI, V.P.; SOTO, M.N. Paracoccidioidomycosis in a patient with HIV-1 infection. **Rev. Paul. Med.**, v.110, p.193-194, 1992.

BALLOY, V.; HUERRE, M.; LATGE, J.P.; CHIGNARD, M. Differences in patterns of infection and inflammation for corticosteroid treatment and chemotherapy in experimental invasive pulmonary aspergillosis. **Infect. Immun.**, v.73, n.1, p.494-503, 2005.

BARDAZZI, F.; RAONE, B.; NERI, I.; PATRIZI, A. Tinea faciei in a new-born: a new case. **Pediatr. Dermatol.**, v.17, n.6, p.494-495, 2000.

BAR-SHIMON, M.; YEHUDA, H.; COHEN, L.; WEISS, B.; KOBESHNIKOV, A.; DAUS, A.; GOLDWAY, M.; WISNIEWSKI, M.; DROBY, S. Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. **Curr. Genet.**, v.45, n.3, p.140-148, 2004.

BARNETT, J.A.; PAINE, R.W.; YARROW, D. **Yeasts: Characteristics and Identification**. Cambridge, Cambridge University Press, 2000.

BARST, R.J.; PRINCE, A.S.; NEU, H.C. *Aspergillus* endocarditis in children: case report and review of literature. **Pediatrics**, v.68, p.73-78, 1981.

BAYER, A.S.; SCHOLD, M. Endocarditis and intravascular infection. In: Mandell, G.L.; Bennet, J.E.; Dolin, R. (eds): Mandell, Douglas and Bennet's principles and practices of infectious diseases. Philadelphia, PA, Churchill Living-Stone, p.857-902, 2000.

BENEDICT, R.G.; LANGLYKKE, A.F. **Ann. Rev. Microbiol.**, v.1, p.193, 1947.

BERNARD, G.; BUENO, J.P.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; et al. Paracoccidioidomycosis in a patient with HIV infection: immunological study. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.84, p.151-152, 1990.

BESSON, F.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Antifungal activity upon *Saccharomyces cerevisiae* of iturin A, mycosubtilin, bacillomycin L and of their derivatives; inhibition of this antifungal activity by lipid antagonists. **J. Antibiotics**, v.32, n.8, p.828-833, 1979.

BINDER, R.E.; FALING, L.J.; PUGATCH, R.D. et al. Chronic necrotizing pulmonary aspergillosis: a discrete clinical entity. **Medicine**, v.61, p.109-124, 1982.

BISTONI, F.; VECCHIARELLI, A.; CENEI, A.; SBARAGLIA, G.; PERITO, S.; CASSONE, A. A comparison of experimental pathogenicity of *Candida* species in cyclophosphamide-immunodepressed mice. **Sabouraudia**, v.22, p.409-418, 1984.

BLOTTA, M.H.; MAMONI, R.L.; OLIVEIRA, S.J.; NOUER, S.A.; PAPAIORDANOU, P.M.; GOUVEIA, A.; CAMARGO, Z.P. Endemic regions of paracoccidioidomycosis in Brazil: a clinical and epidemiologic study of 584 cases in the southeast region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.61, p.390-394, 1999.

BODEY, G.P.; VARTIVARIAN, S. Aspergillosis. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.8, p.413-437, 1989.

BORG-VON ZEPELIN, M.; MEYER, I.; THOMSEN, R.; WÜRZNER, R.; SANGLARD, D.; TELENTI, A.; MONOD, M. HIV-protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeasts secreted aspartic proteases. **J. Invest. Dermatol.**, v.113, p.747-751, 1999.

BOUTATI, E.I.; ANAÏSSIE, E.J. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years' experience at a cancer center and implications for management. **Blood**, v.90, p.999-1008, 1997.

BOUZA, E.; MOYA, J.G.; MUNOZ, P. Infections in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v.15, p.335-361, 2001.

BRAMONO, K.; YAMAZAKI, M.; TSUBOI, R.; OGAWA, H. Comparison of proteinase, lipase and alpha-glucosidase activities from the clinical isolates of *Candida* species. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.59, p.73-76, 2006.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A. Paracoccidioidomycosis: na update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.6, p.89-117, 1993.

BURDON, K.L.; JOHNSON, E.A. Conference on Antibiotic Research. Antibiotics Study Section, **Nat. Inst. Health**, 1947.

BURGESS, L.W. General ecology of the *Fusarium*. In: Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Cook, R.J. (eds), ***Fusarium: diseases, biology, and taxonomy***. Pennsylvania State University Press, University Park, p.225-235, 1981.

BURNIER, S.V.; SANT'ANNA, A.E. Palpebral paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v.140, p.29-33, 1997.

BUSHELMAN, S.J.; CALLEN, J.P.; ROTH, D.N.; COHEN, L.M. Disseminated *Fusarium solani* infection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.32, p.346-351, 1995.

CALVO, M.A.; BRUGUERA, T.; CABAÑES, F.J.; CALVO, R.M.; TRAPE, J.; ABARCA, L. Extracellular enzymatic activities of dermatophytes. **Mycopathologia**, v.92, p.19-22, 1985.

CARMONA, A.K.; PUCCIA, R.; OLIVEIRA, M.C.F.; RODRIGUES, E.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Characterization of an exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. **Biochem. J.**, v.309, p.209-214, 1995.

CASSON, D.H.; RIORDAN, F.A.I.; LADUSENS, E.J. *Aspergillus* endocarditis in chronic granulomatous disease. **Acta Paediatr.**, v.85, p.758-759, 1996.

CHALLACOMBE, S.J.; NAGLIK, J.R. The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. **Adv. Dent. Res.**, v.19, n.1, p.29-35, 2006.

CHAPMAN, R.L. *Candida* infections in the neonate. **Curr. Opin. Pediatr.**, v.15, n.1, p.97-102, 2003.

CHASTAIN, M.A.; REED, R.J.; PANKEY, G.A. Deep dermatophytosis: report of 2 cases and review of the literature. **Cutis**, v.67, p. 457-462, 2001.

CHAVES, G.M.; CAVALCANTI, M.A.Q.; PORTO, A.L.F. Pathogenicity characteristics of stocked and fresh yeasts strains. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, p.197-202, 2003.

CHELLAPPAN, S.; JASMIN, C.; BASHEER, S.M.; ELYAS, K.K.; BHAT, S.G.; CHANDRASEKARAN, M. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Proc. Biochem.**, v.41, p.956-961, 2006.

CHEN, S.C.A. et al. Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: a new virulence factor? **J. Infect. Dis.**, v.175, p.414-420, 1997.

CHILD, F.J.; FULLER, L.C.; HIGGINS, E.M.; DU VIVIER, A.W.; MUFTI, G.J. Cutaneous presentation of *Fusarium solani* infection in a bone marrow transplant recipient. **J. R. Soc. Med.**, v.89, p.647-648, 1996.

CHO, C.T.; VATS, T.S.; LOWMAN, J.T.; BRANDSBERG, J.W.; TOSH, F.E. *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. **J. Pediatr.**, v.83, p.1028-1031, 1973.

CHUNG-MING C.; PATRICK, C.W.; KEN, T.K.C.; WAH-SHING, L.; VERONICA, L.C.; KWOK-YUNG, Y. Association of presence of *Aspergillus* antibodies with hemoptysis in patients with old tuberculosis or bronchiectasis but no radiologically visible mycetoma. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.2, p.665-669, 2004.

CONANT, F.N.; SMITH, T.L.; BAKER, L.R.; COLLAWAY, L.G. **Micología**, 3ªed, México, Nova Editora Interamericana, 1971.

CONFRANCESCO, E.; BOSCHETTI, C.; VIVIANI, M.A.; BARGIGLIA, C.; TORTORANO, A.M.; CORTELLARO, M.; ZANUSSI, C. Efficacy of liposomal amphotericin B (AmBisome) in the eradication of *Fusarium* infection in a leukaemic patient. **Haematologica**, v.77, p.280-283, 1992.

COOGAN, M.M.; FIDEL, P.L.; KOMESU, M.C.; MAEDA, N.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and mycotic infections. **Adv. Dent. Res.**, v.19, n.1, p.130-138, 2006.

DA SILVA, B.C.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; GANDRA, R.F.; DOS SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; YOSHIOKA, M.C.; CASTRO, L.G.; NUNES, R.S.; BOUCHARA, J.P.; LARCHER, G.; CHABASSE, D.; GAMBALE, W. *Trichophyton rubrum* isolated from AIDS and human immunodeficiency virus-infected patients in São Paulo, Brazil: antifungal susceptibility and extracellular enzyme production. **Chemotherapy**, v.51, n.1, p.21-26, 2005.

DE BERNARDIS, F.; MORELLI, L.; CEDDIA, T.; LORENZENL, R.; CASSONE, A. Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.28, p.125-137, 1990.

DE HOOG, G.S. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. **Study Mycology**, v.1, p.1-41, 1972.

DE HOOG, G.S. Notes on some fungicolous hyphomycetes and their relatives. **Persoonia**, v.10, n.1, p.33-81, 1978.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J. Atlas of clinical fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Universitat Rovira i virgili, Reus, 720 p., 1995.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. Atlas of clinical fungi, 2^a ed, Centraalbureau voor Schimmelculures/Universitat Rovira i Virgili, Utrecht/Reus, The Netherlands, 2000.

DEL NEGRO, G.; LACAZ, C.S.; FIORILLO, A.M. Paracoccidioidomycose. São Paulo, Editora Sarvier, 1982.

DELCAMBE, L.; DEVIGNAT, R. L'itutine, nouvel antibiotique d'origine congolaise. **Acad. Roy Sc Coloniales**, v.6, p.1-77, 1957.

DENNING, D.W. Invasive aspergillosis. **Clin. Infect. Dis.**, v.26, p.781-805, 1998.

DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. Human fusariosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.67, 2004.

DOMPMARTIN, D.; DOMPMARTIN, A.; DELUOL, A.M.; GROSSHANS, E.; COULAUD, J.P. Onychomycosis and AIDS: clinical and laboratory findings in 62 patients. **Int. J. Dermatol.**, v.29, n.5, p.337-339, 1990.

DORKO, E.; BARANOVA, Z.; JENCA, A.; KIZEK, P.; PILIPCINEC, E.; TKACIKOVA, L. Diabetes mellitus and candidiasis. **Folia Microbiol** (Praha), v.50, n.3, p.255-261, 2005.

DORKO, E.; PILIPCINEC, E.; TKACIKOVA, L. Fungal diseases of the respiratory tract. **Folia Microbiol** (Praha), v.47, n.3, p.302-304, 2002.

ELEWSKI, B.E. Superficial mycosis dermatophytosis and selected dermatomycosis. In: ELEWSKI, B.E. **Topics in clinical dermatology cutaneous fungi infections**. New York, Igaku-Shoin, p.12-59, 1992.

ERBAGCI, Z. Deep dermatophytosis in association with atopy and diabetes mellitus: Majocchi's granuloma trichophyticum or dermatophytic pseudomycetoma? **Mycopathologia**, v.154, p.163-169, 2002.

EVANS, E.G. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.38, p.32-36, 1998.

FEDERICI, F. Extracellular enzymatic activities in *Aureobasidium pullulans*. **Mycologia**, v.74, p.738-743, 1982.

FISHER, D.J.; CHRISTY, C.; SPAFFORD, P. et al. Neonatal *Trichosporon beigelii* infection: report of a cluster of cases in a neonatal intensive care unit. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.12, p.149-155, 1993.

FLEMING, R.V.; WALSH, T.J.; ANAÏSSIE, E.J. Emerging and less common fungal pathogens. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.16, p.915-934, 2002.

FRADIN, C.; HUBE, B. Tissue infection and site-specific gene expression in *Candida albicans*. **Adv. Appl. Microbiol.**, v.53, p.271-290, 2003.

FRANCO, M.; LACAZ, C.S.; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, G. **Paracoccidioidomycosis**, CRC, p.410-411, 1994.

FRANCO, M.; MENDES, R.P.; MOSCARDI-BIACHI, M.; REZKALLAH-IWASSO, M.; MONTENEGRO, M.R. Paracoccidioidomycosis. **Baillière's Clin. Trop. Med. Commun. Dis.**, v.4, p.185-220, 1989.

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M.R.; MENDES, R.P.; MARQUES, S.A.; DILLON, N.L.; MOTA, N.G. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.20, p.129-132, 1987.

FROMTLING, R.A.; ABRUZZO, G.K.; GILTINAN, D.M. *Candida tropicalis* infection in normal, diabetic and neutropenic mice. **J. Clin. Microbiol.**, v.25, n.8, p.1416-1420, 1987.

GAMIS, A.S.; GUDNASON, T.; GIEBINK, G.S.; et al. Disseminated infection with *Fusarium* in recipients of bone marrow transplants. **Rev. Infect. Dis.**, v.13, p.1077-1088, 1991.

GAMS, W.; DE HOOG, G.S.; SAMSON, R.A. The hyphomycete genus *Engyodontium*, a link between *Verticillium* and *Aphanocladium*. **Persoonia**, v.12, p.135-147, 1984.

GARBINO, J.; UCKAY, I.; ROHNER, P.; LEW, D.; DELDEN, C.V. *Fusarium* peritonitis concomitant to kidney transplantation successfully managed with voriconazole: case report and review of the literature. **Transp. Intern.**, v.18, p.613, 2005.

GARCÍA, C.G.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.A.; CEBADA, F.S. *Aspergillus* endocarditis. **Echocardiography**, v.22, n.7, p.623-624, 2005.

GAUR, A.; FLYNN, P.M. Emerging fungal infections in the immunocompromised host. **Sem. Pediatr. Infect. Dis.**, v.12, n.4, p.279-287, 2001.

GEFTER, W.B.; WEINGRAD, T.R.; EPSTEIN, D.M. et al. "Semi-invasive" pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung. **Radiology**, v.140, p.313-321, 1981.

GHANNOUM, M.A. Potencial role of phospholipases in virulence and fungal pathogenicity. **Clin. Microb. Ver.**, v.13, n.1, p.122-143, 2000.

GIFFORD, A.H.T.; KLIPPENSTEIN, J.R.; MOORE, M.M. Serum stimulates growth of and proteinase secretion by *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v.70, n.1, p.19-26, 2002.

GIOVANI, E.M.; MANTESSO, A.; LODUCCA, S.V.L.; MAGALHÃES, M.H.C.G. Paracoccidioidomycosis: a case report with gingival aspects. **Oral Dis.**, v.6, p.327-329, 2000.

GIRMENIA, C.; IORI, A.P.; BOECKLIN, F. et al. *Fusarium* infections in patients with severe aplastic anemia: review and implications for management. **Haematologica**, v.84, p.114-118, 1999.

GOETTMANN-BONVALLOT, S. Clinical types of onychomycosis. **Ann. Dermatol. Venereol.**, v.130, n.12, p.1237-1243, 2003.

GOLDANI, L.Z.; COELHO, I.C.; MACHADO, A.A.; MARTINEZ, R. Paracoccidioidomycosis e AIDS. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.23, p.393, 1991.

GOLDANI, L.Z.; SUGAR, A.M. Paracoccidioidomycosis and AIDS: an overview. **Clin. Infect. Dis.**, v.21, p.1275-1281, 1995.

GREENBERG, S.R. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. **Crit. Care Clin.**, v.18, p.931-956, 2002.

GUARRO, J.; GENÉ, J. Opportunistic fusarial infections in humans. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.14, p.741-754, 1995.

GUPTA, N.; MITTAL, N.; SOOD, P.; KUMAR, S.; KAUR, R.; MATHUR, M.D. Candidemia in neonatal intensive care unit. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v.44, n.1, p.45-48, 2001.

HAAD, D.J.; PIERES, M.F.; PETRY, T.C. et al. *Paracoccidioides brasiliensis* isolated by hemoculture in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.34, p.565-567, 1992.

HAJJEH, R.A.; BLUMBERG, H.M. Bloodstream infection due to *Trichosporon beigelii* in a burn patient: case report and review of therapy. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.913-916, 1995.

HANEKE, E. Fungal infections of the nail. **Semin. Dermatol.**, v.10, n.1, p.41-53, 1991.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p.597-607, 1975.

HANSSON, C.; ROSEN, K.; BRAIDE, I. *Fusarium* infection with unusual skin lesions in a patient with acute lymphocytic leukemia. **Dermatology**, v.191, p.333-335, 1995.

HAUPT, H.M.; MERZ, W.G.; BESCHORNER, W.E. et al. Colonization and infection with *Trichosporon* species in the immunosuppressed host. **J. Infect. Dis.**, v.147, p.199-203, 1983.

HAWKINS, J.L.; BADDOUR, L.M. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, n.2, p.14-18, 2003.

HENNEQUIN, C.; LAVARDE, V.; POIROT, J.L. et al. Invasive *Fusarium* infections: a retrospective survey of 31 cases. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.35, p.107-141, 1997.

HERBRECHT, R.; KOENIG, H.; WALLER, J.; LIU, K.L.; GUEHO, E. *Trichosporon* infections: clinical manifestations and treatment. **J. Mycol. Med.**, v. 3, p.129-136, 1993.

HORAN, T.C.; WHITE, J.W.; JARVIS, W.R. et al. Nosocomial infection surveillance. **MMWR**, v.35, p.17-29, 1984.

HORI, M.; KAMI, Y.; KISHI, U.; MACHIDA, T.M.; KASHIMA, T. Clinical significance of extra-pulmonary involvement of invasive aspergillosis: a retrospective autopsy-based study of 107 patients. **J. Hospital Infect.**, v.50, n.3, p.175-182, 2002.

HORRÉ, R.; SCHUMACHER, G.; ALPERS, K.; SEITZ, H.M.; ADLER, S.; LEMMER, K.; DE HOOG, G.S.; SCHAAL, K.P.; TINTELNOT, K. A case of imported paracoccidioidomycosis in a german legionnaire. **Med. Mycol.**, v.40, p.213-216, 2002.

HUHN, F.O. Bericht über eine fadenpilz-granulomatose der mamma als differential-diagnostischer beitrag zum bild eines inflamatorischen karzinoms. **Geburtsh and Frauenheilk**, v.37, p.692-697, 1977.

IBANEZ, R.; SERRANO-HERANZ, R. Pancreatic infection with *Candida parapsilosis*. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.31, n.4, p.415-416, 1999.

JANSEN, E.F.; HIRSCHMANN, D.J. Subtilin-an antibacterial product of *Bacillus subtilis* culturing conditions and properties. **Arch. Biochem.**, v.4, p.297, 1944.

JENSEN, T.G.; GAHRN-HANSEN, B.; ARENDRUP, M.; BRUUN, B. *Fusarium* fungaemia in immunocompromised patients. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, p.499-501, 2004.

JINDAL, S.K.; GUPTA, D.; AGGARWAL, A.N.; CHAKRABARTI, A. The spectrum of respiratory mycosis in a referral hospital in north-western India. **Indian J. Chest. Dis. Allied Sci.**, v.42, n.4, p.289-292, 2000.

JOHNSON, E.A.; BURDON, K.L. **J. Bact.**, v.51, p.591, 1946.

JORGE, A.O.C.; TOTTI, M.A.G.; ALMEIDA, O.P.; SCULLY, C. Oral candidiasis established in the sialoadenectomised rat. **J. Oral Path. Med.**, v.22, p.54-56, 1993.

KANNAN, P.; JANAKI, C.; SELVI, G.S. Prevalence of dermatophytes and other fungal agents isolated from clinical samples. **Indian J. Med. Microbiol.**, v.24, n.3, 212-215, 2006.

KATAOKA-NISHIMURA, S.; AKIYAMA, H.; SAKU, K. et al. Invasive infection due to *Trichosporon cutaneum* in patients with hematologic malignancies. **Cancer**, v.82, p.484-487, 1998.

KHAN, Z.U.; KORTOM, M.; MAROUF, R.; CHANDY, R.; RINALDI, M.G.; SUTTON, D.A. Bilateral pulmonary aspergilloma caused by an atypical isolate of *Aspergillus terreus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.5, p.2010-2014, 2000.

KLICH, M.A.; LAX, A.R.; BLAND, J.M. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by inturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. **Mycopathologia**, v.116, p.77- 80, 1991.

KONTOYIANNIS, D.P.; TORRES, H.A.; CHAGUA, M. et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.36, p.564-569, 2004.

KOTHARY, M.H.; CHASE, T.J.; MACMILLAN, J.D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. **Infect. Immun.**, v.43, p.320-325, 1984.

KOVACICOVA, G.; HANZEN, J.; PISARCIKOVA, M.; SEJNOVA, D.; HORN, J.; BABELA, R.; SVETLANSKY, I.; LOVAZNOVA, M.; GOGOVA, M.; KREMERY, V. Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida* spp. in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. **J. Infect. Chemother.**, v.7, n.1, p.45-48, 2001.

KREGER-VAN RIJ, N.J.W. **The Yeasts: a Taxonomic Study**, 3^a ed., Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984.

KREMERY, V.; JESENSKA, Z.; SPANIK, S.; GYARFAS, J.; NOGOVA, J.; BOTEK, R.; MARDIAK, J.; SUFLIARSKY, J.; SISOLAKOVA, J.; VANICKOVA, M.; KUNOVA, A.; STUDENA, M.; TRUPL, J. Fungaemia due to *Fusarium* spp. in cancer patients. **J. Hosp. Infect.**, v.36, n.3, p.223-228, 1997.

KURIYAMA, T.; WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A. *In vitro* secreted aspartyl proteinase activity of *Candida albicans* isolated from oral diseases and healthy oral cavities. **Oral Microbiol. Immunol.**, v.18, n.6, p.405-407, 2003.

KURNATOWSKA, I.; CHRZANOWSKI, W.; KACPRZYK, F.; KURNATOWSKA, A. Multifocal fungal infections in patients after renal transplantation undergoing immunosuppression. **Pol. Merkuriusz Lek.**, v.15, n.88, p.388-390, 2003.

KWON, K.S.; JANG, H.S.; SON, H.S.; OH, C.K.; KWON, Y.W.; KIM, K.H.; SUH, S.B. Widespread and invasive *Trichophyton rubrum* infection mimicking Kaposi's sarcoma in a patient with AIDS. **J. Dermatol.**, v.31, n.10, p.839-843, 2004.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNET, J.E. **Medical Mycology**, USA, Lea and Febriger, 1992.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**, 9^a ed., São Paulo, Sarvier, 2002.

LACOMBE, K.; GIRARD, P.M. A 2004 update on treatment and prophylaxis of opportunistic infections in the course of HIV disease. Part 1: Pneumocystosis and protozoiasis. **Med. Mal. Infect.**, v.34, n.6, p.239-245, 2004.

LANDY, M.; WARREN, G.H.; ROSENMAN, S.R.; COLIO, L.G. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.**, v.67, p.539-541, 1948.

LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, n.2, p.310-350, 1999.

LATOUD, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G.; GENET, R.; MORGAT, J.L. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v.856, p.526-535, 1986.

LEGOUT, L.; ASSAL, M.; ROHNER, P.; LEW, D.; BERNARD, L.; HOFFMEYER, P. Successful treatment of *Candida parapsilosis* (fluconazole-resistant) osteomyelitis with caspofungin in a HIV patient. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.38, n.8, p.728-730, 2006.

LIMA, M.A.; VERGARA, M.L.S.; DEMACHKI, S.; SANTOS, J.A.M. Paracoccidioidomicose em paciente com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana: relato de necrópsia. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.28, p.279-284, 1995.

LIMBER, D.B. A new form genus of the Moniliaceae. **Mycologia**, v.32, p.23-30, 1940.

LOPES, A.J.; JANSEN, U.; CAPONE, D.; JANSEN, J.M. Aspergiloses pulmonares. **Pulmão**, v.13, n.1, p.257-267, 2004.

LUMBRERAS, C.; GAVALDÀ, J. Aspergilosis invasora: manifestaciones clínicas y tratamiento. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.20, p.79-89, 2003.

MACHADO, A.P.; HIRATA, S.H.; OGAWA, M.M.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; FISCHMAN, O. Dermatophytosis on the eyelid caused by *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v.48, p.73-75, 2005.

MACIAS, P.; PECES, E.C.; ZAMBRANO, C.D.; TORRADO, C.; JIMENEZ, V. Four patients with mucormycosis in a postoperative recovery unit. **Rev. Anesthesiol. Reanim.**, v.51, n.7, p.385-389, 2004.

MAESAKI, S.; KOHNO, S.; TANAKA, K.; MITSUTAKE, K.; MATSUDA, H.; YOSHITOMI, Y.; YASUOKA, A.; KAKU, M.; KOGA, H.; HARA, K. Incidence of fungal isolation in clinical specimens from the respiratory tract. **Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi**, v.31, n.2, p.154-161, 1993.

MANSOORY, D.; ROOZBAHANY, N.A.; MAZINANY, H.; SAMIMAGAM, A. Chronic *Fusarium* infection in an adult patient with undiagnosed chronic granulomatous disease. **Clin. Infect. Dis.**, v.37, p.107-108, 2003.

MARQUES, S.A.; CONTERNO, L.O.; SGARBI, L.P.; VILLAGRA, A.M.; SABONGI, V.P.; BAGATIN, E.; GONÇALVES, V.L. Paracoccidioidomycosis associated with acquired immunodeficiency syndrome: Report of seven cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.37, n.3, p.261-265, 1995.

MARTINO, P.; GASTALDI, R.; RACCAH, R.; GIRMENIA, C. Clinical patterns of *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Journal of Infection**, v.28, p.7-15, 1994.

MATSUO, A.L.; TERSARIOL, I.I.L.; KOBATA, S.I.; TRAVASSOS, L.R.; CARMONA, A.K.; PUCCIA, R. Modulation of the exocellular serine-thiol proteinase activity of *Paracoccidioides brasiliensis* by neutral polysaccharides. **Microbes and Infection**, 2005, *in press*.

MAYSER, P.; LAABS, S.; HENER, K.; GRÜNDER, K. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologia**, v.135, p.149-155, 1996.

MCDONNELL; P.J.; WERBLIN, T.P.; SIGLER, L.; GREEN, W.R. Mycotic keratitis due to *Beauveria alba*. **Cornea**, v.3, p.213-216, 1984.

MENDES-GIANINI, M.J.S.; MORAES, R.A.; RICCI, T.A. Proteolytic activity of the 43.000 molecular weight antigen secreted by *Paracoccidioides brasiliensis*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.32, p.384-385, 1990.

MERZ, W.G.; KARP, J.E.; HOAGLAND, M.; JETT-GOHEEN, M.; JUNKINS, J.M.; HOOD, A.F. Diagnosis and successful treatment of fusariosis in the compromised host. **J. Infect. Dis.**, v.158, p.1046-1055, 1988.

MIDGLEY, G.; CLAYTON, Y.M.; HAY, R.J. **Diagnóstico em cores: micologia médica**. 1ª ed., São Paulo: Manole, 1998. 155p.

MILLER, W.T. Aspergillosis: a disease with many faces. **Sem. Roentgenol.**, v.31, p.52-66, 1996.

MIRANDA, M.F.; DE BRITO, A.C.; ZAITZ, C.; DE CARVALHO, T.N.; CARNEIRO, F.R. *Microsporum gypseum* infection showing a white-paint dot appearance. **Int. J. Dermatol.**, v.37, p.956-957, 1998.

MONOD, M.; FATIH, A.; JATON-OGAY, K.; PARIS, S.; LATGÉ, J.P. The secreted proteases of pathogenic species of *Aspergillus* and their possible role in virulence. **Can. J. Bot.**, v.73, p.1081-1086, 1995.

MORGANTI, L.; DELOGU, G.; TAMPIERI, M.P.; GRISTINA, G.R.; DOMINICI, R.; DE RITIS, G. Spread of opportunistic fungi at a critical care unit: a study of 55 patients. **Acta Anaesthesiol. Ital.**, v.33, p.605-610, 1982.

MORIMOTO, S.; SHIMAZAKI, C.; GOTO, H.; HIRATA, Y.; TATSUMI, T.; YAMAGATA, N.; HIRATA, T.; ASHIHARA, E.; INABA, T.; FUJITA, N.; NAKAGAWA, M. *Trichosporon cutaneum* fungemia in patients with acute myeloblastic leukemia and measurement of serum D-arabinitol, *Candida* antigen (CAND-TEC), and β -D-glucan. **Ann. Hematol.** v.68, n.3, p.159-161, 1994.

MORSE, S.S. Factors in the emergence of infectious diseases. **Emerg. Infect. Dis.**, v.1, p.7-15, 1995.

MUHSIN, T.M.; AUBAID, A.H.; AL-DUBOON, A.H. Extracellular enzymes activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v.40, n.11, p.465-469, 1997.

MUTTON, K.J.; LUCAS, T.J.; HARKNESS, J.L. Disseminated *Fusarium* infection. **Med. J.**, v.2, p.624-625, 1980.

MYLONAKIS, E.; BARLAM, T.F.; FLANIGAN, T. et al. Pulmonary aspergillosis and invasive disease in AIDS: review of 342 cases. **Chest**, v.114, p.251-262, 1998.

NADLER, J. Disseminated fusarial infection. **Rev. Infect. Dis.**, v.12, p.162, 1990.

NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O.; HUBE, B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell. Microbiol.*, v.6, p.915-926, 2004.

NEDER, R.N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**, São Paulo: Nobel, 1992.

NELSON, P.E.; DIGNANI, M.C.; ANAISSIE, E.J. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.7, n.4, p.479-504, 1994.

NIGAM, S.; GHOSH, P.C.; SARMA, P.U. A new glycoprotein allergen/antigen with the protease activity from *Aspergillus fumigatus*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.132, n.2, p.124-131, 2003.

NIR-PAZ, R.; ELINAV, H.; PIERARD, G.E.; WALKER, D.; MALY, A.; SHAPIRO, M.; BARTON, R.C.; POLACHEK, I. Deep infection by *Trichophyton rubrum* in an immunocompromised patient. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.11, p.5298-5301, 2003.

NOVICK, N.L.; TAPIA, L.; BOTTONE, E.J. Invasive *Trichophyton rubrum* infection in an immunocompromised host: case report and review of the literature. **Am. J. Med.**, v.82, p.321-325, 1987.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised host: implications for diagnosis and management. **Clin. Infect. Dis.**, v.35, p.909-920, 2002.

NUCCI, M.; MARR, K.A. Emerging fungal diseases. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, p.521-526, 2005.

ODDS, F.C. *Candida* infections in AIDS patients. **Int. J. Std. AIDS**, v.3, n.3, p.157-160, 1992.

OLIVEIRA, J.M.; NUNES, C.P.; OLIVEIRA, P.C. Aspergilose. In: SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A.P.; SANTOS, S.S.; ALMEIDA, L.C.; FIGUEIREDO, C.E.S.; PACHECO, S.J.B. **Manual de infectologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. p.461-464.

ORTIN, X.; ESCODA, L.; LLORENTE, A. *Cunninghamella bertholletiae* infection (mucormycosis) in a patient with acute T-cell lymphoblastic leukemia. **Leuk. Lymphoma**, v.45, n.3, p.617-620, 2004.

PATTERSON, T.F.; RITTER, J.; SELLESLAG, D.; SHAH, P.M.; STEVENS, D.A.; WALSH, T.J. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. **CID**, v.34, n.1, 2002.

PAUGAM, A.; BAIXENCH, M.T.; FRANK, N.; BOSSI, P.; DE PINIEUX, G.; TOURTESCHAEFER, C.; DUPOUY-CARNET, J. Localized oral *Fusarium* infection in an AIDS patient with malignant lymphoma. **Journal of Infection**, v.39, n.2, p.153-154, 1999.

PEDRO, R.J.; AOKI, F.H.; BOCCATO, R.S.; BRANCHINI, M.L.; GONÇALVES, F.L.J.; PAPAIRORDANOU, P.M.; RAMOS, M.C. Paracoccidioidomicose e infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.31, p.119-125, 1989.

PEI-LUN SUN; HSIN-TSUNG HO. Concentric rings: an unusual presentation of tinea corporis caused by *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v.49, n.2, p.150-151, 2006.

PETIT, A; TABONE, M.D; MOISSENET, D.; AUVRIGNON, A.; LANDMAN-PARKER, J.; BOCCON-GIBOD, L; LEVERGER, G. Disseminated *Fusarium* infection in two neutropenic children. **Archives de pédiatrie**, v.12, p.1116-1119, 2005.

PEYPOUX, F.; GUINAND, M.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. ; DAS, B.C. ; VARENNE, P. ; LEDERER, E. Isolement de l'acid 3-amino, 12-méthyl tétradécanoïque et de l'acide 3-amino, 12-méthyl tridécanoïque á partir de l'iturine, antibiotique de *Bacillus subtilis*. **Tetrahedron**, v.29, p.3455-3459, 1973.

PEYPOUX, F.; GUINAND, M.; MICHEL, G.; DELCAMBE, L. ; DAS, B.C. ; VARENNE, P. ; LEDERER, E. Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, v.17, n.19, p.3992-3996, 1978.

PIERROTTI, L.; BADDOUR, L. Fungal endocarditis: 1995-2000. **Chest**, v.122, p.302-310, 2002.

PINHEIRO, S.R.A.A.; ORÉFICE, F.; MASON, E.M. Blastomicose sulamericana: descrição de um caso com lesões cutâneas, nasais e envolvimento do trato uveal posterior. **Arq. Bras. Oftal.**, v.50, p.66-69, 1987.

PORRO, A.M.; YOSHIOKA, M.C.; KAMINSKI, S.K.; PALMEIRA, M.C.; FISCHMAN, O.; ALCHORNE, M.M. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Mycopathologia**, v.137, p.9-12, 1997.

PORTER, S.R.; LUKER, J.; SCULLY, C.; KUMAR, N. Oral lesions in UK patients with or liable to HIV disease - ten years experience. **Med. Oral**, v. 4, p.455-469, 1999.

PUCCIA, R.; CARMONA, A.K.; GESZTESI, J.L.; JULIANO, L.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. **Med. Mycol.**, v.36, p.345-348, 1998.

RABODONIRINA, M.; PIENS, M.A.; MONIER, M.F. et al. *Fusarium* infections in immunocompromised patients: case reports and literature review. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.13, p.152-161, 1994.

RANDHAWA, H.S. Respiratory and systemic mycosis: an overview. **Indian J. Chest. Dis. Allied Sci.**, v.42, n.4, p.207-219, 2000.

RAUBITSCHKE, F.; DOSTROVSKY, A. An antibiotic active against dermatophytes derived from *Bacillus subtilis*. **Dermatologica**, v.100, p.45-49, 1950.

RESTREPO, A.; MCEWEN, J.G.; CASTANEDA, E. The habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*: how far from solving the riddle? **Med. Mycol.**, v.39, p.233-241, 2001.

RICHARDSON, M.D.; JOHNSON, E.M. **Opportunistic fungal infections**. Blackwell Science, 2000

RIPPON, J.W. **Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and The Pathogenic Actinomycetes**, 2^a ed, Canadá, 1982. 842p.

ROILIDES, E.; FARMAKI, E.; EVDORIDOU, J.; DOTIS, J.; HATZIOANNIDIS, E.; TSIVITANIDOU, M.; BIBASHI, E.; FILIOTI, I.; SOFIANOU, D.; GIL-LAMAINIERE, C.; MUELLER, F.M.; KREMENOPOULOS, G. Neonatal candidiasis: analysis of epidemiology, drug susceptibility and molecular typing of causative isolates. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, n.10, p.745-750, 2004.

ROSE, A.H.; HARRISON, J.S. **The Yeasts**. 2^a ed. USA: Academic Press, 1987. 423p.

RUCHEL, R.; BONING, B.; BORG, M. Characterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of enzyme during infection *in vitro*. **Infect. Immun.**, v.56, p.411-419, 1986.

RUETER, F.; HIRSCH, H.; KUNZ, F. et al. Late *Aspergillus fumigatus* endomyocarditis with brain abscess as a letal complication after Herat transplantation. **J. Herat Luna Transplant.**, v.21, p.1242-1245, 2002.

SABALLS, P.; TORRES-RODRÍGUEZ, J.M.; SALVADO, M. et al. La candidemia en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida: estudio retrospectivo de nueve casos. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.17, p. 2-5, 2000.

SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A.; STEVENS, D.A. Inhibition by sterols of conidium-to-yeast conversion in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Infect. Immun.**, v.56, p.711-713, 1988.

SAMAL, B.B.; KARAN, B.; PARKER, C.; STABINSKY, Y. Isolation and thermal stability studies of two novel serine proteinases from the fungus *Tritirachium album* Limber. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 13, n.1, p. 66-70, 1991.

SAMPATHKUMAR, P.; PAYA, C.V. *Fusarium* infection after solid-organ transplantation. **Clin. Infect. Dis.**, v.32, p.1237-1240, 2001.

SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.**, v.40, p.225-242, 2002.

SANTOS, J.W.A.; COSTA, J.M.; CECHELLA, M.; MICHEL, G.T.; FIGUEIREDO, C.W.C.; LONDERO, A.T. An unusual presentation of paracoccidioidomycosis in an AIDS patient: a case report. **Mycopathologia**, v.142, p.139-142, 1998.

SCHALLER, M.; MAILHAMMER, R.; GRASSI, G.; SANDER, C.A.; HUBE, B.; KORTING, H.C. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. **J. Investig. Dermatol.**, v.118, p.652-657, 2005.

SCULLY, C.; EL-KABIR, M.; SAMARANAYAKE, L.P. *Candida* and oral candidosis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v.5, p.124-158, 1994.

SCULLY, C.; MONTEIL, R.; SPOSTO, M.R. Infectious and tropical diseases affecting the human mouth. **Periodontol.**, v.18, p. 47-70, 2000.

SEELIGER, H.P.R. Infections of man by opportunistic molds- their identification and nomenclature of their diseases. **Mykosen**, v.26, n.12, p.587-598, 1983.

SENTAMILSELVI, G.; JANAKI, C.; KAMALAM, A.; THAMBIAH, A.S. Deep dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum* – a case report. **Mycopathologia**, v.142, p.9-11, 1998.

SHADZI, S.; CHADEGANIPOUR, M. Isolation of opportunistic fungi from bronchoalveolar lavage of compromised hosts in Isfahan, Iran. **Mycopathologia**, v.133, p.79-83, 1996.

SHETTY, S.S.; HARRISON, L.H.; HAJJEH, R.A.; TAYLOR, T.; MIRZA, S.A.; SCHMIDT, A.B. SANZA, L.T.; SHUTT, K.A. ; FRIDKIN, S.K. Determining risk factors for candidemia among newborn infants from population-based surveillance: Baltimore, Maryland, 1998-2000. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v.24, n.7, p.601-604, 2005.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 388p.

SILVA, M.R.B.M.; MENDES, R.P.; LASTÓRIA, J.C.; BARRAVIERA, B.; MARQUES, S.A.; KAMEGASAWA, A. Paracoccidioidomycosis: study of six cases with ocular involvement. **Mycopathologia**, v.102, p.87-96, 1988.

SIMONOVICOVA, A.; GÓDYOVÁ, M.; KUNERT, J. *Engyodontium album*, a new species of microscopic fungi for Slovakia and its keratinolytic activity. **Biologia Bratislava**, v.59, n.1, p.17-18, 2004.

SIMPANYA, M.F.; BAXTER, M. Multiple proteinases from two *Microsporum* species. **J. Med. Veter. Mycol.**, v.34, p.31-36, 1996.

SINGH, C.J. Characterization of an extracellular keratinase of *Trichophyton simii* and its role in keratin degradation. **Mycopathologia**, v.137, p.13-16, 1997.

SQUEO, R.F.; BEER, R.; SILVERS, D.; WEITZMAN, I. et al. Invasive *Trichophyton rubrum* resembling blastomycosis infection in the immunocompromised host. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.39, p. 379-380, 1998.

STEFANINI, M.; ALLEGRA, S. Pulmonary mucormycosis in acute histiocytic leukemia. **N. Engl. J. Med.**, v.256, p.1026-1030, 1957.

STEPHENS-ROMERO, S.D.; MEDNICK, A.J.; FELDMESSER, M. The pathogenesis of fatal outcome in murine pulmonary aspergillosis depends on the neutrophil depletion strategy. **Infect. Immun.**, v.73, n.1, p.114-125, 2005.

SUMMERBELL, R.C. Epidemiology and ecology of onychomycosis. **Dermatology**, v.194, n.1, p.32-36, 1997.

TASHIRO, T.; NAGAI, H.; KAMBERI, P. et al. Disseminated *Trichosporon beigelii* infection in patients with malignant diseases: immunohistochemical study and review. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.13, p.218-224, 1994.

THIMON, L.; PEYPOUX, F.; WALLACH, J.; MICHEL, M.G. Biosurfactants: properties and applications. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.128, p.101, 1995.

TOTTI, M.A.G.; JORGE, A.O.C.; SANTOS, E.B.; ALMEIDA, O.P.; SCULLY, C. Implantation of *Candida albicans* and other *Candida* species in the oral cavity of rats. **J. Oral Path. Med.**, v.25, p.308-310, 1996.

TRIGIANO, R.N.; FERGUS, C.L. Extracellular enzymes of some fungi associated with mushroom culture. **Mycologia**, v.71, p.908-917, 1979.

TSANG, P.C.; SAMARANAYAKE, L.P.; PHILIPSEN, H.P.; MCCULLOUGH; REICHART, P.A.; SCHMIDT-WESTHAUSEN, A.; SCULLY, C.; PORTER, S.R. Biotypes of oral *Candida albicans* isolates in human immunodeficiency virus-infected patients from diverse geographic locations. **J. Oral Pathol. Med.**, v.24, p.32-36, 1995.

VAZ, C.A.C.; MACKENZIE, D.W.R.; CAMARGO, Z.P.; SINGER-VERMES, L.M.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G.; Gelatinase activity of exoantigens from virulente and non-virulente isolates of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med. Vet. Mycol.**, v.33, p.27-31, 1994.

VAZQUEZ, J.A.; LUNDSTROM, T.; DEMBRY, L.; CHANDRASEKAR, P.; BOIKOV, D.; PARRI, M.B.; ZERVOS, M.J. Invasive *Candida guilliermondii* infection: in vitro susceptibility studies and molecular analysis. **Bone Marrow Transplant**, v.16, n.6, p.849-853, 1995.

VERGHESE, S.; MARIA, C.F.; MULLASERI, A.S.; ASHA, M.; PADMAJA, P.; PADHYE, A.A. *Aspergillus* endocarditis presenting as femoral artery embolism. **Mycoses**, v.47, p.252-256, 2004.

VUILLEMIM, P. *Beauveria*, nouveau genera de Verticillacees. **Bull. Soc. Bot. Fr.**, v.59, p.34-40, 1912.

WALSH, T.J. Trichosporonosis. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v.3, p.43-52, 1989.

WALSH, T.J.; NEWMAN, K.R.; MOODY, M.; WHARTON, R.C.; WADE, J.C. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. **Medicine** (Baltimore), v.65, p.268-279, 1986.

WALSH, T.J.; BULKLEY, B.H. *Aspergillus* pericarditis: clinical and pathological features in the immunocompromised patient. **Cancer**, v.49, p.48-54, 1982.

WALTON, R.B.; WOODRUFF, H.B. A crystalline antifungal agent, mycosubtilin, isolated from subtilin broth. **J. Clin. Invest.**, v.28, p. 924-926, 1949.

WARREN, G.H.; ROSENMAN, S.H.; COLIO, M. **Proc Soc Exp Biol & Med**, v.67, p.539, 1948.

WEIG, M.; REICHARD, U.; GROB, U. *Aspergillus fumigatus*-virulence and opportunism?. **Mycoses**, v.44, p.351-355, 2001.

WU, T.; SARAMANAYAKE, L.P. The expression of secreted aspartyl proteinases of *Candida* species in human whole saliva. **J. Med. Microbiol.**, v.8, p.711-720, 1999.

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, A.S.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, U.M. **Compêndio de Micologia Médica**. 1^a ed, Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

3 UM CASO INCOMUM DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL

Artigo publicado:

**BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
São Paulo/Brasil**

UM CASO INCOMUM DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹; *Rejane Pereira Neves¹; Oliane Maria Correia
Magalhães¹; Armando Marsden¹

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Correspondência

Rua José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482 E-mail: rejadel@yahoo.com.br

UM CASO INCOMUM DE PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO BRASIL

RESUMO

Este trabalho relata um caso incomum de paracoccidiodomicose com ulcerações na cabeça e nariz em homem brasileiro. Para o diagnóstico, realizou-se exame direto de secreção de úlcera e amostras de pele com hidróxido de potássio. O isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* ocorreu a 28°C e 37°C em Sabouraud ágar com cloranfenicol. O diagnóstico foi estabelecido pela presença de células leveduriformes isoladas e com brotações múltiplas e o crescimento típico do fungo *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidiodomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, lesão incomum em cabeça.

AN UNUSUAL CASE OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN BRAZIL

ABSTRACT

This paper reports an unusual case of paracoccidioidomycosis with ulcerations in the head and nose in a Brazilian man. For diagnosis, direct examination of ulcer secretion and skin samples was performed with potassium hydroxide. The isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* occurred at 28°C and 37°C on Sabouraud agar with chloranphenicol. Diagnosis was established by the presence of isolated and multiple budding yeast-like cells and typical fungus growth of *P. brasiliensis*.

Key words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, unusual head lesion.

Paracoccidioidomicose é uma das micoses sistêmicas mais importantes que afeta habitantes das regiões tropicais e subtropicais da América Latina (3, 5). O agente etiológico é o fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, o qual ocorre na forma filamentosa na natureza e a doença parece ser adquirida através da inalação dos propágulos produzidos nesta fase. A maneira mais comum de penetração no corpo humano é através dos pulmões, com posterior disseminação linfo-hematogênica para outros órgãos, pele ou mucosas: bucal, faríngea, intestinal e, raramente, através da inoculação na pele (2). Manifestações clínicas são refletidas de diversas formas, variando de lesões pulmonares assintomáticas a infecções sistêmicas generalizadas (1, 7, 8, 11).

Apresentamos um caso incomum de paracoccidioidomicose diagnosticado no Brasil. Em Junho de 2005, um homem de 47 anos de idade chegou ao setor de Pneumologia do Hospital Otávio Freitas em Recife, estado de Pernambuco, no nordeste do Brasil, com suspeita de tuberculose e história de suores e ulcerações no nariz e cabeça (Fig. 1). O paciente trabalhou como operador de máquinas por muitos anos. Vários meses antes havia apresentado bronquite crônica e episódios de febre. Um raio-X de tórax revelou infiltrados pulmonares bilaterais e difusos. As lesões de pele eram dolorosas e o paciente estava debilitado fisicamente e psicologicamente, e os sintomas clínicos incluíram suores noturnos ocasionais. Nenhum bacilo álcool ácido-resistente ou células malignas foram detectados durante os exames.

Amostras clínicas foram processadas no Laboratório de Micologia Médica, Universidade Federal de Pernambuco. O exame direto foi realizado após clarificação dos fragmentos das amostras com solução a 20% de hidróxido de potássio. Para o isolamento, as amostras foram inoculadas na superfície do meio ágar Sabouraud acrescido de 50mg de cloranfenicol/L e incubadas a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e a 37°C durante 20 dias. A identificação foi realizada de acordo com Lacaz et al. (6).

O exame da secreção de úlcera e das amostras de pele indicou a presença de brotações múltiplas as quais são critérios diagnósticos para paracoccidioidomicose (Fig. 2). As culturas incubadas a 37°C eram de coloração creme, com aspecto semelhante a levedura e as células apresentavam parede dupla, birrefringente com brotações múltiplas de *P. brasiliensis*. Um fungo com hifas aéreas curtas pôde ser observado a temperatura ambiente. Os médicos prescreveram terapia com cetoconazol (200mg/dia). Após três semanas as lesões e os infiltrados pulmonares tinham desaparecido quase completamente e o paciente recebeu alta, porém o tratamento foi continuado por mais cinco meses.

Lesões circunscritas aos pulmões são vistas em 20-40% dos pacientes adultos (9); embora aspectos incomuns ou atípicos da doença possam ser observados. Lesões pulmonares e de pele têm sido comumente suspeitas para tuberculose, e o diagnóstico tem sido alcançado tardiamente (10). Os sintomas respiratórios podem ser não específicos como ocorreu com nosso paciente. A forma crônica multifocal é frequentemente caracterizada pelo envolvimento pulmonar e lesões mucocutâneas, predominantemente nas cavidades oral e nasal (5) diferindo de nossos achados para lesão profunda na cabeça. De acordo com Elias et al. (4) o envolvimento do sistema nervoso central na paracoccidioidomicose é mais elevado que pensado previamente.

Embora lesões ulcerativas na cabeça sejam raras, este diagnóstico deveria ser considerado como um importante sinal desta micose. Pacientes com diagnóstico precoce apresentam prognóstico favorável com tratamento clínico ou cirúrgico.

REFERÊNCIAS

1. Brummer, E.; Castaneda, E.; Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 89-117.
2. Burnier, S.V.; Sant'Anna, A.E. (1997). Palpebral paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 140, 29-33.

3. Cadavid, D.; Restrepo, A. (1993). Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. *Epidemiol. Infect.* 111, 121-133.
4. Elias, J.J.; Santos, A.C.; Carlotti, C.G.; Colli, B.O.; Canheu, A.; Matias, C.; Furlanetti, L.; Martinez, R.; Takayanagui, O.M.; Sakamoto, A.C.; Serafini, L.N.; Chimelli, L. (2005). Central nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment. *Surgical Neurology* 63, 13-21.
5. Horré, R.; Schumacher, G.; Alpers, K.; Seitz, H.M.; Adler, S.; Lemmer, K.; Hoog, G.S. de; Schaal, K.P.; Tintelnot, K. (2002). A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. *Med. Mycol.* 40 (2), 213-216.
6. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. (1998). Guia para Identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. Sarvier, São Paulo, SP.
7. Puccia, R.; Carmona, A.K.; Gesztesi, J.L.; Juliano, L.; Travassos, L.R. (1998). Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med. Mycol.* 36, 345-348.
8. San-Blas, G.; Nino-Veja, G.; Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.* 40, 225-242.
9. Santos, J.W.A.; Severo, L.C.; Porto, N.S. (1998). Fine needle aspiration in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia* 143, 65-69.
10. Silletti, R.P.; Glezerov, V.; Schwartz, I.S. (1996). Pulmonary paracoccidioidomycosis misdiagnosed as *Pneumocystis* pneumonia in a immunocompromised host. *J. Clin. Microbiol.* 34 (9), 2328-2330.

11. Wanke, B.; Londero, A.T. (1994). Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. *In*: Franco, M.; Da Silva-Lacaz, C.; Restrepo, M.A.; Del Negro, G. (eds). *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla, p.109-120.

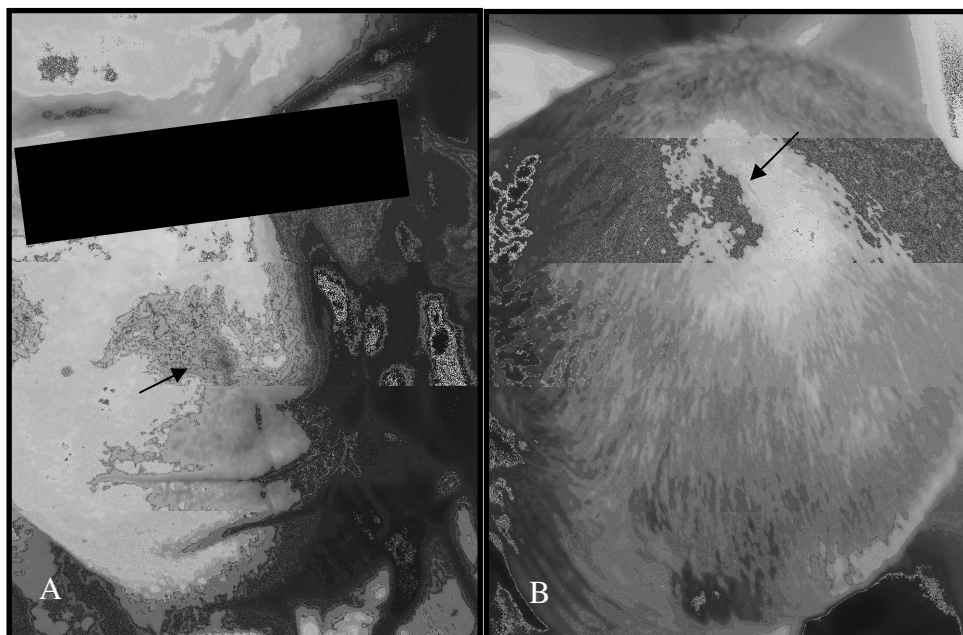


Figura 1. A) Lesão no nariz e B) lesão granulomatosa da cabeça causada por *Paracoccidioides brasiliensis*.



Figura 2. Forma leveduriforme vista ao exame direto. Note as formas “tipo Mickey Mouse”, “roda de leme” e catenulada de *Paracoccidioides brasiliensis*.

4 FUNGEMIA POR *ENGYODONTIUM ALBUM*: PRIMEIRO CASO REPORTADO

Artigo publicado:

**BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY
JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY
São Paulo/Brasil**

FUNGEMIA POR *ENGYODONTIUM ALBUM*: PRIMEIRO CASO REPORTADO

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, Rejane Pereira Neves*, Cristina Maria de Souza-Motta,

Oliane M. Correia Magalhães

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Apoio financeiro: Capes

* Autor correspondente: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

FUNGEMIA POR *ENGYODONTIUM ALBUM*: PRIMEIRO CASO REPORTADO**RESUMO**

Micoses oportunistas têm sido progressivamente observadas entre pacientes imunocomprometidos. O presente trabalho descreve um caso no qual *Engyodontium album* foi obtido do sangue de um paciente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. *E. album* cresceu a 37°C e exibiu atividade proteásica, ambos indicadores de patogenicidade. Esta é a primeira vez que este fungo foi reportado como agente de fungemia.

Palavras-chave: *Engyodontium album*; fungemia; Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

ENGYDONTIUM ALBUM* FUNGAEMIA: THE FIRST RELATED CASE*ABSTRACT**

Opportunistic mycoses have been increasingly observed among immunocompromised patients. We describe a case in which *Engyodontium album* was isolated and cultured from the blood of a patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *E. album* grew at 37°C and showed proteinase activity, both indicators of pathogenicity. This is the first time that this organism has been reported as agent of fungaemia.

Key words: *Engyodontium album*; fungaemia; Acquired Immunodeficiency Syndrome.

Micoses oportunistas têm sido observadas de forma crescente em pacientes imunocomprometidos. *Engyodontium album* é um patógeno raro, porém um habitante comum de água e material úmido e pode ser isolado de substratos tais como papel, juta, linho, paredes pintadas e do ar de casas. A dispersão é facilitada por serem os conídios secos e higrofóbicos (1).

E. album estava incluso no gênero *Beauveria* (10). Limber (7) então o incluiu em um novo gênero, *Tritirachium*; porém, desde 1972 o novo gênero *Engyodontium* foi criado, o qual possui duas espécies, *E. album* e *E. parvisporum* (3). Infecções envolvendo *E. album* incluem eczema vesiculoso (4), lesões granulomatosas na pele, abscesso cerebral (9) e ceratite (8). Em 1990, Augustinsky et al. (1) reportaram o primeiro caso de endocardite causado por *E. album*. Neste trabalho é descrito um caso de fungemia por *E. album* num paciente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e testada a patogenicidade do fungo.

O paciente, um rapaz de 18 anos com AIDS foi admitido no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil, em 2002 com severa tuberculose pulmonar. Em 2005, o paciente retornou apresentando contagem de CD₄ 25 cels/mm³, febre alta, perda de peso, tosse crônica, crescimento ganglionar e candidíase oral.

Três amostras de sangue venoso foram coletadas em dias consecutivos, assepticamente, pelo método VACUTAINER® utilizando EDTA como anticoagulante. As amostras foram processadas pelo método padrão (exame direto e isolamento em cultura) para diagnóstico micológico no Laboratório de Micologia Médica, Universidade Federal de Pernambuco.

O exame direto foi realizado com amostras de sangue a fresco (sem clarificação e coloração). Subculturas foram preparadas usando Sabouraud dextrose ágar adicionado de cloranfenicol (Difco Laboratories) e incubadas a 30°C e 35°C em atmosfera aeróbica por 15

dias. Culturas puras foram transferidas para a superfície do meio batata dextrose ágar para identificação taxonômica (5, 6).

Testes de patogenicidade preliminares foram conduzidos através da detecção de proteinase usando caseína e gelatina como substratos (6). Os fungos isolados foram inoculados nos referidos meios de cultura, incubados a temperatura ambiente e a 37°C para detecção através da formação de um halo transparente observado de 10 a 15 dias. Quando uma zona transparente ocorreu, o resultado foi considerado positivo, dependendo-se do diâmetro.

O exame direto revelou hifas septadas e hialinas. Macroscopicamente as colônias apresentaram-se flocosas, brancas, com 24 mm de diâmetro e reverso incolor. Ao exame microscópico foram observadas hifas com 1 a 2µm de largura, portando conidióforos os quais apresentavam 2 a 4µm de largura e dicotomia apical com células conidiogênicas em cachos de um a três. As células conidiogênicas consistiam de uma estrutura cilíndrica alongada com ráquides bem desenvolvidas em denticulos. Conídios hialinos, lisos e globosos (Figura 1). O fungo foi identificado como *E. album* de acordo com os critérios descritos por Hoog et al. (5). Este é o primeiro relato de caso de um paciente com AIDS com fungemia por *E. album*.

O paciente recebeu tratamento com fluconazol (200mg/dia). Após um mês foi realizada nova coleta de sangue e não houve desenvolvimento fungico em cultura após 10 dias de incubação a 30 e 35°C. O paciente foi liberado, embora o tratamento foi seguido por seis meses com bons resultados.

Os testes de patogenicidade indicaram que o agente etiológico foi capaz de produzir proteinase em ambos os substratos. Chellappan et al. (2) demonstraram que isolados de *E. album* marinhos produzem uma proteinase alcalina *in vitro*. O envolvimento de *E. album* como agente de fungemia e sua capacidade de secretar enzimas extracelulares não foram descritas até o momento na literatura. Embora haja relatos esporádicos de parasitismo *in vivo*

por este Hyphomycete (1, 4, 8, 9). Esta observação fornece evidências da natureza patogênica deste organismo.

Seeliger (9) não observou desenvolvimento de *E. album* a 37°C. Isto ocorre por serem amostras diferentes. Muitas espécies fúngicas, que não crescem a 37°C podem sobreviver em tecidos humanos por um considerável período, especialmente em pessoas sob terapia imunossupressora ou com comprometimento da defesa imune quando introduzido em ou sob a pele e tecidos profundos (1, 9).

O isolado está sendo mantido sob óleo mineral (número 6066) na Coleção de Culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Augustinsky, J.; Kammeyer, P.; Husain, A.; deHoog, G.S.; Libertin, C.R. (1990). *Engyodontium album* endocarditis. *J. Clin. Microbiol.* 28 (6), 1479-1481.
2. Chellappan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S.M.; Elyas, K.K.; Bhat, S.G.; Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry* 41, 956-961.
3. De Hoog, G.S. (1978). Notes on some fungicolous hyphomycetes and their relatives. *Persoonia* 10 (1), 33-81.
4. De Hoog, G.S. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodonium* gen. nov. *Study Mycology* 1, 1-41.
5. Hoog, G.S.; Guarro, J. (2001). *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 1126p.
6. Lacaz, C.S, Porto, E. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, 1104 p.
7. Limber; D.B. (1940). A new form genus of the Moniliaceae. *Mycologia* 32: 23-30.

8. McDonnell; P.J.; Werblin, T.P.; Sigler, L.; Green, W.R. (1984). Mycotic keratitis due to *Beauveria alba*. *Cornea* 3, 213-216.
9. Seeliger, H.P.R. (1983). Infections of man by opportunistic molds-their identification and nomenclature of their diseases. *Mykosen* 26, 587-598.
10. Vuillemin, P. (1912). *Beauveria*, nouveau genera de Verticillacees. *Bull. Soc. Bot. Fr.* 59, 34-40.
11. Weitzman, I.; Summerbell, R.C. (1995). The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 240-259.

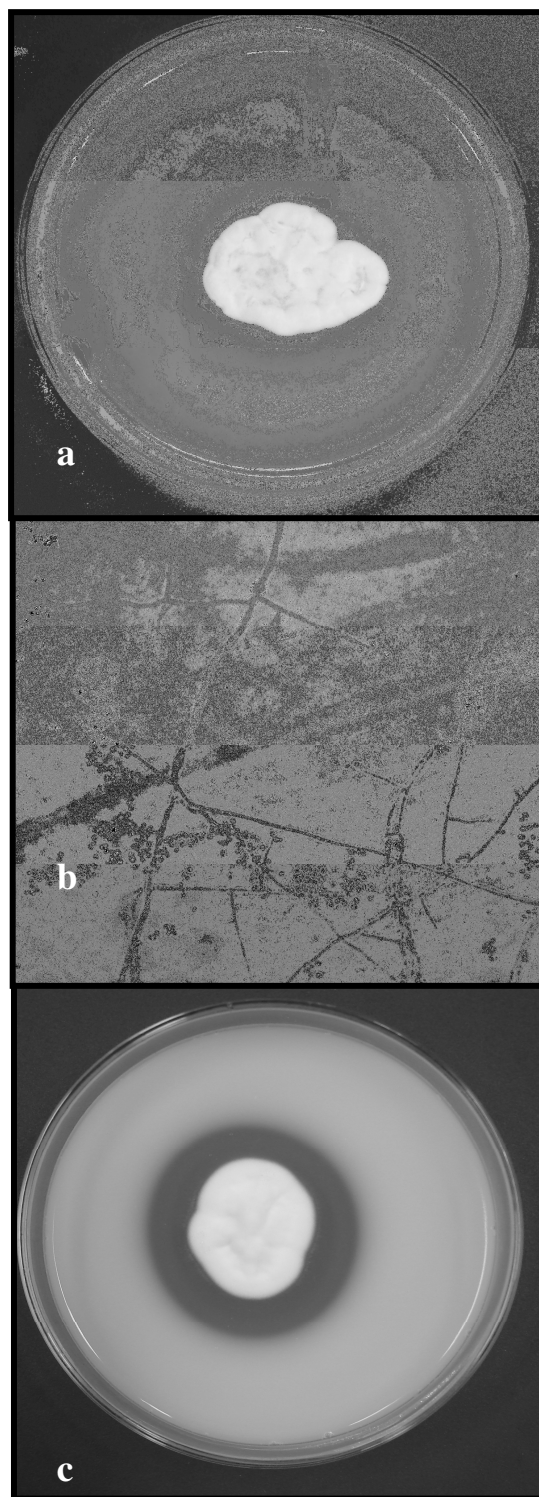


Figura 1. Características de *Engyodontium album*: macroscopia a 37°C (a), microscopia (b) e atividade proteásica com formação de um halo evidente (c).

**5 RINOSINUSITE INVASIVA POR *FUSARIUM MONILIFORME* (SHELDON):
DIAGNÓSTICO E CONDUTA**

Artigo submetido a:

**MEDICAL MYCOLOGY
OFFICIAL PUBLICATION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR HUMAM
AND ANIMAL MYCOLOGY
Oxfordshire/ United Kingdom**

Rinosinusite invasiva por *Fusarium moniliforme* (Sheldon): diagnóstico e conduta

D. MACÊDO^{*}, R. NEVES^{*}, J. FANTAN[†], C. SOUZA-MOTTA^{*} & D. LIMA^{*}

^{*}Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. [†]Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Correspondência

Rua José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482 E-mail: rejadel@yahoo.com.br

Rinosinusite invasiva por *Fusarium moniliforme* (Sheldon): diagnóstico e conduta

Resumo

Interação entre os fungos e cavidades nasosinusais resulta em numerosas condições com apresentações clínicas diferentes. Este trabalho descreve uma forma de rinosinusite crônica causada por *Fusarium moniliforme* em um paciente imunocompetente com história de sinusite resistente.

Palavras-chave: *Fusarium moniliforme*; rinosinusite crônica; diagnóstico.

Introdução

Sinusite é uma desordem comum que afeta aproximadamente 20% da população em algum momento de suas vidas. Sinusite fúngica, entretanto, é considerada rara embora, um aumento nos relatos de casos tem sido observado nas últimas duas décadas [1]. *Fusarium moniliforme* é um patógeno fúngico oportunista o qual está emergindo como significante causa de morbidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos [2].

Espécies de *Fusarium* são sapróbios do solo e patógenos de plantas de distribuição mundial [3]. Em algumas regiões tais como Florida e Oeste da Africa, *F. solani*, é a espécie mais comum causando rinosinusite [4]. Relatos prévios de *F. moniliforme* como patógeno humano são limitados a casos de úlcera córnea e lesão pustular da mão [5, 6, 7].

As características morfológicas que mais distinguem *F. moniliforme* é a formação de microconídios em cadeias. Tais características morfológicas são úteis para distinguir *F. moniliforme* das outras quatro espécies de importância médica [8].

Relato de caso

Neste trabalho é reportado um caso de rinosinusite crônica em um homem imunocompetente de 61 anos que apresentou história de 9 meses de obstrução progressiva do lado direito (Fig.1), dor de cabeça, problemas de visão e anosmia. Investigações radiológicas foram procedidas e imagens por tomografia computadorizada sem contraste foram utilizadas para o conhecimento da extensão da doença. Estas imagens revelaram uma lesão expansiva, de alta atenuação, envolvendo o sinus maxilar direito, se estendendo para dentro da cavidade nasal, células etmoidais direita e o sinus esfenóide. A lesão se estendeu dentro do sinus frontal direito e envolveu as células etmoidais esquerda. O paciente foi submetido à cirurgia para remoção da mucosa hipertrófica. Fragmentos foram transportados submersos em soro fisiológico para o Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

O exame direto foi realizado após clarificação do fragmento da amostra de tecido com solução de hidróxido de potássio a 20%. Fragmentos foram também inoculados em ágar Sabouraud acrescido de 50mg de cloranfenicol/L e incubados tanto a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) como a 37°C por sete dias. A identificação foi realizada pelo exame macroscópico e microscópico.

O exame direto revelou hifas hialinas e septadas. Macroscopicamente a cultura foi de crescimento rápido, com micélio aéreo abundante, branca e freqüentemente tingida de roxo. Microscopicamente os conidióforos surgiam lateralmente das hifa, esparsamente ramificadas. A rara presença de macroconídios delicados, delgados, com 3 a 5 septos, $31\text{-}58 \times 2.7\text{-}3.6\mu\text{m}$ e abundantes microconídios em cadeias, ovais a clavados, $7\text{-}10 \times 2.5\text{-}3.2\mu\text{m}$, forneceram indícios para identificar *F. moniliforme* (Fig. 2) com base em Hoog et al. e Leslie & Summerell [8, 9].

Após a operação, o paciente recebeu anfotericina B (1mg/kg/dia) até dose total máxima de 2g. Seis meses após o tratamento o paciente teve melhora significativa nas dores de cabeça e visão (Fig. 1) e continua saudável até o presente.

Discussão

Os primeiros casos conhecidos de infecção do sinus maxilar por *F. solani* com granuloma ocorreram em dois hospedeiros imunocompetentes [10]; todavia, esta é a primeira vez que *F. moniliforme* tem sido reportado como agente de rinosinusite crônica.

A interação entre os fungos e a cavidade nasosinusais resulta em numerosas condições, com apresentações clínicas diferentes de acordo com as espécies de fungos envolvidas e o status imunológico do paciente. Os fungos estão tanto no muco como na mucosa na sua forma não invasiva. Formas invasivas infiltram ossos, vasos sanguíneos e mucosas [11].

A suspeita para infecção fúngica ocorre quando um paciente com sinusite maxilar crônica não responde às terapias usuais conservativas [12]. Os sintomas nestes pacientes são

freqüentemente diferentes e incluem dores de cabeça, dores retro-orbitais, diplopia e exoftalmos. Devido aos sintomas iniciais, freqüentemente resultam num diagnóstico incorreto ou tardio, e as lesões nos sinus esfenoidais são condições médicas potencialmente fatais [13].

Com base em Nucci e Anaissie [14] e Nucci [15] a porta de entrada incluiu o trato respiratório. Embora o envolvimento do sinus esfenoidal em infecções fúngicas seja raro, o paciente apresentou esta forma de micose com o envolvimento de estruturas adjacentes importantes.

Rinosinusite é observada em muitas formas clínicas, a prognose é benigna e a cura é comum em pacientes imunocompetentes, quando associada com excisão cirúrgica. Todavia, a prognose não é favorável em pacientes imunocomprometidos. Nenhum tratamento, exceto cirurgia, é recomendado, embora anfotericina B utilizada sozinha ou em combinação pareça ser o melhor composto [16].

O paciente foi tratado com anfotericina B, mantendo constante vigilância nos testes de função renal. Após uma dose de 2g de anfotericina B o paciente recebeu alta. O efeito terapêutico deste medicamento foi satisfatório, uma vez que a remoção cirúrgica da lesão já tinha sido realizada.

Referências

- 1 Uri N, Cohen-Kerem R, Elmalah I, Doweck I, Greenberg E. Classification of fungal sinusitis in immunocompetent patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; **129** (4): 372-378.
- 2 Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am* 2002; **16**: 915-934.
- 3 Booth C. *The Genus Fusarium*. England: Commonwealth Mycological Institute, 1971: 237.
- 4 Gugnani HC, Talwar RS, Njoku-Obi ANU, Kodilinye HC. Mycotic keratitis in Nigeria: a study of 21 cases. *Br J Ophthalmol* 1976; **60**: 607-613.

- 5 Anderson B, Roberts SS, Gonzalez C, Chick EW. Mycotic ulcerative keratitis. *AMA Arch Ophthalmol* 1959; **62**: 169-179.
- 6 Collins MS, Rinaldi MG. Cutaneous infection in man caused by *Fusarium moniliforme*. *Sabouraudia* 1977; **15**: 151-160.
- 7 Kidd GH, Wolf FT. Dimorphism in a pathogenic *Fusarium*. *Mycologia* 1973; **65**: 1371-1375.
- 8 Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000: 1126.
- 9 Leslie JF, Summerell BA. The *Fusarium* laboratory manual. Sydney: Blackwell Publishing, 2006: 388.
- 10 Kurien M, Anandi V, Raman R, Brahmadatahan KN. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. *J Laryngol Otol* 1992; **106** (8): 733-736.
- 11 Klossek JM, Kauffman-Lacroix C, Dufour X. Agent fongique et pathologie rhinosinusienne fungal infection and rhinosinusitis. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 2005; **45**: 25-28.
- 12 McGill TJ, Simpson G, Healy GB. Fulminant aspergillosis of the nose and paranasal sinuses: a new clinical entity. *Laryngoscope* 1980; **90**: 748-754.
- 13 Wyllie JW, Kern EB, Djalilian M. Isolated sphenoid sinus lesions. *Laryngoscope* 1973; **83**: 1252-1265.
- 14 Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised host: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 909-920.
- 15 Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S. et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipient. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1237-1242.

16 Hocquette A, Grondin M, Bertout S, Mallié M. *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* and *Scopulariopsis* fungi responsible for hyalohyphomycosis. *Journal de Mycologie Médicale* 2005; **15**: 136-149.



Fig. 1. Aspectos clínicos do paciente com rinosinusite crônica antes (A-B) e após (C-D) tratamento com anfotericina B intravenosa.

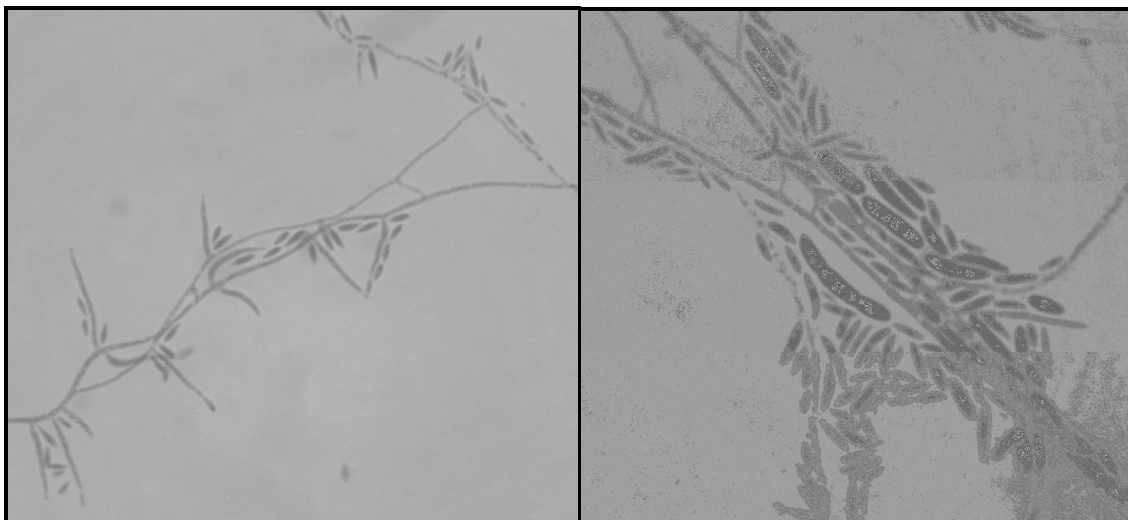


Fig. 2. Conidióforos, microconídios e macroconídios característicos de *Fusarium moniliforme*.

**6 ASPERGILOSE EM PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS: QUATRO RELATOS
CLÍNICOS SOBRE ESTA PATOLOGIA OPORTUNISTA NO BRASIL**

Artigo submetido a:

MYCOPATHOLOGIA

Netherlands

Aspergilose em pacientes imunossuprimidos: quatro relatos clínicos sobre esta patologia oportunista no Brasil

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹; *Rejane Pereira Neves¹; Heraldo Maia Silva-Júnior²; Maria José S. Fernandes¹; Cristina Maria de Souza-Motta¹

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. ²Hospital Geral Otávio de Freitas, Av. Guimarães s/nº, Recife, PE, Brasil.

Financial support: Capes

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife, PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

Aspergilose em pacientes imunossuprimidos: quatro relatos clínicos sobre esta patologia oportunista no Brasil

ABSTRACT

Aspergillus é um fungo ubíquo que pode causar uma variedade de síndromes clínicas. Este trabalho reporta quatro casos de aspergilose por *A. fumigatus* em pacientes imunossuprimidos, relatando a importância dos fatores de risco para uma identificação precoce da infecção por *Aspergillus*.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus* – micoses oportunistas – fatores de risco.

Introdução

A incidência de aspergilose invasiva tem aumentado durante a última década devido ao intenso uso de drogas imunossupressoras poderosas utilizadas para o tratamento de doenças tais como lupus eritematoso sistêmico, peritonite, endocardite, tuberculose pulmonar e diabetes. Aspergilose pulmonar é a forma clínica mais freqüente e o grau de imunossupressão é o principal fator que influencia na evolução, disseminação e morbidade da infecção [1].

Infecções fúngicas desenvolvem-se lentamente nos pacientes imunocompetentes e raramente se tornam um problema médico severo. Todavia, progridem rapidamente e são usualmente fatais nos pacientes imunocomprometidos. Diagnóstico e tratamento precoces são essenciais para a sobrevivência do doente [2]. Reportamos quatro casos de aspergilose por *A. fumigatus* em pacientes imunocomprometidos e focamos alguns fatores que foram importantes, influenciando a forma clínica.

Pacientes e Métodos

Caso 1

Paciente do sexo feminino, 34 anos com lupus eritematoso sistêmico iniciou tratamento em 2000 com glicocorticóides (10mg de prednisolona oral diariamente por 21 dias) e ciprofloxacina (100mg oral diariamente por 21 dias). Após dois anos a paciente recebeu alta seguida de melhora clínica e laboratorial. Todavia, ao final de 2002 apresentou dor abdominal intensa, febre alta e alterações renais. A paciente desenvolveu peritonite fúngica como consequência da contínua diálise peritoneal. *A. fumigatus* foi identificado no exame direto a fresco do líquido peritoneal e na cultura em ágar Sabouraud acrescido de 50mg de cloranfenicol/L [3].

Ao ser confirmada peritonite fúngica, anfotericina B (1 mg/kg/dia) foi administrada intravenosamente em doses crescentes até a dose total de 1.13 g. O catéter peritoneal foi removido e a paciente tratada com sucesso.

Comentários

Terapia antifúngica sistêmica imediata e a remoção do catéter de diálise foram essenciais para a sobrevivência desta paciente [4, 5]. Vários fungos têm estado implicados em casos de peritonite relacionada à diálise, incluindo espécies de *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Acremonium* [6]. Pacientes com lúpus eritematoso sistêmico são facilmente infectados por fungos, bactérias ou outros organismos infecciosos [7, 8, 9]. Desta forma, o catéter de diálise poderia estar contaminado e provavelmente serviu como porta de entrada.

Caso 2

Paciente do sexo masculino de 45 anos, hipertenso, com história prévia de insuficiência cardíaca foi submetido a uma revascularização miocárdica. Após o procedimento, o paciente desenvolveu uma infecção na incisão cirúrgica da perna esquerda e a biópsia revelou presença de estruturas típicas de espécies de *Aspergillus*.

Poucos meses depois, o paciente apresentou-se novamente com alterações cardíacas. Um aneurisma da aorta foi diagnosticado e ele foi imediatamente submetido à cirurgia. Um fragmento da aorta foi enviado ao laboratório de micologia. Exame micológico direto revelou hifas dicotômicas ramificadas e septadas. A cultura foi positiva para *A. fumigatus* após 48 horas de incubação.

Excisão cirúrgica do aneurisma e terapia com anfotericina B foram realizadas, sem sucesso. O paciente foi a óbito por complicações cardíacas causadas pela aspergilose invasiva.

Comentários

Até recentemente, infecções micóticas do coração eram relativamente incomuns, todavia podem estar aumentando em frequência como resultado de infecção oportunista [10, 11, 12].

Estes casos novos estão freqüentemente associados com infecção fúngica disseminada e são usualmente fatais [13].

Caso 3

Paciente de 56 anos do sexo masculino foi admitido em 2002 em hospital público, apresentando tuberculose pulmonar, com tosse crônica e hemoptise. A radiografia de tórax apresentou uma massa semelhante a uma bola fúngica colonizando o pulmão direito e a presença de discretas infiltrações fibronodulares.

Após cirurgia para retirada da bola fungica, fragmentos do lobo foram enviados submersos em soro fisiológico, ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. O exame direto foi realizado após clarificação do fragmento de tecido com solução de hidróxido de potássio a 20%. Fragmentos foram também inoculados em meio ágar Sabouraud acrescido de 50mg de cloranfenicol/L e incubados tanto a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) como a 37°C por 15 dias. A presença de *A. fumigatus* foi confirmada após cultura.

Estratégias terapêuticas consistiram de ciprofloxacina-400mg, clindamicina-500mg e fluconazol-200mg com bons resultados, e após um mês o paciente recebeu alta.

Comentários

Os sintomas de uma infecção fúngica pulmonar são freqüentemente inespecíficos e incluem febre, adinamia, tosse, hemoptise e dor torácica. Radiografia de tórax pode exibir nódulos inespecíficos, infiltrados e cavidades. Diagnóstico precoce e tratamento das infecções fúngicas são essenciais para a sobrevivência dos pacientes imunocomprometidos. Infecção fúngica deveria sempre ser considerada durante a investigação clínica de pacientes imunocomprometidos [2].

Caso 4

Paciente do sexo feminino de 43 anos, imunocomprometida, foi primeiramente admitida no hospital em 2002 sofrendo de tuberculose pulmonar. Em 2005 a paciente retornou apresentando tosse crônica, hemoptise e diabetes mellitus grave. A radiografia de tórax apresentou uma grande cavidade no quadrante superior esquerdo do pulmão e uma massa sugerindo bola fúngica. A radiografia também exibiu discretas infiltrações fibronodulares. A paciente foi submetida a uma lobectomia. Estratégias terapêuticas consistiram de ciprofloxacina-400mg e clindamicina-500mg antes, e hidrocortizona-500mg associada a fluconazol-200mg após a cirurgia, porém sem resultados satisfatórios. Nove dias após a lobectomia a paciente faleceu.

Imediatamente após a cirurgia, os fragmentos pulmonares foram enviados submersos em soro fisiológico ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal de Pernambuco. Exame direto foi desenvolvido após clarificação dos fragmentos de tecido com solução de hidróxido de potássio a 20%. Os fragmentos foram também inoculados em ágar Sabouraud com 50mg cloranfenicol/L em placas de Petri e incubados tanto a temperatura ambiente ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) como a 37°C por 15 dias. Cultura pura foi transferida para a superfície do meio Czapeck para identificação. Macroscopicamente a colônia tinha aspecto flocoso, de coloração branca que se tornou rapidamente verde-acinzentada com a produção de conídios. A textura variou de estritamente veludosa a bastante flocosa. O reverso era incolor. As extremidades conidiais eram colunares e compactas. Microscopicamente, os conídios variaram bastante em tamanho de $200\text{-}400\mu$ por 50μ , conidióforos curtos, lisos, com até 300μ de comprimento e $5\text{-}8\mu$ de diâmetro (Figura 1). Com base nestas características o agente foi identificado como *A. fumigatus* [3].

Comentários

A verdadeira incidência de aspergiloma não é conhecida [14]. As principais características clínicas de colonização pulmonar intra-cavitária são hemoptise recorrente variando de pequenos episódios de esputo com sangue a hemorragia fatal, particularmente em pacientes com tuberculose grave. A mortalidade devido à hemoptise é considerada alta e na presença de *Aspergillus* a infecção tem um pobre prognóstico, especialmente quando associada com diabetes [15, 16].

Conclusões

Aspergilose semi-invasiva tende a ocorrer em pacientes cujo sistema imune se encontra seriamente deprimido, por exemplo, devido à doença pulmonar obstrutiva crônica ou diabetes [17, 18]. Embora a paciente do caso 4 tenha apresentado uma história de diabetes mellitus e severa tuberculose pulmonar, foi impossível documentar a progressão radiológica da doença ou garantir claramente se foi uma forma clássica de aspergiloma ou consequência desta nova forma de colonização cavitária (aspergilose semi-invasiva). Ao ser adiado o diagnóstico, a progressão destas infecções é frequentemente fatal [19].

Respostas insatisfatórias aos antibióticos e infiltrações no raio-X ou CT-scan foram as primeiras indicações de infecção fúngica. Os sítios de infecção podem ser diversos como descritos no trabalho. Os casos 1 e 3 tiveram melhora e receberam alta e os casos 2 e 4 foram a óbito devido a um processo infeccioso descontrolado.

Infecção disseminada por *Aspergillus* tem pobre prognóstico, porém poucos trabalhos têm sido publicados sobre o envolvimento extra-pulmonar na aspergilose. Aspergilose extra-pulmonar produz diferentes manifestações de acordo com os órgãos envolvidos. Pode afetar coração, rins, sistema nervoso central, trato gastrointestinal, baço, fígado, glândula tireóide e pâncreas. Para melhorar o prognóstico da aspergilose, é importante reconhecer as

características clínicas da aspergilose extra-pulmonar e instituir tratamento antifúngico agressivo [14].

Invasão local e disseminação com alta taxa de mortalidade são freqüentemente vistas em infecções por *A. nidulans* [3]; contudo os pacientes apresentaram *A. fumigatus*. Atualmente, com o uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro, corticosteróides, agentes citotóxicos e imunossupressores, novas espécies de fungos estão emergindo como agentes de infecções respiratórias e sistêmicas graves e têm ganhado considerável importância na saúde pública [20]. Este trabalho relata a importância de infecções por *A. fumigatus* como uma condição severa e abruptamente fatal, associada a condições pré-existentis tais como lúpus eritematoso sistêmico, problemas cardíacos, tuberculose pulmonar e diabetes mellitus.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Referências

1. Lumbreras C, Gavalda J. Aspergilosis invasora: manifestacions clínicas y tratamiento. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 79-89.
2. Lin CM, Tsai YH, Huang CC, Lee CH, Chiang PC, Huang SF, Liu HP. Invasive pulmonary aspergillosis and pulmonary cryptococcosis really coexist in immunocompromised host. Journal of Infection 2006; 53:55-58.
3. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Louisiana: Centraalbureau voor Schimmelcultuur Utrecht/ The Netherlands, 2002; 116p.
4. Bibashi E, Memmos D, Kokolina E, Tsakiris D, Soanous D, Papadimitriou M. Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. Clin Infect Dis 2003; 36:927-931.

5. Nannini EC, Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L. Peritonitis due to *Aspergillus* and zygomycetes in patients undergoing of vancomycin versus cefazolin as initial therapy for peritonitis peritoneal dialysis: report of 2 cases and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:49-54.
6. Wang AY, Yu AW, Li PK, Lam PK, Leung CB, Lai KN, Lui SF. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am J Kidney Dis* 2000; 36, 1183-1192.
7. Bouza E, Moya JG, Munoz P. Infections in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15:335-361.
8. Greenberg SR. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. *Crit Care Clin* 2000; 18:931-956.
9. Schattner A, Kagan A, Zimhony O. *Aspergillus* peritonitis in a lupus patient on chronic peritoneal dialysis. *Rheumatol Int* 2006; 26: 762-764.
10. Walsh TJ, Hutchins GM. *Aspergillus* mural endocarditis. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 640-644.
11. Atkinson JB, Conner DH, Robinowitz M, McAllister HA, Virmani P. Cardiac fungal infections: review of autopsy findings in 60 patients. *Hum Pathol* 1984; 15: 935-942.
12. Cox JN, di Dio F, Pizzolato GP, Lerch R, Pochon N. *Aspergillus* endocarditis and myocarditis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). A review of the literature. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1990; 417: 255-259.
13. Muehrcke DD. Fungal prosthetic valve endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 7: 20-24.
14. Hori M, Kami Y, Kishi U, Machida T, Matsumura Kashima T. Clinical significance of extra-pulmonary involvement of invasive aspergillosis: a retrospective autopsy-based study of 107 patients. *J Hospital Infect* 2002; 50(3): 175-182.

15. Denning DW. Invasive aspergillosis. Clin Infect Dis 1998; 26: 781-805.
16. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2): 310-350.
17. Miller WT. Aspergillosis: a disease with many faces. Sem Roentgenol 1996; 31: 52-66.
18. Gefter WB, Weingard TR, Epstein DM, Ochs RH, Miller WT. "Semi-invasive" pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung. Radiology 1981; 140: 313-321.
19. Randhawa HS. Respiratory and systemic mycosis: an overview. Indian J Chest Dis Allied Sci 2000; 42(4): 207-219.
20. Kim JH, Kang WH. Acquired reactive perforating collagenosis in a diabetic patient with pulmonary aspergillosis. Cutis 2000; 66(6): 425-430.

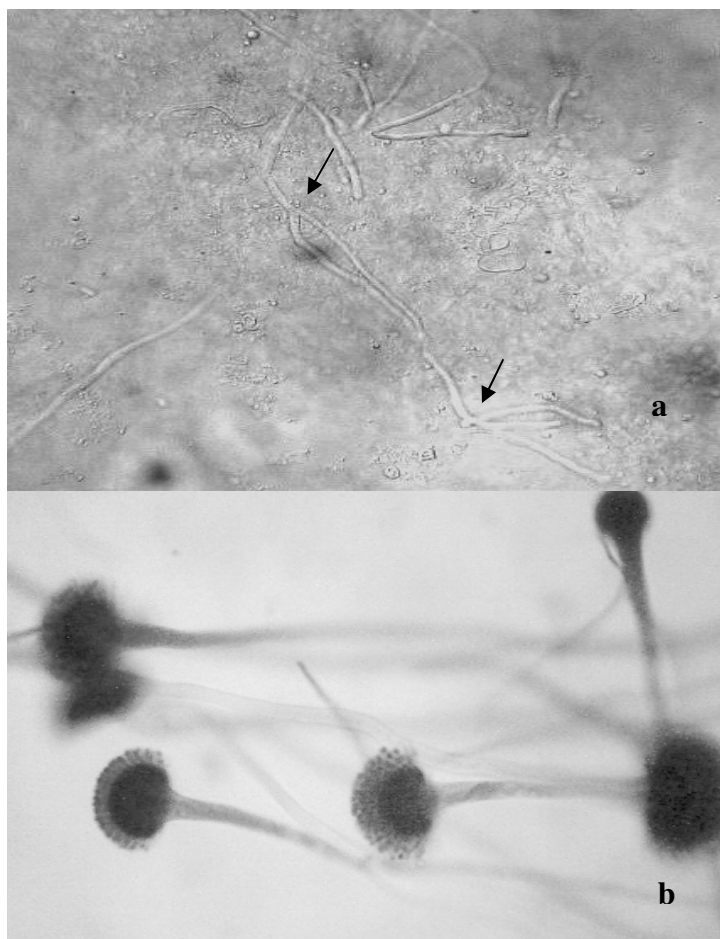


Figura 1. Exame direto apresentando hifas dicotômicas ramificadas e septadas (a).
Conidióforos típicos de *Aspergillus fumigatus* (b).

**7 ONICOMICOSE OPORTUNISTA POR *TRICHOPHYTON RUBRUM*, ATIVIDADE
PROTEÁSICA E SUSCEPTIBILIDADE A ITURINA-A**

Artigo submetido a:

MYCOPATHOLOGIA

Netherlands

Onicomiose oportunista por *Trichophyton rubrum*, atividade proteásica e susceptibilidade a Iturina-A

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, *Rejane Pereira Neves & Flávia Cadengue Lopes

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº Cidade Universitária, CEP: 50670-420, PE, Brazil.

Financial support: Capes

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife, PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

Onicomicose oportunista por *Trichophyton rubrum*, atividade proteásica e susceptibilidade a Iturina-A

Resumo

Trichophyton rubrum é um dos dermatófitos mais comumente observados, com incidência em infecções fúngicas superficiais. Neste estudo, nós reportamos um caso de onicomicose oportunista por *T. rubrum* em um paciente com AIDS e verificamos a atividade proteásica e susceptibilidade “*in vitro*” a iturina-A desta espécie. O diagnóstico foi baseado no exame micológico (observação microscópica direta e cultura). Para detecção de proteinase, foi utilizada caseína do leite como substrato e iturina-A, um peptidolípídio obtido do *Bacillus subtilis*, para o teste de susceptibilidade. *T. rubrum* exibiu atividade proteásica e foi susceptível a iturina-A, substância esta ativa contra este dermatófito.

Palavras-chave: Onicomicose, *Trichophyton rubrum*, AIDS, protease, iturina-A.

Introdução

Onicomicose é uma desordem médica importante que envolve tanto a saúde do paciente como sua qualidade de vida. A incidência de infecções fúngicas superficiais em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) varia entre 46 e 80%, incluindo dermatoses cutâneas e onicomicoses [1]. Onicomicose é causada primariamente por dermatófitos, espécies de *Candida* e fungos não-dermatofíticos. Dermatófitos, particularmente *Trichophyton rubrum*, são os fungos filamentosos patogênicos mais comuns de crescente preocupação por parte dos médicos [2-4].

Onicomicose sub-ungueal proximal sem paroníquia é geralmente causada por *T. rubrum* em indivíduos imunodeprimidos (AIDS). Leuconíquia proximal progride para a parte distal da unha. Lesões proximais associando leuconíquia proximal e paroníquia são geralmente causadas por fungos. *T. rubrum* é a espécie de dermatófito mais frequentemente isolada de hospedeiro imunossuprimido [1, 5].

Proteinases secretadas constituem fatores de virulência potenciais dos dermatófitos [6]. *T. rubrum* parasita tecidos queratinizados de humanos e proteinases secretadas por este fungo permitem a invasão do tecido hospedeiro [7]. Esta micose pode ocorrer quando o fungo alcança a fase estacionária, quando proteinases são secretadas constitutivamente. Estas enzimas podem direta ou indiretamente provocar uma resposta do hospedeiro, resultando em manifestações inflamatórias das dermatofitoses [8].

A necessidade de agentes antifúngicos seguros e efetivos aumenta em paralelo com o crescimento no número de pacientes imunocomprometidos com fatores de risco para infecções fúngicas invasivas. A emergência de patógenos fúngicos resistentes às terapias convencionais traz a necessidade da busca de novos agentes antifúngicos. Atualmente os compostos antifúngicos disponíveis agem em alvos também encontrados nas células dos mamíferos [9], os quais podem resultar em toxicidade ou interação adversa a drogas. É

imperativa a pesquisa de novos compostos que não são tóxicos às células humanas. Na década passada houve um crescimento no conhecimento de peptídeos naturais [10].

Reportamos um caso de onicomicose por *T. rubrum* em paciente com AIDS e o isolado foi caracterizado com ênfase na atividade proteásica e susceptibilidade antifúngica da iturina-A “*in vitro*”.

Material & Métodos

Paciente do sexo masculino com 41 anos, cozinheiro residente em Camaragibe (Região Metropolitana do Recife – Estado de Pernambuco, Brasil), apresentando AIDS, tuberculose disseminada e esquistossomose e suspeita de onicomicose.

No Laboratório de Micologia Médica (Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco), as escamas ungueais foram coletadas e processadas. As unhas foram inicialmente limpas com álcool a 70%, e coletadas com bisturi esterilizado. Escamas da primeira camada da lesão foram descartadas para eliminar organismos contaminantes. Outras escamas foram tratadas com hidróxido de potássio (KOH) a 20% para ajudar a dissolver a queratina e os débridos, facilitando a observação dos elementos fúngicos através de microscopia direta. Para cultura, as escamas foram inoculadas em Sabouraud dextrose ágar (Difco) acrescido de cloranfenicol (50mg/L) contidos em placas de Petri, incubados a 28^oC por 15 dias e a identificação foi realizada de acordo com Hoog et al. [11].

A determinação da produção de proteinase foi feita de acordo com Aoki et al. [12]. O isolado cresceu por dez dias em meio ágar Sabouraud e foi inoculado em meio de cultura contendo caseína do leite como substrato, incubada por 15 dias para a observação de uma zona de precipitação transparente, medida em centímetros. Atividade proteásica foi medida e calculada segundo o método descrito por Price et al. [13] baseado na medida do diâmetro da colônia somado à zona de precipitação (Pz). O estudo foi realizado em duplicata. Com base nos valores da Pz a interpretação foi considerada: Pz entre 0.9 e 1 (+) muito alto, 0,89-0,80

(++) alto, 0,79-0,70 (+++) baixo, e Pz menor 0,69 (+++++) muito baixo. De acordo com este sistema uma taxa de Pz mais baixa corresponde a uma atividade enzimática mais elevada (virulência mais alta).

Conídios do isolado foram suspensos em solução aquosa a uma concentração de 10^6 conídios/mL, e espalhados sobre a superfície de placas de Petri contendo meio ágar Sabouraud (Difco). Discos de papel de filtro Whatman #4 esterilizados (7mm de diâmetro) foram impregnados com 3µL de iturina-A (Sigma) em concentrações de 7,7, 1,54 e 0,308mg/mL dissolvida em metanol, resultando em quantidades finais de 23,1, 4,62, 0,924µg de iturina-A por disco (Tabela 1). Um grupo de discos serviu como controle e recebeu apenas metanol. Os discos foram secos antes de serem colocados nas placas de Petri. Três discos, um com cada concentração de iturina-A, e um controle, foram colocados em cada placa, sendo incubadas por quatro dias a 25°C no escuro. O diâmetro da zona de inibição (incluindo o disco de papel de filtro) foi medido e registrado [14].

Resultados e Discussão

Clinicamente o paciente apresentou lesão nas unhas na forma de hiperqueratose subungueal proximal, onicodistrofia e inflamação periungueal. A diferenciação de onicomicoses similares é bastante difícil [15].

T. rubrum é o dermatófito mais comumente isolado de humanos nos países europeus. Esta espécie é especialmente dominante na onicomicose com prevalência de aproximadamente 80% [16]. Nas infecções de unha, *T. rubrum* destrói queratina e forma canais e lacunas nas placas ungueais e implicam na ocorrência de atividade enzimática extracelular [6].

Exame microscópico direto da unha exibiu artrosporos e hifas hialinas septadas (Figure 1). Cultura em Sabouraud dextrose ágar apresentou colônia cotonosa, branca e reverso vermelho-vinho. Macroconídios ausentes e microconídios piriformes, sésseis em hifas

indiferenciadas típicas de *T. rubrum* (Figura 1). Dermatófitos são os organismos capazes de causar ataque primário à unha. O isolado mais freqüente das unhas é *T. rubrum* [17].

Os médicos prescreveram terapia com fluconazol (200mg/dia). Após sete meses as lesões desapareceram quase completamente, todavia o tratamento foi continuado por mais quatro meses.

Atividade proteásica foi detectada na espécie testada e o valor da Pz foi 0,89, entretanto a literatura aponta que agentes antiretrovirais utilizados em pacientes com AIDS podem causar inibição da proteinase do fungo [18]. Atividade proteásica é considerada importante no mecanismo de patogênese dos fungos oportunistas [19]. Estas proteinases secretadas são relatadas como participantes na captação de nutrientes, extensão da lesão e resposta imune do hospedeiro, elucidando o processo de infecção por *T. rubrum*. Estes resultados fornecem evidências para pesquisas futuras sobre infecção e patogenicidade desta espécie [20]. Onicomicoses estão basicamente associadas com ataques proteolíticos de fungos virulentos secretores de proteinases, que hidrolisam parcialmente o material córneo [15].

O teste de iturina-A para *T. rubrum* exibiu um diâmetro de zona de inibição de 9mm, e o isolado testado foi sensível apenas na concentração mais elevada de 7,7mg/mL. Experiências clínicas iniciais envolvendo humanos e animais comprovam que antibióticos lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus subtilis*, como a iturina-A, foram efetivos contra dermatomicoses e tiveram um amplo espectro de propriedades antifúngicas e poucos efeitos alergênicos. É imperativo pesquisar compostos antifúngicos não tóxicos às células de mamíferos [10].

Tratamento deveria ser instituído isoladamente e o diagnóstico da cultura deve guiar a escolha da droga antifúngica apropriada [4].

Peptídeos antifúngicos são classificados por seu modo de ação que ocorre via diversos mecanismos [21].

Em pacientes imunocomprometidos, onicomicoses podem ser a possível porta de entrada para infecção sistêmica. Desta forma, devido ao seu potencial invasivo, estas infecções requerem uma maior atenção para correta identificação, patogenicidade do isolado e tratamento [22, 23]. Diagnóstico preciso de onicomicose se baseia nos achados clínicos, investigação microscópica direta e cultura. Caso o diagnóstico não seja confirmado através da cultura e a melhora não ocorra, é impossível afirmar se representa falha no tratamento ou diagnóstico inicial incorreto. O advento de novos e mais efetivos antifúngicos têm gerado grande interesse [4].

O isolado está mantido sob óleo mineral (número 5307) na Coleção de Culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Referências

1. Muñoz-Pèrez MA, Rodriguez-Pichardo A, Camacho F, Ríos§, JJ. Extensive and deep dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitalis* in an HIV-1 positive patient. European Academy of Dermatology and Venereology 2000; 14: 61-63.
2. EG, Evans. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. J Am Acad Dermatol. 1998; 38(5): 32-36.
3. Yu L, Zhang W, Wang L, Yang J, Liu T, Peng J, Leng W, Chen L, Li R, Jin Q. Transcriptional Profiles of the Response to Ketoconazole and Amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 23: in press.
4. Sayed El F, Ammourey A, Haybe R.F, Dhaybi R. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. Mycoses 2006; 49(3): 216-219.

5. Goettmann-Bonvallot S. Clinical types of onychomycosis. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130(12): 1237-1243.
6. Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004; 339 (15): 79-88.
7. Apodaca G, McKerrow JH. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. *J Med Vet Mycol* 1990; 28(2): 159-171.
8. Apodaca G, McKerrow JH. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun* 1989; 57(10): 3081-3090.
9. Debono M, Gordee R S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 471-497.
10. De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(1): 1-11.
11. Hoog GSde, Guarro J, Gene' J, Figueiras MJ. Atlas of Clinical Fungi (2nd ed.). Utrecht/Reus: CBS/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
12. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Ninomiya K, Vidotto V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1994; 128: 143-150.
13. Price MF, Walkison ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
14. Klich MA, Lax AR, Bland JM. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 1991; 116(2): 77-80.
15. Hollemeyer K, Jager S, Altmeyer W, Heinzle E. Proteolytic peptide patterns as indicators for fungal infections and nonfungal affections of human nails measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005; 338(2): 326-331.

16. Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, Le'chenne B, Baudraz F, Panizzon R. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area (Switzerland). *Dermatology* 2002; 205: 201-203.
17. Tasic S, Stojanovic S, Poljacki M. Etiopathogenesis, clinical picture and diagnosis of onychomycoses. *Med Pregl* 2001; 54(1-2): 45-51.
18. Chaves GM, Cavalcanti MAQ, Porto ALF. Características de patogenicidade de amostras de leveduras preservadas e recém-isoladas. *Braz J Microbiol* 2003; 34(3): 197-202.
19. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45(5-6):160-165.
20. Leng WC, Wang LL, Wei CD, Yang J, Jin Q. Analysis of secreted proteases of *Trichophyton rubrum*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2005; 45(4):601-605.
21. Shai Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(11):460-464.
22. Baran R, Tosti A, Piraccini BM. Uncommon clinical patterns of *Fusarium* nail infection: report of three cases. *Br J Dermatol* 1997; 136: 424-427.
23. Godoy P, Nunes E, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fishman O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brasil. *Mycopathologia* 2003; 157(3): 287-290.

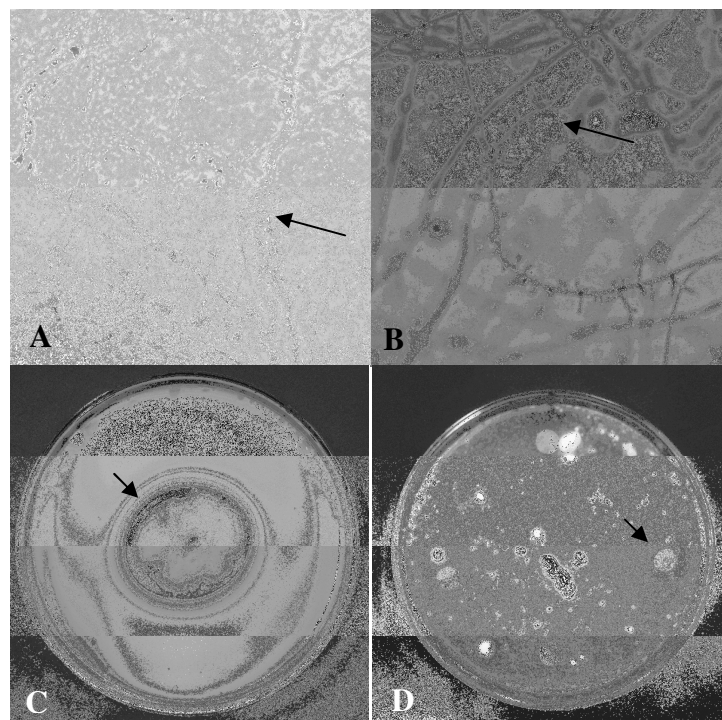


Figura 1. Exame direto (A), características microscópicas de *Trichophyton rubrum* (B), atividade proteásica em meio ágar caseína com formação de halo (C) e susceptibilidade antifúngica em concentração de 7,7mg/mL de iturina A (D).

**8 INIBIÇÃO DE FUNGOS OPORTUNISTAS PELA ITURINA-A: UM
PEPTIDOLIPÍDEO PRODUZIDO PELO *BACILLUS SUBTILIS***

Artigo submetido a:

MYCOPATHOLOGIA

Netherlands

Inibição de fungos oportunistas pela iturina-A: um peptidolípídeo produzido pelo *Bacillus subtilis*

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, *Rejane Pereira Neves, Polyanna Nunes Herculano &
Luciana Rezende Bandeira de Melo

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (81) 2126-8570

Inibição de fungos oportunistas pela iturina-A: um peptidolípídeo produzido pelo *Bacillus subtilis*

Resumo

Bacillus subtilis produz iturina-A, um peptidolípídeo que tem exibido propriedades antifúngicas. Neste estudo, amostras clínicas de pacientes imunocomprometidos foram investigadas para incidência de fungos oportunistas e atividade de iturina-A foi testada. Discos de papel impregnados com várias concentrações de iturina-A foram colocados em placas contendo meio e suspensões de células de espécies como *Candida*, *Trichosporon* e *Paracoccidioides brasiliensis* foram inoculadas. A maioria dos isolados foi inibida por concentrações de iturina-A mais baixas que 5µg/disco e *P. brasiliensis* foi fortemente inibido.

Palavras-chave: Fungos oportunistas; iturina-A; atividade antifúngica.

Introdução

A frequência de micoses devido a espécies oportunistas tem crescido significativamente nas últimas duas décadas e está diretamente relacionada ao aumento da população de risco, a qual inclui indivíduos sob transplante de órgãos sólidos, cirurgias e com AIDS, doença neoplásica, terapia imunossupressiva, idade avançada, diabetes e outras condições nos hospedeiros [1, 2, 3, 4].

Devido à complexidade dos pacientes de risco para infecção e a diversidade de novos patógenos fúngicos, micoses oportunistas se apresentam como desafios consideráveis para diagnóstico e terapia. Alguns fungos não são susceptíveis às terapias padrões com azoles ou polienos e podem requerer o uso de agentes antifúngicos alternativos [4].

Recentemente há um considerável interesse no uso de *Bacillus subtilis* produzindo antibióticos lipopeptídeos como a iturina-A, especialmente contra patógenos de plantas [5, 6].

Este trabalho descreve as propriedades antifúngicas de iturina-A contra fungos oportunistas isolados de diferentes espécimes clínicos de pacientes imunocomprometidos.

Materiais e Métodos

Neste estudo, 23 isolados fúngicos foram obtidos de espécimes clínicos de pacientes imunodeprimidos (fezes, urina, esputo, biópsia de tecidos, lavado broncoalveolar, fluido peritoneal e secreção traqueal). *Candida albicans* (10), *C. parapsilosis* (8), *C. tropicalis* (2), *C. guilliermondii* (1), *Trichosporon cutaneum* (1) e *Paracoccidioides brasiliensis* (1) foram usados no teste de iturina-A. Estes isolados foram estocados na Coleção Internacional de Culturas-Micoteca URM do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil.

Ensaio

Células de cada um dos 23 isolados fúngicos foram suspensas em água destilada esterilizada e a concentração foi medida através de absorbância a 600nm, sendo espalhadas na

superfície de placas de Petri contendo ágar Sabouraud (Difco). Discos de papel Whatman #4 esterilizados (7mm de diâmetro) foram impregnados com 3µL de iturina-A (Sigma) em concentrações de 7,7, 1,54 e 0,308mg/mL dissolvido em metanol, resultando em quantidades finais respectivas de 23,1, 4,62 e 0,924 µg de iturina-A por disco (Tabela 1). Um grupo de discos serviu como controle e recebeu apenas metanol. Os discos foram secos antes de serem colocados nas placas de Petri inoculadas. Três discos, um com cada concentração de iturina-A, e um controle, foram colocados em cada placa. Todas as placas foram incubadas por quatro dias a 25°C no escuro. O diâmetro da zona de inibição (incluindo disco de papel de filtro) foi medido e registrado [5, 7].

Resultados e discussão

Os diâmetros das zonas de inibição são apresentados na Tabela 1. Todos os isolados testados foram sensíveis a iturina-A na concentração mais alta. Diferenças na sensibilidade a iturina-A foram evidentes a 7,7mg/mL, onde *C. albicans* (5380, 5311), *C. parapsilosis* (5309), *C. tropicalis* (5359) e *P. brasiliensis* (5169) foram inibidos e apresentaram zonas que variaram de 8.45 a 17mm. Contudo, *C. albicans* (5383) e *C. parapsilosis* (5288, 5384) foram resistentes em todas as concentrações. *T. cutaneum* foi inibido nas concentrações 7.7 e 1.54 mg/mL. Por outro lado, *P. brasiliensis* demonstrou alta sensibilidade a iturina-A, e foi inibido nas três concentrações testadas (Figura 1).

Os resultados exibiram predominância de *C. albicans* em pacientes imunocomprometidos e a resistência de um isolado desta espécie obtido de esputo. Considerando-se a sensibilidade da maioria dos isolados a iturina A, o teste demonstrou eficácia como princípio ativo útil na prevenção e cura de micoses.

Iturinas têm sido usadas como compostos antifúngicos médicos e veterinários [8, 9] com poucos efeitos tóxicos. Embora tenhamos demonstrado a eficácia de iturina-A *in vitro*, muitos testes *in vivo* precisam ser realizados.

Os efeitos inibitórios de iturina-A são aparentemente de longa duração. As placas foram observadas por várias semanas e as zonas de inibição não sofreram modificações notáveis daquelas medidas no quarto dia de teste. Assim, iturina-A pode ser ativa contra crescimento fúngico bem como germinação de esporos [5].

Iturina-A demonstra uma atividade antibiótica muito forte e possui um amplo espectro antifúngico, tornando-a um agente potencial ideal para o biocontrole de doenças de plantas ou modelo para a síntese de tais fungicidas [10, 11].

O modo de ação destes lipopeptídeos cíclicos deve-se à interação com as membranas dos fungos criando canais transmembranares que permitem a saída de íons vitais [12]. Iturinas também têm sido usadas no tratamento de dermatomicoses em humanos e animais [8, 9].

Nas células de leveduras, iturina-A rompe a membrana plasmática pela formação de pequenas vesículas e agregação de partículas intramembranares. Também libera eletrólitos e produtos de elevada massa molecular e degrada fosfolipídios [13]. Iturina-A aumenta bastante a condutância elétrica das membranas lipídicas bimoleculares, as quais têm estimulado a discussão na atividade de formação de poros e sua ação contra patógenos [14].

Conclusões

Devido ao aumento da morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos e a ação debilitante das infecções oportunistas, um rápido diagnóstico e terapia eficiente são essenciais.

Por outro lado, desafios clínicos em homens e animais também têm demonstrado que iturina-A pode ser uma droga valiosa pelo seu largo espectro antifúngico, sua baixa toxicidade e baixos efeitos alergênicos [15]. Assim, iturina-A apresenta potencial para ser utilizada como agente antifúngico alternativo.

Esta pesquisa discute as aplicações potenciais de iturina-A, especialmente devido ao aumento no número de fungos resistentes e à necessidade por linhas terapêuticas alternativas.

Referências

1. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of candidemia, revisited. Clin Infect Dis 2003; 37: 1172-1177.
2. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Thompson Sanza L, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. J Clin Microbiol 2004; 42: 1519-1527.
3. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. Diagn Microbiol Infect Dis 2004; 48: 101-105.
4. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Flemming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (1): 48-66.
5. Klich MA, Lax AR, Bland JM. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by inturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. Mycopathologia 1991; 116: 77- 80.
6. Bais HP, Fall R, Vivanco M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol 2004; 134: 307-319.
7. Mhammedi A, Peypoux F, Besson F, Michel G. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group : isolation and characterization. Journal of Antibiotics 1982; 35(3): 306-311.
8. Blocquiaux S, Delcambe L. Essais de traitement de dermatomycoses par l'iturine Arch Belg Dermatol Syphiligr 1956; 12 : 224-226.

9. Delcambe L, Peypoux F, Guinand M, Michel G. Iturin and iturinic acids. *Revue des Fermentations et des Industries Alimentaires* 1976; 31: 147-151.
10. Sandrin C, Peypoux F, Michel G. Co-production of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem* 1990; 12: 370-375.
11. Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore forming lipopeptides: biological and physiochemical properties. *Toxicology* 1994; 87: 151-174.
12. Latoud C, Peypoux F, Michel G, Genet R, Morgat, JL. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. 1986; 856(3): 526-535.
13. Thimon L. et al. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 128: 101-106.
14. Maget-Dana R. et al. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. *Biochim Biophys Acta* 1985; 815: 405-409.
15. De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal peptide: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1-11.

Tabela 1. Diâmetro da zona de inibição (mm) nas três concentrações de iturina-A em meio ágar Sabouraud.

Zone of inhibition (mm)	0	0,308 mg/mL	1,54 mg/mL	7,7 mg/mL
<i>Candida albicans</i> (5380)	0	0	0	8,45
<i>C. albicans</i> (5381)	0	0	0	7,75
<i>C. albicans</i> (5382)	0	0	0	7,5
<i>C. albicans</i> (5383)	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (5312)	0	0	0	7,25
<i>C. albicans</i> (5311)	0	0	0	8,5
<i>C. albicans</i> (5361)	0	0	0	7
<i>C. albicans</i> (5358)	0	0	0	7,5
<i>C. albicans</i> (5357)	0	0	0	7,2
<i>C. albicans</i> (5356)	0	0	0	7,75
<i>C. parapsilosis</i> (5313)	0	0	0	7,5
<i>C. parapsilosis</i> (5288)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (5289)	0	0	0	7
<i>C. parapsilosis</i> (5290)	0	0	0	7,4
<i>C. parapsilosis</i> (5309)	0	0	0	8,75
<i>C. parapsilosis</i> (5384)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (5308)	0	0	0	7,2
<i>C. parapsilosis</i> (5310)	0	0	0	7,2
<i>C. tropicalis</i> (5359)	0	0	0	8,5
<i>C. tropicalis</i> (5360)	0	0	0	7,2
<i>C. guilliermondii</i> (5355)	0	0	0	7,75
<i>Trichosporon</i> <i>cutaneum</i> (5287)	0	0	7	7,5
<i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i> (5169)	0	9,5	12	17

* 0 indica que os 7mm do disco impregnados foram completamente tomados por crescimento dos fungos.

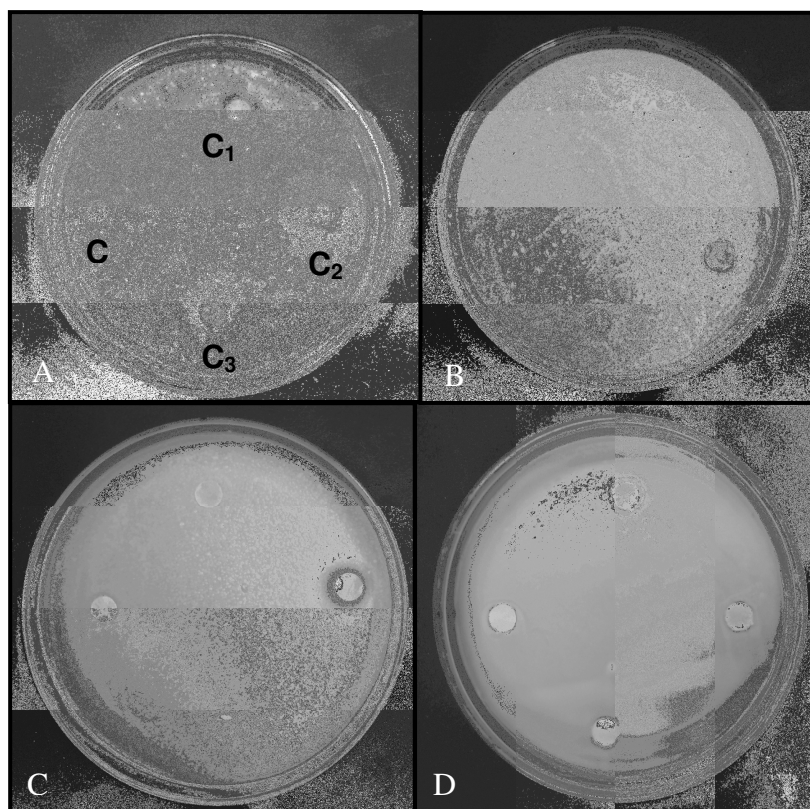


Figura 1. Atividade de iturina-A contra isolados de pacientes imunocomprometidos:

Paracoccidioides brasiliensis foi susceptível nas três concentrações (A), *Trichosporon cutaneum* em duas (B), *Candida tropicalis* 5360 em uma (C), e *C. albicans* 5383 apresentou-se resistente (D).

*C (controle), C1 (7,7mg/mL), C2 (1,54mg/mL) e C3 (0,308mg/mL).

9 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos se pode concluir:

- ✓ Dermatofitose, fusariose e paracoccidioidomicose podem ocorrer em pacientes imunodeprimidos apresentando diferentes doenças de base, assim como aspergilose e candidíase, podendo ser fatais neste grupo de pacientes.
- ✓ As leveduras são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas oportunistas.
- ✓ *Engyodontium album* é uma micose emergente em imunodeprimido, sendo citado pela primeira vez como agente etiológico de fungemia em paciente com AIDS.
- ✓ Detecção de proteinase varia de acordo com o substrato utilizado, sendo o soro de albumina bovino ideal para expressão dessa enzima pelas leveduras.
- ✓ A proteinase não deve ser considerada isoladamente critério de patogenicidade dos fungos oportunistas.
- ✓ Susceptibilidade dos fungos a iturina A pode variar entre culturas de uma mesma espécie.
- ✓ Iturina A em diferentes concentrações apresenta ação antifúngica em *Engyodontium album*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Trichosporon cutaneum*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium solani*, *F. moniliforme* e algumas espécies de *Candida*.
- ✓ Fungos filamentosos, leveduras e fungos dimórficos apresentam maior sensibilidade a iturina A na concentração de 21,3 µg (7,7mg/ml).

DANIELLE PATRÍCIA CERQUEIRA MACÊDO

ANEXOS

(ARTIGOS PUBLICADOS, SUBMETIDOS E NORMAS DAS REVISTAS)

AN UNUSUAL CASE OF PARACOCCIDIOIDOMYCOSIS IN BRAZIL

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹; *Rejane Pereira Neves¹; Oliane Maria Correia Magalhães¹;
Armando Marsden Lacerda Filho¹

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Submitted: January 03, 2006; Returned to authors for corrections: April 17, 2006; Approved: October 13, 2006

ABSTRACT

This paper reports an unusual case of paracoccidioidomycosis with ulcerations in the head and nose in a Brazilian man. For diagnosis, direct microscopic examination of ulcer secretion and skin samples treated with potassium hydroxide was performed. The isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* occurred at 28°C and 37°C on Sabouraud agar with chloranphenicol. Diagnosis was established by the presence of isolated and multiple budding yeast-like cells and typical fungus growth of *P. brasiliensis*.

Key words: Paracoccidioidomycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*, unusual head lesion.

Paracoccidioidomycosis is one of the most important systemic mycosis affecting residents of tropical and subtropical regions in Latin America (3,5). The etiological agent is the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, which occurs in the filamentous form in nature, and the disease is thought to be acquired by inhalation of the propagules produced by this phase. The most common way of penetration in human body is through the lungs, with later lymph-hematogenic dissemination to other organs, skin or mucosas: buccal, pharyngeal, intestinal and rarely by inoculation into the skin (2). Clinical manifestations range from asymptomatic pulmonary lesions to generalized systemic infections (1,7,8,11).

We present an unusual case of paracoccidioidomycosis diagnosed in Brazil. In June 2005, a 47-year-old Brazilian man arrived in the Sector of Pneumology at Otávio Freitas hospital in Recife state of Pernambuco, in Northeast of Brazil, with a suspect of tuberculosis and history of swellings and ulcerations of his nose and head (Fig. 1). Several months before, he had presented chronic bronchitis with fever episodes. A chest X ray revealed bilateral, diffuse pulmonary infiltrates. Skin lesions were painful and the patient was physically and psychologically handicapped, and clinical symptoms included occasional night sweats. No acid-fast bacilli or malignant cells were detected during exams.

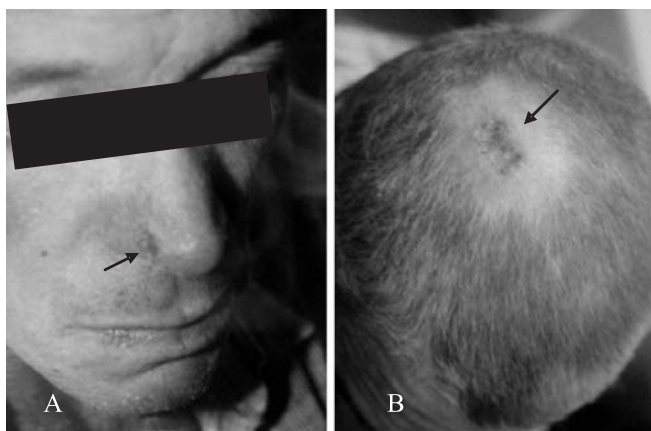


Figure 1. A) Lesion on nose and B) granulomatous lesion of the head caused by *Paracoccidioides brasiliensis*.

Clinical samples were processed at Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco. Direct examination was performed after clarification of the sample fragments with 20% potassium hydroxide solution. For isolation, the samples were inoculated on the surface of Sabouraud agar with 50mg chloranphenicol/L, and incubated at room temperature

*Corresponding Author. Mailing address: Rua José Paraíso, 135/01 Boa Viagem cep 51030-390 Recife, PE - Brasil. Tel.: (81) 2126-8482. E-mail: rejadel@yahoo.com.br

(28° ± 2°C) and 37°C during 20 days. The identification was done according to Lacaz et al. (6).

The examination of ulcer secretion and skin samples indicated presence of multiple budding which are diagnostic criteria for paracoccidioidomycosis (Fig. 2). Cultures incubated at 37°C were cream-colored yeast-like wrinkled colonies. Cells presented double refractile wall, were birefringent and presented multiple budding of *P. brasiliensis*. At room temperature a mould with short aerial hyphae could be observed. Physicians prescribed a ketoconazole (200 mg/day) therapy. After three weeks, the lesions and pulmonary infiltrates had disappeared almost completely and the patient was discharged, but treatment was continued for additional five months.

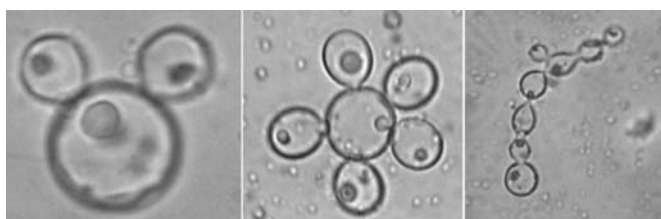


Figure 2. Yeast form seen at direct examination. Note the “Mickey Mouse type”, “pilot wheel” and catenulate forms of *Paracoccidioides brasiliensis*.

Although unusual or atypical aspects of the disease may be observed in adult patients lesions circumscribed to the lung are seen in 20-40% of them (9). Pulmonary and skin lesions have been commonly suspected to be tuberculosis, and diagnosis confirmed this (10). Respiratory symptoms may be non-specific, as occurred with the patient of this report. The chronic multifocal form is frequently characterized by pulmonary involvement and mucocutaneous lesions, predominantly in the oral and nasal cavities (5), which were not observed in the head deep lesions of the patient. According to Elias et al. (4) the involvement of the central nervous system in paracoccidioidomycosis is higher than previously thought.

Although ulcerative lesions in head are rare, this diagnosis should be considered as an important sign of this mycosis. Patients with early diagnosis have a favorable outcome with clinical or surgical treatment.

RESUMO

Um caso incomum de paracoccidioidomicose no Brasil

Este trabalho relata um caso incomum de paracoccidioidomicose com ulcerações na cabeça e nariz em homem brasileiro. Para o diagnóstico, realizou-se exame microscópico direto de secreção de úlcera e amostras de pele, tratados com

hidróxido de potássio. O isolamento de *Paracoccidioides brasiliensis* ocorreu a 28°C e 37°C em Sabouraud ágar com cloranfenicol. O diagnóstico foi estabelecido pela presença de células leveduriformes isoladas e com brotações múltiplas e o crescimento típico do fungo *P. brasiliensis*.

Palavras-chave: Paracoccidioidomicose, *Paracoccidioides brasiliensis*, lesão incomum em cabeça.

REFERENCES

1. Brummer, E.; Castaneda, E.; Restrepo, A. (1993). Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin. Microbiol. Rev.*, 6, 89-117.
2. Burnier, S.V.; Sant'Anna, A.E. (1997). Palpebral paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 140, 29-33.
3. Cadavid, D.; Restrepo, A. (1993). Factors associated with *Paracoccidioides brasiliensis* infection among permanent residents of three endemic areas in Colombia. *Epidemiol. Infect.*, 111, 121-133.
4. Elias, J.J.; Santos, A.C.; Carlotti, C.G.; Colli, B.O.; Canheu, A.; Matias, C.; Furlanetti, L.; Martinez, R.; Takayanagui, O.M.; Sakamoto, A.C.; Serafini, L.N.; Chimelli, L. (2005). Central nervous system paracoccidioidomycosis: diagnosis and treatment. *Surgical Neurology*, 63, 13-21.
5. Horré, R.; Schumacher, G.; Alpers, K.; Seitz, H.M.; Adler, S.; Lemmer, K.; Hoog, G.S. de; Schaal, K.P.; Tintelnot, K. (2002). A case of imported paracoccidioidomycosis in a German legionnaire. *Med. Mycol.*, 40(2), 213-216.
6. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Heins-Vaccari, E.M.; Melo, N.T. (1998). Guia para Identificação de Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico. Sarvier, São Paulo, SP.
7. Puccia, R.; Carmona, A.K.; Gesztési, J.L.; Juliano, L.; Travassos, L.R. (1998). Exocellular proteolytic activity of *Paracoccidioides brasiliensis*: cleavage of components associated with the basement membrane. *Med. Mycol.*, 36, 345-348.
8. San-Blas, G.; Nino-Veja, G.; Iturriaga, T. (2002). *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Med. Mycol.*, 40, 225-242.
9. Santos, J.W.A.; Severo, L.C.; Porto, N.S. (1998). Fine needle aspiration in the diagnosis of pulmonary paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 143, 65-69.
10. Silletti, R.P.; Glezerov, V.; Schwartz, I.S. (1996). Pulmonary paracoccidioidomycosis misdiagnosed as *Pneumocystis pneumonia* in a immunocompromised host. *J. Clin. Microbiol.*, 34(9), 2328-2330.
11. Wanke, B.; Londero, A.T. (1994). Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco, M.; Da Silva-Lacaz, C.; Restrepo, M.A.; Del Negro, G. (eds). *Paracoccidioidomycosis*. CRC Press, Boca Raton, Fla, p.109-120.

ENGYODONTIUM ALBUM FUNGAEMIA: THE FIRST REPORTED CASE

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo; Rejane Pereira Neves*; Cristina Maria de Souza-Motta;
Oliane M. Correia Magalhães

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

Submitted: November 23, 2006; Approved: January 18, 2007

ABSTRACT

Opportunistic mycoses have been increasingly observed among immunocompromised patients. We describe a case in which *Engyodontium album* was isolated and cultured from the blood of a patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *E. album* grew at 37°C and showed proteinase activity, both indicators of pathogenicity. This is the first time that this organism has been reported as agent of fungaemia.

Key words: *Engyodontium album*, fungaemia, Acquired Immunodeficiency Syndrome

Opportunistic mycoses have been increasingly observed in immuno-compromised patients. *Engyodontium album* is an unusual pathogen but a rather common inhabitant of waste or moist material and can be isolated from substrates such as paper, jute, linen, and painted walls. Its dispersal is by dry, hygrophobic conidia and can be isolated from house air (1).

E. album used to be included in the genus *Beauveria* (10). Limber (7) then included it in a new genus, *Tritirachium*, but since 1972 a new genus *Engyodontium* has been created which includes two species, *E. album* and *E. parvisporum* (3). Infections involving *E. album* include eczema vesiculosum (4), granulomatous skin lesions, brain abscess (9) and keratitis (8). In 1990, Augustinsky *et al.* (1) reported the first case of endocarditis caused by *E. album*. In this report we describe a case of *E. album* fungaemia in a patient with the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) and test fungus pathogenicity.

The patient, a 18-year-old boy with AIDS, was admitted in the Clinical Hospital at Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil in 2002 with severe pulmonary tuberculosis. He returned in 2005 presenting CD₄ 25 cells/mm³, high fever, weight loss, chronic cough, ganglion growth and oral candidiasis.

Three venous blood samples were collected in consecutive days, aseptically by venipuncture into VACUTAINER® tubes using EDTA anticoagulant. They were processed by standard methods (direct examination and isolation in culture) for

mycological diagnosis at Medical Mycology Laboratory, Federal University of Pernambuco.

Direct examination was performed without clarifying and staining clinical samples. Subcultures were prepared using Sabouraud dextrose agar plus chloranphenicol (Difco Laboratories) incubated at 30°C and 35°C in an aerobic atmosphere for 15 days. Pure cultures were transferred onto the surface of potato dextrose agar medium to taxonomic identification (5,6).

Preliminary pathogenicity tests were carried out through proteinase detection using casein and gelatin as substrates (6). The isolated fungus was inoculated on the referred culture medium, incubated at room temperature and at 37°C in order to detect the formation of a transparent halo, and observed for 10 to 15 days. When a transparent zone occurred, the result was considered positive, regardless the diameter.

Direct examination revealed septation of hyaline hyphae. Macroscopically the colonies were floccose, white, and 24 mm in diameter. The reverse of the colony was colorless. Microscopic examination showed narrow vegetative hyphae which were 1 to 2 µm wide, bearing fertile hyphae which were 2 to 4 µm wide and apically dichotomously branched, bearing conidiogenous cells in whorls of one to three. Conidiogenous cells consisted of an elongated cylindrical structure with a well-developed rachis with denticles. Conidia were hyaline, smooth, and globose (Fig. 1). The organism was identified as *E. album* according to the

*Corresponding Author. Mailing address: R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390. Tel.: (81) 2126-8482 E-mail: rejadel@yahoo.com.br

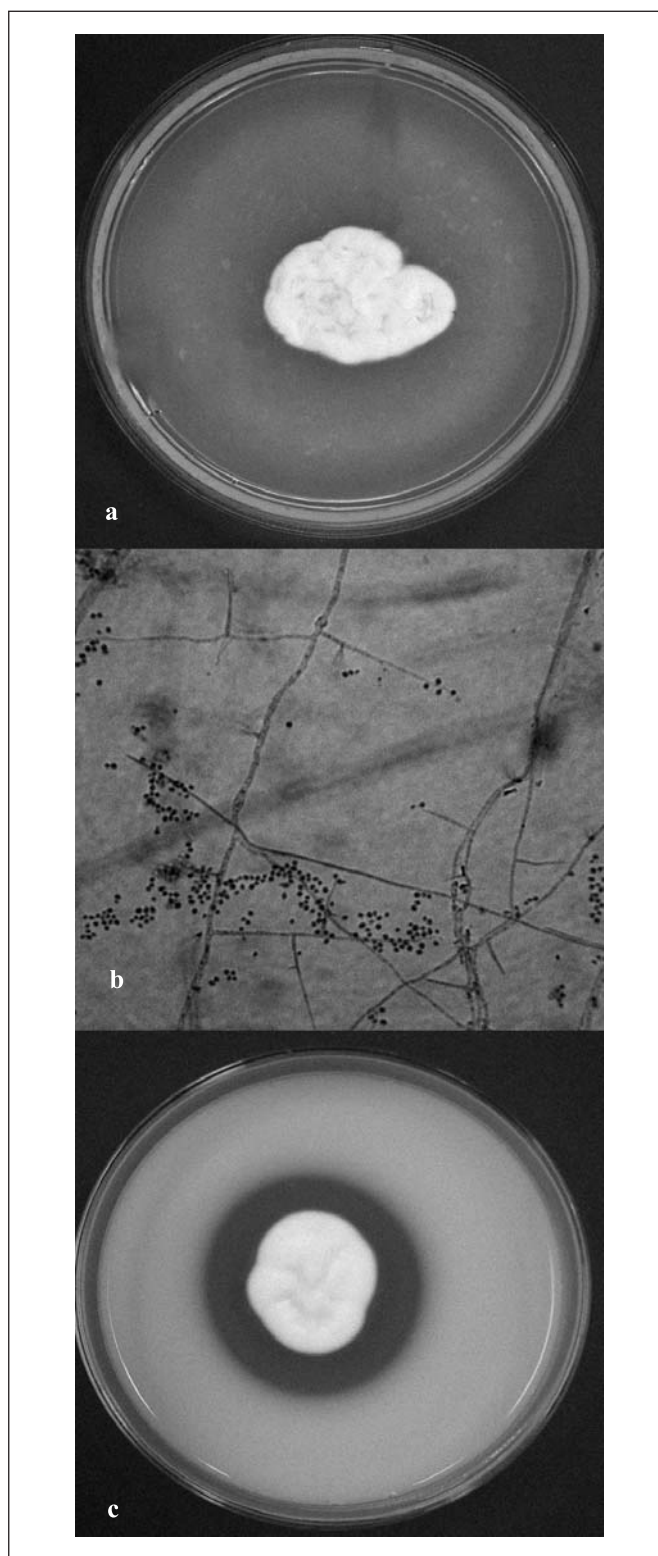


Figure 1. Characteristics of *Engyodontium album*: macroscopy at 37°C (a) microscopy (b) and proteinase activity with an evident halo formation (c).

criteria described by Hoog *et al.* (5). This is the first case report of an AIDS patient with *E. album* fungaemia.

Physicians prescribed a fluconazole (200 mg/day) therapy. After one month blood cultures were negative and the patient was discharged, although treatment was continued for six months with good results.

Pathogenicity tests indicated that the aethiological agent was able to produce proteinase in both substrates. Chellappan *et al.* (2) demonstrated that *E. album* marine isolates produce an alkaline proteinase *in vitro*. The involvement of *E. album* as the fungaemia agent and its capacity to secrete extracellular enzymes has not been described yet in the literature, although there have been sporadic reports of parasitism *in vivo* by this hyphomycete (1,4,8,9). This observation provides further evidence for the pathogenic nature of this organism.

It should be noted that Seeliger (9) did not observe *E. album* development at 37°C. This may be due to a strain difference. Many fungal species that usually do not grow at 37°C may survive in human tissues for a considerable length of time, especially in people under immunodepressive therapy or with impaired immune defence, when introduced into or under the skin and deeper tissues (1,9).

The isolate has been maintained under mineral oil (number 6066) at URM Culture Collection of Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Brazil.

RESUMO

Fungemia por *engyodontium album*: primeiro caso reportado

Micoses oportunistas têm sido progressivamente observadas entre pacientes imunocomprometidos. Nós descrevemos um caso no qual *Engyodontium album* foi isolado e crescido do sangue de um paciente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. *E. album* cresceu a 37°C e exibiu atividade proteásica, ambos indicadores de patogenicidade. Esta é a primeira vez que este organismo foi reportado como agente de fungemia.

Palavra-chave: *Engyodontium album*, fungemia, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

REFERENCES

1. Augustinsky, J.; Kammeyer, P.; Husain, A.; deHoog, G.S.; Libertin, C.R. (1990). *Engyodontium album* endocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, 28(6), 1479-1481.
2. Chellappan, S.; Jasmin, C.; Basheer, S.M.; Elyas, K.K.; Bhat, S.G.; Chandrasekaran, M. (2006). Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 41, 956-961.
3. De Hoog, G.S. (1978). Notes on some fungicolous hyphomycetes and their relatives. *Persoonia*, 10(1), 33-81.

4. De Hoog, G.S. (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Study Mycology*, 1, 1-41.
5. Hoog, G.S.; Guarro, J. (2001). *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures/Universitat Rovira i Virgili, 1126p.
6. Lacaz, C.S.; Porto, E. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. Sarvier, São Paulo, 1104p.
7. Limber; D.B. (1940). A new form genus of the Moniliaceae. *Mycologia*, 32: 23-30.
8. McDonnell; P.J.; Werblin, T.P.; Sigler, L.; Green, W.R. (1984). Mycotic keratitis due to *Beauveria alba*. *Cornea*, 3, 213-216.
9. Seeliger, H.P.R. (1983). Infections of man by opportunistic molds-their identification and nomenclature of their diseases. *Mykosen*, 26, 587-598.
10. Vuillemin, P. (1912). *Beauveria*, nouveau genera de Verticillacees. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 59, 34-40.
11. Weitzman, I.; Summerbell, R.C. (1995). The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 240-259.

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY GUIDELINES TO AUTHORS

SCOPE OF THE JOURNAL

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

SUBMISSION OF A MANUSCRIPT

Submission of a manuscript to Brazilian Journal of Microbiology is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

PUBLICATION OF A MANUSCRIPT

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication. Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

PREPARATION OF A MANUSCRIPT

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research papers**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*

- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results
- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For **mini-reviews**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission. Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Research papers and *mini-reviews* consist of 20 printed pages, including references, tables and figures.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples: Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper. Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the *Resumo* for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work. Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text. The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list. Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W. (eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*.
<http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

References citing “personal communication” or “unpublished data” are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are “accepted for publication” or “in press” are acceptable. However, references of papers that are “submitted” or “in preparation” are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).



Fusarium moniliforme (Sheldon) invasive rhinosinusitis: diagnosis and management

Journal:	<i>Medical Mycology</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Case Report
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Macêdo, Danielle; Universidade Federal de Pernambuco, Mycology Neves, Rejane; Universidade Federal de Pernambuco, Micologia Fantan, Juliana; Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Clínica Médica Souza-Motta, Cristina; Universidade Federal de Pernambuco, Micologia Lima, Débora; Universidade Federal de Pernambuco, Micologia
Keyword:	Fusarium moniliforme, chronic rhinosinusitis, diagnosis



***Fusarium moniliforme* (Sheldon) invasive rhinosinusitis: diagnosis and management**

D. MACÊDO*, R. NEVES*, J. FANTAN†, C. SOUZA-MOTTA* & D. LIMA*

*Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. †Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

Correspondence to

Rua José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390
Fax: (+5581) 2126-8482 E-mail: rejadel@yahoo.com.br

***Fusarium moniliforme* (Sheldon) invasive rhinosinusitis: diagnosis and management**

Abstract

Interaction between fungi and nasosinusal cavities results in numerous conditions that have different clinical presentations. This paper describes a previously undescribed form of chronic rhinosinusitis caused by the fungus *Fusarium moniliforme* in an immuno-competent patient with a history of resistant sinusitis.

Key words: *Fusarium moniliforme*; chronic rhinosinusitis; resistance; diagnosis; management.

Introduction

Sinusitis is a common disorder, affecting approximately 20% of the population at some time of their lives. Fungal sinusitis however is considered to be rare, although an increase in reported cases has been observed over the past two decades [1]. *Fusarium moniliforme* is an opportunistic fungal pathogen which is emerging as significant cause of morbidity and mortality [2].

Fusarium species are soil saprophytes and plant pathogens of world-wide distribution [3]. In some geographic regions such as Florida and West Africa, *F. solani*, is the most common species causing this disease [4]. Previous reports of *F. moniliforme* as a human pathogen are limited to cases of corneal ulcer and pustular lesion of the hand [5, 6, 7].

The most distinctive morphological feature of *F. moniliforme* is the formation of microconidia in chains. Such morphological characteristics are helpful in distinguishing *F. moniliforme* from the other four medically important species [8].

Case report

In this paper, we report a case of chronic rhinosinusitis in an immuno-competent 61 year old man who presented a 9 month history of progressive right-side obstruction (Fig.1), headache, disturbances of vision and anosmia. Radiological investigations were carried out and non-contrast computed tomographic images were used for assessment of the disease extent. These images revealed an expansive high-attenuation lesion involving the right maxillary sinus and extending into the nasal cavity, right ethmoid air cells and the entire sphenoid sinus. The lesion extended into the right frontal sinus and involved the left ethmoid air cells. The patient underwent a rhinosinusitis surgery and hypertrophic mucosa was removed. Fragments were sent submerged in physiological

serum to Medical Mycology Laboratory at the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil.

Direct examination was performed after clarifying the sample fragment with 20% potassium hydroxide solution. Fragments were inoculated onto Sabouraud agar with 50mg chloranphenicol/L and incubated either at room temperature ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) or at 37°C for seven days. Identification was performed under macroscopic and microscopic examination.

The direct examination revealed septate hyaline hyphae. Macroscopically the culture was very fast growing, with abundant aerial mycelium, white and often becoming tinged with purple. Microscopically conidiophores arising laterally from hyphae in the aerial mycelium sparsely branched. The rare presence of delicate, slender macroconidia, 3-5-septate, $31\text{-}58 \times 2.7\text{-}3.6 \mu\text{m}$ and abundant microconidia, in chains, ovoidal to clavate, $7\text{-}10 \times 2.5\text{-}3.2 \mu\text{m}$ provided positive identification of *F. moniliforme* (Fig. 2) according to the criteria described by Hoog *et al.* and Leslie & Summerell [8, 9].

Post-operatively the patient received amphotericin B (1mg kg^{-1}) till the maximum total dose of 2g. The patient was followed up regularly. Six months after the first presentation, the patient had significant improvement in headache and vision (Fig. 1) and the patient continues to be healthy till date.

Discussion

The first known cases of *F. solani* infection of maxillary sinus with granuloma occurred in two immuno-competent hosts [10]; however, this is the first time that *F. moniliforme* has been reported as agent of chronic rhinosinusitis.

The interaction between fungi and the nasosinusal cavities results in numerous conditions, which have different clinical presentations according to the species of

1
2
3 fungus involved and the immune status of the patient. The fungi will be either in the
4
5 mucus or on the mucosa in its noninvasive form; invasive forms infiltrate bone, blood
6
7
8 vessels and mucosa [11].
9

10 The suspicion of fungal infection arises whenever a patient with chronic
11
12 maxillary sinusitis does not respond to the usual conservative therapy [12]. The
13
14 symptoms in these patients are often different and include headache, retro-orbital pain,
15
16 diplopia and exophthalmos. Because of their insidious onset, frequently resulting in
17
18 missed and delayed diagnosis, sphenoid sinus lesions are a potentially lethal medical
19
20 condition [13].
21
22
23

24 The portal of entry included in this case the respiratory tract [14, 15]. Although
25
26 sphenoid sinus involvement in fungal infections is rare, our patient presented this form
27
28 of mycosis with the involvement of important surrounding structures.
29
30

31 Rhinosinusitis is observed in many clinical forms, the prognosis is benign and
32
33 the cure is common when associated with surgical excision in an immuno-competent
34
35 patient. However, the prognosis is not good in immuno-compromised patients. No
36
37 treatment except surgery is recommended. Although amphotericin B used alone or in
38
39 combination, seems to be the best compound [16].
40
41
42

43 We gave amphotericin B to our patient keeping a strict watch on renal function
44
45 tests. After amphotericin B dose of 2g, patient was discharged. The therapeutic effect of
46
47 this medicine was best once the surgical clearance of the disease had been done.
48
49

50 **References**

51
52 1 Uri N, Cohen-Kerem R, Elmalah I, Doweck I, Greenberg E. Classification of fungal
53
54 sinusitis in immunocompetent patients. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2003; **129** (4):
55
56 372-378.
57
58
59
60

- 2 Fleming RV, Walsh TJ, Anaissie EJ. Emerging and less common fungal pathogens. *Infect Dis Clin North Am* 2002; **16**: 915-934.
- 3 Booth C. *The Genus Fusarium*. England: Commonwealth Mycological Institute, 1971: 237.
- 4 Gugnani HC, Talwar RS, Njoku-Obi ANU, Kodilinye HC. Mycotic keratitis in Nigeria: a study of 21 cases. *Br J Ophthalmol* 1976; **60**: 607-613.
- 5 Anderson B, Roberts SS, Gonzalez C, Chick EW. Mycotic ulcerative keratitis. *AMA Arch Ophthalmol* 1959; **62**: 169-179.
- 6 Collins MS, Rinaldi MG. Cutaneous infection in man caused by *Fusarium moniliforme*. *Sabouraudia* 1977; **15**: 151-160.
- 7 Kidd GH, Wolf FT. Dimorphism in a pathogenic *Fusarium*. *Mycologia* 1973; **65**: 1371-1375.
- 8 Hoog GS de, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000: 1126.
- 9 Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*. Sydney: Blackwell Publishing, 2006: 388.
- 10 Kurien M, Anandi V, Raman R, Brahmadathan KN. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. *J Laryngol Otol* 1992; **106** (8): 733-736.
- 11 Klossek JM, Kauffman-Lacroix C, Dufour X. Agent fongique et pathologie rhinosinusienne fungal infection and rhinosinusitis. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique* 2005; **45**: 25-28.
- 12 McGill TJ, Simpson G, Healy GB. Fulminant aspergillosis of the nose and paranasal sinuses: a new clinical entity. *Laryngoscope* 1980; **90**: 748-754.
- 13 Wyllie JW, Kern EB, Djalilian M. Isolated sphenoid sinus lesions. *Laryngoscope* 1973; **83**: 1252-1265.

14 Nucci M, Anaissie E. Cutaneous infection by *Fusarium* species in healthy and immunocompromised host: implications for diagnosis and management. *Clin Infect Dis* 2002; **35**: 909-920.

15 Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S. et al. *Fusarium* infection in hematopoietic stem cell transplant recipient. *Clin Infect Dis* 2004; **38**: 1237-1242.

16 Hocquette A, Grondin M, Bertout S, Mallié M. *Acremonium*, *Beauveria*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Onychocola*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Scedosporium* and *Scopulariopsis* fungi responsible for hyalohyphomycosis. *Journal de Mycologie Médicale* 2005; **15**: 136-149.



Fig 1. Clinical aspects of the patient with chronic rhinosinusitis before (A-B) and after (C-D) treatment with intravenous amphotericin B.

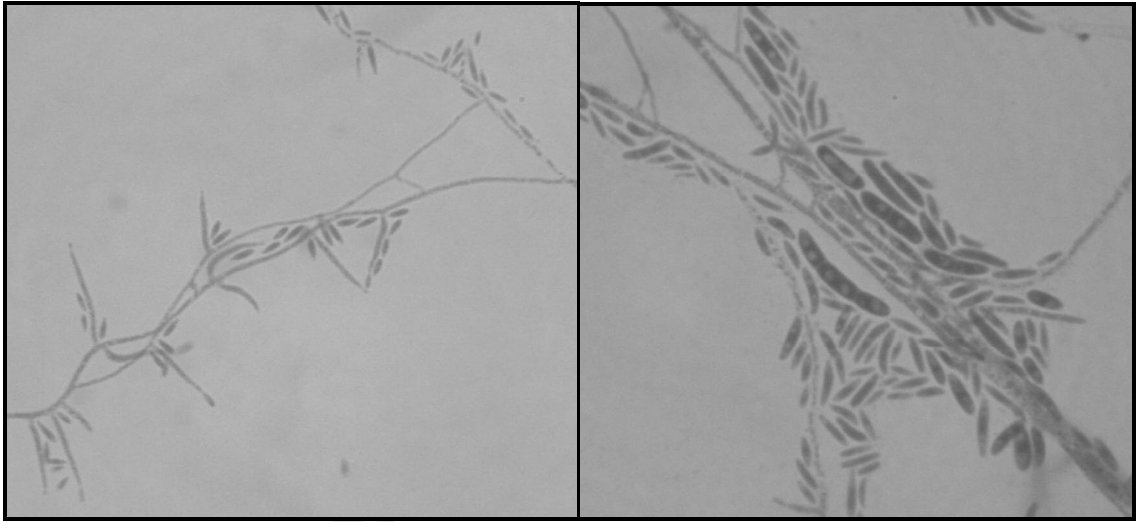


Fig 2. Conidiophores, microconidia and macroconidia characteristics of *Fusarium moniliforme*.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Medical Mycology is an international journal which focuses on original and innovative studies of all aspects of medical, veterinary and environmental mycology. The topics include, but are not limited to mycological, biochemical and molecular investigations of etiological agents of mycoses; aspects of pathogenesis, immunology, and epidemiology of mycotic diseases; case reports of unusual medical or veterinary fungal infections; laboratory approaches to the identification of fungal pathogens, antifungal therapy and prophylaxis; mode of action, pharmacokinetics and assessments of new antifungal agents; investigations of the mycological aspects of the indoor environment, with a focus on human and animal health. The aim of the journal is to present the best scientific reports from throughout the world and in so doing to provide a comprehensive reference base for medical mycologists, microbiologists, clinicians, and environmental specialists.

Further information about the Journal including links to the online sample copy, contents pages and copyright assignment form can be found on the [Journal homepage](#).

Types of Papers

Original papers. These may be of any length, but must have; (a) a Cover-Page listing all authors and their affiliations and contact information for the corresponding author, (b) a separate page for a Summary, (c) text consisting of Introduction, Materials & Methods, Results, and Discussion, (d) References, (e) Tables with footnoted descriptions of all abbreviations contained in the table, and (f) Figures, with appropriate figure legends allowing a reader to understand their content without reference to the text. Manuscripts should be in English, double-spaced, in no less than size 11 font. Pages should be numbered consecutively, beginning with the cover-page. References are to be numbered, in brackets, e.g., [1], in order of their citation in the text and listed in the Reference section by their appearance in the text.

Reviews. Authors should electronically submit an outline of not more than two, double-spaced pages, in size 11 font, to the Reviews Editor before preparing their manuscript.

Case Reports. Such articles must make a distinct, novel contribution to the understanding of the etiologic agents, its clinical manifestations, and/or its treatment. They should NOT be based merely on the first incidence of a known cosmopolitan or widely distributed etiologic agent in the nations of the authors' residence. Reports of unusual etiologic agents MUST be substantiated with a living culture deposited in an internationally recognized professional culture collection, defined as a collection that has full-time staff dedicated to receiving,

preserving and shipping of culture cultures. Manuscripts MUST be in English and prepared as is an original article, EXCEPT that the text should consist of an Introduction, Case Report and Discussion.

Short Communications. These manuscripts are to provide an opportunity for the presentation of preliminary or brief observations that do not warrant a full paper. The manuscript should be prepared as is an original article, except they may be no more than 10 double-spaced pages in no less than size 11 font (including cover-page, abstract, text, references, and tables/figures).

Letters. Letters to the Editor are intended to provide an opportunity to discuss issues related to previous published original articles, case reports or short communications and should not be used for the presentation of the authors' preliminary data from their own investigations. Letters should be no more than 2 double-spaced pages, in no less than size 11 font, including references.

Submission of manuscripts

All submissions to this journal should be made via the [Manuscript Central](#) site. Users who have not used the site before must create an account from the link on the login page. Assistance with this and all other areas of the site are available in the User Guide, which is accessed via the 'Get Help Now' button at the top right of all Manuscript Central web pages.

Preparation of manuscripts

1. Manuscripts must be written in English and submitted as a Word for Windows (PC) file.
2. Manuscripts should be prepared with one (1) inch margins all around and double spaced.
3. Papers should be organized as follows: Full title and Short title; Name(s) and affiliations of author(s); Full postal address, telephone and fax numbers, and email address for the corresponding author; Summary (maximum 200 words); Keywords (up to five); Introduction; Materials and Methods; Results; Discussion (as appropriate to the article); Acknowledgements; References; Tables; Figure captions.
4. Statistics and measurements should be given in numerals when followed by a unit (e.g. 2 mg but two patients). SI units must be used.
5. Abbreviations should be defined when first used in the text.

References

Use the Vancouver system in preparing the references. They should be numbered sequentially in the order in which they first appear in the text. References should be cited in the text within brackets. e.g., [1]. In preparing your reference list, please note that works with six (6) or more authors should be cited

by the names of the first three (3) authors, with the remaining authors included by et al. Journal names must be abbreviated without the use of periods and should be in italic font. The journal number should be in bold font and issue numbers should not be included. In addition, include all page numbers of the citations. The following examples illustrate the correct style for the different types of references:

1. Journal article

Author AB, Author CD, Author EF, et al.[if six or more] Title of paper. J Title Abbrev 1995; 00: 000-000.

2. Book chapter

Author AB, Author CD, Author EF, et al. [if six or more] Chapter title. In: Editor AB, Editor CD, eds.
Book Title With Initial Uppercase Letters, 5th edn. Place: Publisher, 1995: 000-000.

3. Book

Author AB, Author CD (eds). Book Title With Initial Upper-case Letters, 5th edn. Place: Publisher, 1995.

4. Thesis

Author AB. Paper title with lowercase initials to all words. PhD thesis, University, 1995.

5. Conference proceedings

Author AB. Paper title. In: Editor AB, ed. Proceedings Title, place, date. Place: publisher, 1995: 000-000 (for abstracts the abstract number should be cited instead of the page number).

6. Personal communications, Unpublished results etc

References to personal communications, unpublished results and papers submitted for publication (but not yet accepted) should only appear in the text, and in the following form: [A. B. Author, unpublished results]. [C. D. Author, personal communication].

7. Journal article on the Internet

Aboud S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. Am J Nurs [serial on the Internet]. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from:
<<http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>>

8. Monograph on the Internet

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <<http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>>

9. Homepage/Web site

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul 9]. Available from: <<http://www.cancer-pain.org/>>

10. Part of a homepage/Web site

American Medical Association [homepage on the Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug 23; cited 2002 Aug 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <<http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>>

11. Database on the Internet

Open database:

Who's Certified [database on the Internet]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists. c2000 - [cited 2001 Mar 8]. Available from: <<http://www.abms.org/newsearch.asp>>www.abms.org/newsearch.asp>

Closed database:

Jablonski S. Online Multiple Congenital Anomaly/Mental Retardation (MCA/MR) Syndromes [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). c1999 [updated 2001 Nov 20; cited 2002 Aug 12]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html>

12. Part of a database on the Internet

MeSH Browser [database on the Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2002 - [cited 2003 Jun 10]. Meta-analysis; unique ID: D015201; [about 3 p.]. Available from: <<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser>>www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser> Files updated weekly.

Tables

Tables should be numbered according to their sequence in the text; all tables should be referred to in the text. Each table should be supplied on a separate sheet, never within the body of the text. The table heading should be brief and self explanatory. Column headings should be brief and include units in parentheses where applicable. Only horizontal rules should be used.

Figures

Graphics may be submitted as TIF, JPEG, GIF, or BMP files (all in PC format). Scanned images should be of a sufficient resolution: 300 dpi for halftones/color; 500 dpi for combination halftones; 1000–1200 dpi for line art. Illustrations should be submitted separate from the manuscript text file, either as individual files or together in a single file.

Nomenclature

Proposals for names of new taxa of fungi must conform with the requirements of the current International Code of Botanical Nomenclature, as should the scientific names used for fungi. Binomials should appear in italics or be underlined in the text; each must be spelt out in full at first mention both in the summary and the text; thereafter the generic name may be abbreviated appropriately.

Animals in research

Manuscripts containing information related to the experimental use of animals must clearly state that the studies complied with relevant professional and institutional animal welfare policies. Specifically, that procedures involving animals conformed to the ILAR Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1996 and later editions) of the Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council (<http://www.nap.edu/catalog/5140.html>).

Copyright

It is a condition of the publication that authors vest or license copyright in their articles, including abstracts, in (Taylor & Francis Ltd or the name Society, Association, body or person that holds the copyright). This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the material elsewhere after publication providing that prior permission is obtained from Taylor & Francis Ltd. Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources. To view the 'Copyright Transfer Frequently Asked Questions please visit <http://www.tandf.co.uk/journals/copyright.asp>.

Please note that Taylor & Francis are signatories of, and respect the spirit of, the STM Agreement regarding the free sharing and dissemination of scholarly information.

Editorial Manager(tm) for Mycopathologia
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Aspergillosis in immuno-suppressed patients: four clinical reports about this opportunistic pathology in Brazil

Article Type: Brief Report

Section/Category:

Keywords: Aspergillus fumigatus; opportunistic mycosis; risk factors.

Corresponding Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

First Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Order of Authors: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress; Rejane P Neves, PhD; Heraldo-Maia S Júnior; Maria José S Fernandes; Cristina M Souza-Motta, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Aspergillus is a ubiquitous fungus which can cause a variety of clinical syndromes. Here we describe four cases of aspergillosis caused by A. fumigatus in immuno-suppressed patients. The report underscores the importance of risk factors for early identification of Aspergillus infection.

Aspergillosis in immuno-suppressed patients: four clinical reports about this opportunistic pathology in Brazil

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo¹; *Rejane Pereira Neves¹; Heraldo Maia Silva-Júnior²; Maria José S. Fernandes¹; Cristina Maria de Souza-Motta¹

¹Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº- Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil. ²Hospital Geral Otávio de Freitas, Av. Guimarães s/nº, Recife, PE, Brasil.

Financial support: Capes

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife, PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

Aspergillosis in immuno-suppressed patients: four clinical reports about this opportunistic pathology in Brazil

Abstract

Aspergillus is a ubiquitous fungus which can cause a variety of clinical syndromes. Here we describe four cases of aspergillosis caused by *A. fumigatus* in immuno-suppressed patients. The report underscores the importance of risk factors for early identification of *Aspergillus* infection.

Key words: *Aspergillus fumigatus* - opportunistic mycosis – risk factors.

Introduction

The incidence of invasive aspergillosis has increased during the last decade due to the widespread use of powerful immunosuppressive drugs used for the treatment of diseases such as systemic lupus erythematosus, peritonitis, endocarditis, pulmonary tuberculosis and diabetes. Pulmonary aspergillosis is by far the most frequent clinical picture and the degree of immunosuppression is the main factor influencing the evolution, dissemination and morbidity of the infection [1].

Fungal infections develop slowly in immuno-competent patients and rarely become a severe medical problem. However, they progress rapidly and usually prove fatal in immuno-compromised patients. Early diagnosis and treatment are essential for survival [2]. Here we report four cases of *A. fumigatus* aspergillosis in immuno-compromised patients and focus on some of the factors that were important in influencing clinical outcome.

Patients and Methods

Case 1

A 34-year-old woman was diagnosed with systemic lupus erythematosus in 2000 and treated with glucocorticoids (10mg of prednisolone orally daily for 21 days) plus ciprofloxacin (100 mg orally daily for 21 days). The patient was discharged in 2002 following improvement in clinical and laboratory tests. However, later that year the patient presented again with intense abdominal pain, high fever and renal failure.

The patient developed fungal peritonitis as a consequence of continuous peritoneal dialysis. *A. fumigatus* was identified as the cause by direct examination of

fresh abdominal fluid (peritoneal effluent) and culture on Sabouraud agar with 50mg chloranphenicol/L [3].

As soon as the diagnosis of fungal peritonitis was confirmed, amphotericin B (1 mg/kg/day) was given intravenously in increasing doses up to a total dose of 1.13 g. The peritoneal catheter was removed and the patient was successfully treated.

Comments

Prompt systemic antifungal therapy and removal of the dialysis catheter were both essential for survival of this patient [4, 5]. Several fungal species have been implicated as causal agents in dialysis-related peritonitis, including *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Acremonium* [6] and patients with systemic lupus erythematosus are easily infected with fungi, bacteria, or other infectious organisms [7, 8, 9]. In this instance, the dialysis catheter may have been contaminated and probably served as a portal of entry.

Case 2

A 45-year-old hypertensive male with prior history of cardiac insufficiency was submitted for an aorto-femoral bypass graft. After the procedure, the patient developed a lesion on surgical cut on the left leg and a biopsy revealed histopathologic changes typical of *Aspergillus* species.

A few months later, the patient presented with again cardiac problems. An aortic aneurysm was diagnosed and the patient was immediately submitted for surgery. An aortic fragment was sent to the mycology laboratory. Direct mycological exam revealed dichotomous branching and septation of hyphae. The culture was positive for *A. fumigatus* after 48 hours of incubation.

Surgical excision of the aneurysm and therapy with amphotericin B were unsuccessful. The patient died of cardiac complications of invasive aspergillosis.

Comments

Until recently, mycotic infections of the heart were relatively uncommon but may be increasing in frequency as a result of opportunistic infection [10, 11, 12]. These new cases are often associated with disseminated fungal infection and are usually fatal [13].

Case 3

A 56-year-old man was admitted in 2002 to a public hospital presenting with pulmonary tuberculosis, a chronic cough and hemoptysis. The chest radiograph showed a mass like a fungus ball colonizing the right lung and the presence of discrete fibro-nodular infiltrations.

Fragments of the lobe were sent submerged in physiological serum to Medical Mycology Laboratory at the Federal University of Pernambuco. Direct examination was performed after first clarifying the sample fragment with 20% potassium hydroxide solution. Fragments were inoculated onto Sabouraud agar with 50mg chloranphenicol/L and incubated either at room temperature ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) or at 37°C for 15 days. The presence of *A. fumigatus* was confirmed after culture.

Therapeutic strategies consisted of ciprofloxacin-400mg, clindamicin-500mg and fluconazole-200mg with good results and after one month the patient was discharged.

Comments

The symptoms of a pulmonary fungal infection are often nonspecific and include fever, malaise, cough, hemoptysis, and chest pain. Chest radiography may show nonspecific

nodules, infiltrates and cavities. Early diagnosis and treatment of fungal infections is essential for the survival of immuno-compromised patients. Fungal infection should always be considered during the diagnosis of immuno-compromised patients [2].

Case 4

Patient 4 was 43-year-old immuno-compromised female first admitted to the hospital in 2002 suffering from pulmonary tuberculosis. She returned in 2005 presenting with a chronic cough, hemoptysis and serious diabetes mellitus. On second admission the chest radiograph showed a large cavity in the left upper pulmonary quadrant and a mass like a fungus ball colonizing it. The radiograph also showed the presence of discreet fibro-nodular infiltrations. She was submitted for lobectomy. Therapeutic strategies consisted of ciprofloxacin-400mg and clindamicin-500mg before, and hydrocortizone-500mg with fluconazole-200mg after the surgery, but with no results. Nine days after lobectomy the patient died.

Immediately after surgery, fragments of the lobe were sent submerged in physiological serum to Medical Mycology Laboratory at the Federal University of Pernambuco. Direct examination was performed after first clarifying the sample fragment with 20% potassium hydroxide solution. Fragments were inoculated onto Sabouraud agar with 50mg chloranphenicol/L in Petri dishes and incubated either at room temperature ($28^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) or at 37°C for 15 days. The pure culture was transferred to a surface of Czapeck medium for identification. Macroscopically the culture produced a flat, white colony which quickly became gray-green with the production of conidia. The texture varied from strictly velvety to deep felt, floccose. The reverse was colorless. The conidia mass of the conidial heads were columnar, compact, and

crowded. They ranged in size from 200-400 μ by 50 μ . Microscopically the conidiophores were short, smooth, up to 300 μ in length and 5-8 μ in diameter (Figure 1). These characteristics uniquely identified *A. fumigatus* [3].

Comments

The true incidence of aspergilloma is not known [14]. The principal clinical features of pulmonary intra-cavity colonization are recurrent hemoptysis varying from small episodes of blood-tinged sputa to fatal hemorrhage, particularly in patients with underlying tuberculosis. The mortality due to hemoptysis is considerably higher and with the presence of *Aspergillus* infection has a poor prognosis especially when associated with diabetes [15, 16].

Conclusions

Semi-invasive aspergillosis tends to occur in patients whose immune systems are mildly depressed, for example, because of chronic obstructive lung disease or diabetes [17, 18]. Although patient 4 had a history of diabetes mellitus and had also severe pulmonary tuberculosis it was impossible for us to document the radiological progression of the disease or clearly ascertain whether it was a classical form of aspergilloma or the consequence of this newly characterized form of cavitary colonization (semi-invasive aspergillosis). Since diagnosis is often delayed, the outcome of these infections is frequently fatal [19].

Poor responses to antibiotics and infiltrations on X-ray or CT-scan were the first indication of a fungal infection. The sites of infection may be diverse as described in our paper. Cases 1 and 3 recovered and discharged. Patients 2 and 4 died because of an uncontrolled infectious process.

Disseminated *Aspergillus* infection has a poor prognosis, but few reports have been published on extra-pulmonary involvement in aspergillosis. Extra-pulmonary aspergillosis produces different manifestations according to involved organs. It may affect heart, kidney, central nervous system, gastrointestinal tract, spleen, liver, thyroid gland and pancreas. To improve prognosis of aspergillosis it is important to recognize the clinical features of extra-pulmonary aspergillosis and to institute aggressive anti-fungal treatment [14].

Local invasion and dissemination with a high rate of mortality are frequently seen with *A. nidulans* infection [3]; however, our patients had *A. fumigatus*. In the current era of widespread use of broad spectrum antibiotics, corticosteroids, cyto-toxic agents and immuno-suppressants, new species of fungi are emerging as sources of serious respiratory and systemic infections and have therefore gained considerable public health importance [20]. This report underscores the importance of *A. fumigatus* infection as severe condition and abruptly fatal associated with pre-existing conditions such as systemic lupus erythematosus, cardiac problems, pulmonary tuberculosis and diabetes mellitus.

Acknowledgements

This study was supported by grants of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

1. Lumbreras C, Gavalda J. Aspergilosis invasora: manifestacions clíniques y tratamiento. Rev Iberoam Micol 2003; 20: 79-89.

2. Lin CM, Tsai YH, Huang CC, Lee CH, Chiang PC, Huang SF, Liu HP. Invasive pulmonary aspergillosis and pulmonary cryptococcosis really coexist in immunocompromised host. *Journal of Infection* 2006; 53:55-58.
3. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. Louisiana: Centraalbureau voor Schimmelcultuur Utrecht/ The Netherlands, 2002; 116p.
4. Bibashi E, Memmos D, Kokolina E, Tsakiris D, Soanou D, Papadimitriou M. Fungal peritonitis complicating peritoneal dialysis during an 11-year period: report of 46 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 36:927-931.
5. Nannini EC, Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L. Peritonitis due to *Aspergillus* and zygomycetes in patients undergoing of vancomycin versus cefazolin as initial therapy for peritonitis peritoneal dialysis: report of 2 cases and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; 46:49-54.
6. Wang AY, Yu AW, Li PK, Lam PK, Leung CB, Lai KN, Lui SF. Factors predicting outcome of fungal peritonitis in peritoneal dialysis: analysis of a 9-year experience of fungal peritonitis in a single center. *Am J Kidney Dis* 2000; 36, 1183-1192.
7. Bouza E, Moya JG, Munoz P. Infections in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Infect Dis Clin North Am* 2001; 15:335-361.
8. Greenberg SR. Infections in the immunocompromised rheumatologic patient. *Crit Care Clin* 2000; 18:931-956.
9. Schattner A, Kagan A, Zimhony O. *Aspergillus* peritonitis in a lupus patient on chronic peritoneal dialysis. *Rheumatol Int* 2006; 26: 762-764.
10. Walsh TJ, Hutchins GM. *Aspergillus* mural endocarditis. *Am J Clin Pathol* 1979; 71: 640-644.

11. Atkinson JB, Conner DH, Robinowitz M, McAllister HA, Virmani P. Cardiac fungal infections: review of autopsy findings in 60 patients. *Hum Pathol* 1984; 15: 935-942.
12. Cox JN, di Dio F, Pizzolato GP, Lerch R, Pochon N. *Aspergillus* endocarditis and myocarditis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). A review of the literature. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1990; 417: 255-259.
13. Muehrcke DD. Fungal prosthetic valve endocarditis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 1995; 7: 20-24.
14. Hori M, Kami Y, Kishi U, Machida T, Matsumura Kashima T. Clinical significance of extra-pulmonary involvement of invasive aspergillosis: a retrospective autopsy-based study of 107 patients. *J Hospital Infect* 2002; 50(3): 175-182.
15. Denning DW. Invasive aspergillosis. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 781-805.
16. Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(2): 310-350.
17. Miller WT. Aspergillosis: a disease with many faces. *Sem Roentgenol* 1996; 31: 52-66.
18. Geftter WB, Weingard TR, Epstein DM, Ochs RH, Miller WT. "Semi-invasive" pulmonary aspergillosis: a new look at the spectrum of *Aspergillus* infections of the lung. *Radiology* 1981; 140: 313-321.
19. Randhawa HS. Respiratory and systemic mycosis: an overview. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2000; 42(4): 207-219.
20. Kim JH, Kang WH. Acquired reactive perforating collagenosis in a diabetic patient with pulmonary aspergillosis. *Cutis* 2000; 66(6): 425-430.

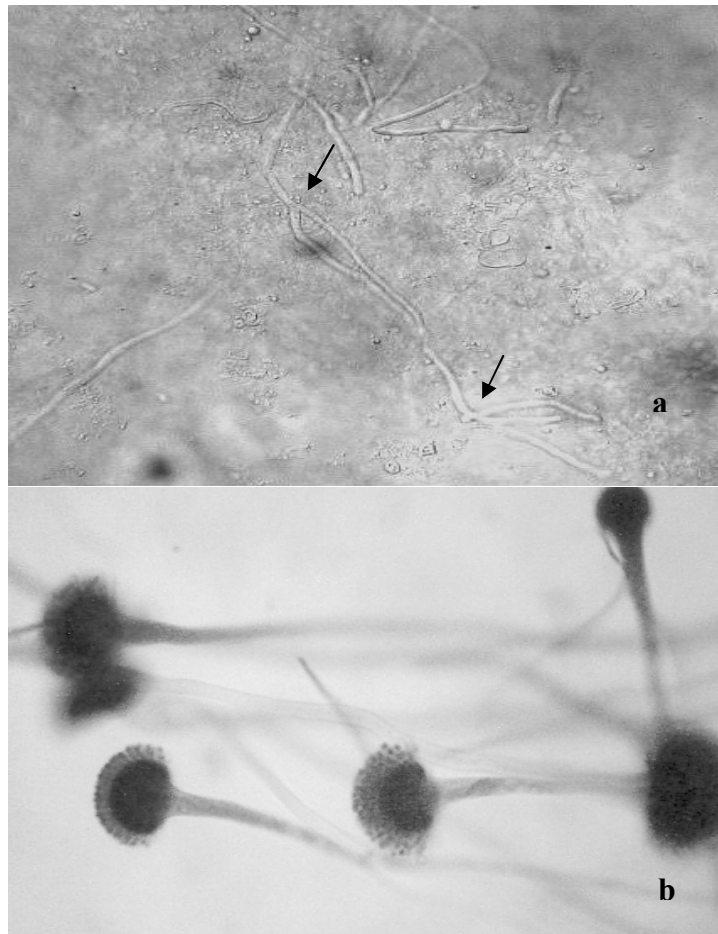


Figure 1. Direct examination with dichotomous branching and septation of hyphae (a).

Typical conidiophores of *Aspergillus fumigatus* (b).

Editorial Manager(tm) for Mycopathologia
Manuscript Draft

Manuscript Number: MYCO504

Title: Opportunistic onychomycosis by *Trichophyton rubrum*, proteinase activity and iturin A susceptibility

Article Type: Brief Report

Section/Category:

Keywords: Onychomycosis; *Trichophyton rubrum*; AIDS; proteinase, iturin A.

Corresponding Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

First Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Order of Authors: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress; Rejane P Neves, PhD; Flávia C Lopes, graduation student

Manuscript Region of Origin:

Abstract: *Trichophyton rubrum* is the most commonly observed dermatophyte, with incidence in superficial fungal infections. In this study we reported one case of *T. rubrum* opportunistic onychomycosis in AIDS patient and verified proteinase activity and iturin A "in vitro" susceptibility of this species. Diagnosis was based on mycological examination (direct microscope observation and culture). For proteinase detection, casein milk was used as substrate and iturin A, a peptidolipid from *Bacillus subtilis*, for antifungal susceptibility test. *T. rubrum* exhibited proteinase activity and was susceptible to iturin A, active against this dermatophyte.

Opportunistic onychomycosis by *Trichophyton rubrum*, proteinase activity and iturin A susceptibility

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, *Rejane Pereira Neves & Flávia Cadengue Lopes

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE Av. Prof. Nelson Chaves, s/nº Cidade Universitária, CEP: 50670-420, PE, Brazil.

Financial support: Capes

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife, PE, Brasil. 51030-390

Fax: (+5581) 2126-8482

Opportunistic onychomycosis by *Trichophyton rubrum*, proteinase activity and iturin A susceptibility

Abstract

Trichophyton rubrum is the most commonly observed dermatophyte, with incidence in superficial fungal infections. In this study we reported one case of *T. rubrum* opportunistic onychomycosis in AIDS patient and verified proteinase activity and iturin A “*in vitro*” susceptibility of this species. Diagnosis was based on mycological examination (direct microscope observation and culture). For proteinase detection, casein milk was used as substrate and iturin A, a peptidolipid from *Bacillus subtilis*, for antifungal susceptibility test. *T. rubrum* exhibited proteinase activity and was susceptible to iturin A, active against this dermatophyte.

Key words: Onychomycosis, *Trichophyton rubrum*, AIDS, protease, iturin A.

Introduction

Onychomycosis is an important medical disorder involving both the patient's health and quality of life. The incidence of superficial fungal infections in AIDS varies between 46 and 80%, and includes cutaneous dermatoses and onychomycosis [1]. Onychomycosis is caused primarily by dermatophytes, *Candida* species, and nondermatophytic molds. Dermatophytes, particularly *Trichophyton rubrum*, are by far the most common pathogenic filamentous fungus of increasing medical concern [2-4].

Proximal sub-ungual onychomycosis without fingernail or toenail paronychia is generally caused by *T. rubrum* in immunodepressed subjects (AIDS). Initial proximal leuconychia progresses to the distal part of the nail. *T. rubrum* is the most frequently dermatophyte species isolated in the immunosuppressed host [1, 5].

Secreted proteases constitute potential virulence factors of dermatophytes [6]. *T. rubrum* parasitizes the keratinized tissues of humans and proteinases secreted by this organism could function to allow this fungus to metabolize and invade host tissues [7]. Disease may occur when the fungus reaches stationary phase and when proteinases are secreted constitutively. These enzymes may directly or indirectly incite a host response, resulting in the inflammatory manifestations of dermatophytosis [8].

The need for safe and effective antifungal agents increases in parallel with the expanding number of immunocompromised patients at risk for invasive fungal infections. The emergence of fungal pathogens resistant to current therapies further compounds the dearth of antifungal agents. Currently available antifungal compounds act on targets also found in mammalian cells [9], which may result in toxicity or an adverse drug interaction. It is therefore imperative to find antifungal compounds that are not toxic to mammalian cells. The past decade has witnessed a dramatic growth in knowledge of natural peptides [10].

Here we report one case of *T. rubrum* onychomycosis in AIDS patient and characterize the isolate with emphasis on the importance of culture and proteinase activities and iturin A antifungal susceptibility “*in vitro*”.

Materials & Methods

The patient is a 41-years-old male, living as a cook in Camaragibe (Recife Metropolitan Region - Pernambuco State, Brazil), HIV-positive, presenting disseminated tuberculosis and schistosomiasis with suspected opportunistic onychomycosis. He was examined for causative fungal agents.

At Medical Mycology Laboratory (Department of Mycology, Federal University of Pernambuco), the sample was collected and processed. The nails were initially cleaned with 70% alcohol, and samples were collected with a sterilized scalpel. The first layer of lesion scrapings was discarded to eliminate contaminating organisms. The other parts of the scrapings were stained with 20% potassium hydroxide (KOH) to help to dissolve the keratin and debris, facilitating direct microscopy of fungal elements. For culture, specimens were inoculated on Sabouraud dextrose agar (Difco) with chloranphenicol (50mg/L) contained in Petri dishes, incubated at 28⁰C for 15 days and the identification was made according to Hoog et al. [11].

Determination of proteinase production was performed according to Aoki et al. [12]. The strain grown for ten days was inoculated on the referred culture medium containing milk casein as substrate. Culture was observed for 15 days for formation of a transparent zone of precipitation, measured in centimeters. Proteinase activity was measured and calculated according to the method described by Prince et al. [13] in terms of the ratio of the diameter of the colony and that of the colony plus the precipitation zone (Pz). The study was repeated to calculate an average of the Pz values and for interpretation considered: Pz between 0.9 and 1 (+) very high, 0.89-0.80 (++)

high, 0.79-0.70 (+++) low, and Pz minor 0.69 (++++ very low. According to this system a lower Pz ratio corresponds with a higher enzyme activity (higher virulence).

Conidia of the isolate were suspended in an aqueous solution at a concentration of 10^6 conidia/mL, and spread evenly on the agar surface of Petri plates containing Sabouraud agar (Difco). Sterile Whatman #4 filter paper disks (7mm in diameter) were impregnated with 3 μ L of iturin A (Sigma) concentrations of 7.7, 1.54 and 0.308mg/mL dissolved in methanol, resulting in final amounts of 23.1, 4.62, 0.924 μ g of iturin A per disk (Table 1). One set of disks served as controls and received only the methanol. The disks were air dried before they were placed on the seeded Petri plates. Three disks, one with each iturin A concentration, and a control, were placed on each plate. All plates were incubated for four days at 25°C in the dark. The diameter of the zone of inhibition (including the filter paper disk) was measured and recorded [14].

Results and Discussion

The patients clinically showed fingernail infection, proximal subungueal hyperkeratosis, onychodystrophia and periungueal inflammation. The discrimination of onychomycosis from endogenous diseases showing macroscopically similar symptoms is difficult [15].

T. rubrum is the most commonly observed dermatophytosis isolated from humans in European countries. This species is especially dominant in onychomycosis with a prevalence of approximately 80% [16]. In nail infections, *T. rubrum* destroys keratin and forms channels and sizeable lacunae in the nail plates. These are considerably larger than the hyphae within them, implying the occurrence of extracellular enzymatic activity [6].

Direct microscopic examination of the nail showed arthrospores and septate, hyaline hyphae (Figure 1). Culture on Sabouraud dextrose agar produced cottony

colonies, white, and reverse wine-red. Macroconidia were mostly absent and microconidia pyriform, sessile alongside undifferentiated hyphae typical of *T. rubrum* (Figure 1). Dermatophytes appear to be the chief organisms capable of a primary attack on the nail. By far the most frequent isolated from nails is *T. rubrum* [17].

Physicians prescribed a fluconazole (200mg/day) therapy. After seven months the lesions had disappeared almost completely, but treatment was continued for after four months.

Proteinase activity was detected on specie tested and Pz value was found as 0.89. The literature have pointed out that anti-retroviral agents utilized in AIDS patients may cause proteinase inhibition in fungus [18]. Protease activity is considered to play important role in the pathogenesis of opportunistic fungi [19]. These secreted proteases are related to nutrient uptake, lesion extension and host immune responses elicitation in the process of *T. rubrum* infection. These results provide a clue to further research on the infection and pathogenicity of the dermatophyte [20]. Onychomycosis is basically associated with proteolytic attacks of the virulent fungi-secreting proteases partly hydrolyzing the horn material. Endogenous diseases lack these proteolytic activities, conserving intact structural proteins [15].

The iturin A test for *T. rubrum* showed a diameter of the zone of inhibition of 9mm, and the strain was sensitive at the highest concentration at 7.7mg/mL. However, in the concentrations of 1,54mg/mL and 0,308mg/mL demonstrated resistance. Initial clinical trials involving humans and animals showed that lipopeptides antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, especially iturin A, was effective against dermatomycoses and had a wide spectrum of antifungal properties and low allergenic effect [10].

Antifungal peptides are classified by their mode of action which occurs via several mechanisms [21].

Treatment should not be instituted on clinical grounds alone; diagnostic culture should guide the proper choice of antifungal drug to prevent inappropriate and unnecessary drug prescription. The advent of new and more effective antifungal has led to a greater interest among sufferers to seek medical treatment [4].

In immunocompromised patients, onychomycosis may be a possible portal of entry for systemic infection. Therefore, because of its invasive potential, these infections require more attention for correct identification, strain pathogenicity and treatment [22, 23].

This *T. rubrum* isolate has been maintained under mineral oil (number 5307) at URM Culture Collection of Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Acknowledgements

This study was supported by grants of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

1. Muñoz-Pérez MA, Rodríguez-Pichardo A, Camacho F, Ríos J, JJ. Extensive and deep dermatophytosis caused by *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitalis* in an HIV-1 positive patient. Eur Acad Dermatol Venereol 2000; 14: 61-63.
2. EG, Evans. Causative pathogens in onychomycosis and the possibility of treatment resistance: a review. J Am Acad Dermatol. 1998; 38(5): 32-36.
3. Yu L, Zhang W, Wang L, Yang J, Liu T, Peng J, Leng W, Chen L, Li R, Jin Q. Transcriptional Profiles of the Response to Ketoconazole and Amphotericin B in *Trichophyton rubrum*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 23: in press.

4. Sayed El F, Ammoury A, Haybe R.F, Dhaybi R. Onychomycosis in Lebanon: a mycological survey of 772 patients. *Mycoses* 2006; 49(3): 216-219.
5. Goettmann-Bonvallet S. Clinical types of onychomycosis. *Ann Dermatol Venereol* 2003; 130(12): 1237-1243.
6. Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004; 339 (15): 79-88.
7. Apodaca G, McKerrow JH. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. *J Med Vet Mycol* 1990; 28(2): 159-171.
8. Apodaca G, McKerrow JH. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infect Immun* 1989; 57(10): 3081-3090.
9. Debono M, Gordee R S. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 471-497.
10. De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal Peptides: Novel Therapeutic Compounds against Emerging Pathogens. Minireview. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(1): 1-11.
11. Hoog GSde, Guarro J, Gene' J, Figueiras MJ. Atlas of Clinical Fungi (2nd ed.). Utrecht/Reus: CBS/Universitat Rovira i Virgili, 2000.
12. Aoki S, Ito-Kuwa S, Nakamura K, Ninomiya K, Vidotto V. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia* 1994; 128: 143-150.
13. Price MF, Walkison ID, Gentry LO. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 1982; 20: 7-14.
14. Klich MA, Lax AR, Bland JM. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 1991; 116(2): 77-80.

15. Hollemeyer K, Jager S, Altmeyer W, Heinzle E. Proteolytic peptide patterns as indicators for fungal infections and nonfungal affections of human nails measured by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2005; 338(2): 326-331.
16. Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, Le'chenne B, Baudraz F, Panizzon R. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area (Switzerland). *Dermatology* 2002; 205: 201- 203.
17. Tasic S, Stojanovic S, Poljacki M. Etiopathogenesis, clinical picture and diagnosis of onychomycoses. *Med Pregl* 2001; 54(1-2): 45-51.
18. Chaves GM, Cavalcanti MAQ, Porto ALF. Características de patogenicidade de amostras de leveduras preservadas e recém-isoladas. *Braz J Microbiol* 2003; 34(3): 197-202.
19. Kantarcioglu AS, Yucel A. Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. *Mycoses* 2002; 45(5-6):160-165.
20. Leng WC, Wang LL, Wei CD, Yang J, Jin Q. Analysis of secreted proteases of *Trichophyton rubrum*. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2005; 45(4): 601-605.
21. Shai Y. Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(11): 460-464.
22. Baran R, Tosti A, Piraccini BM. Uncommon clinical patterns of *Fusarium* nail infection: report of three cases. *Br J Dermatol* 1997; 136: 424-427.
23. Godoy P, Nunes E, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fishman O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brasil. *Mycopathologia* 2003; 157(3): 287-290.

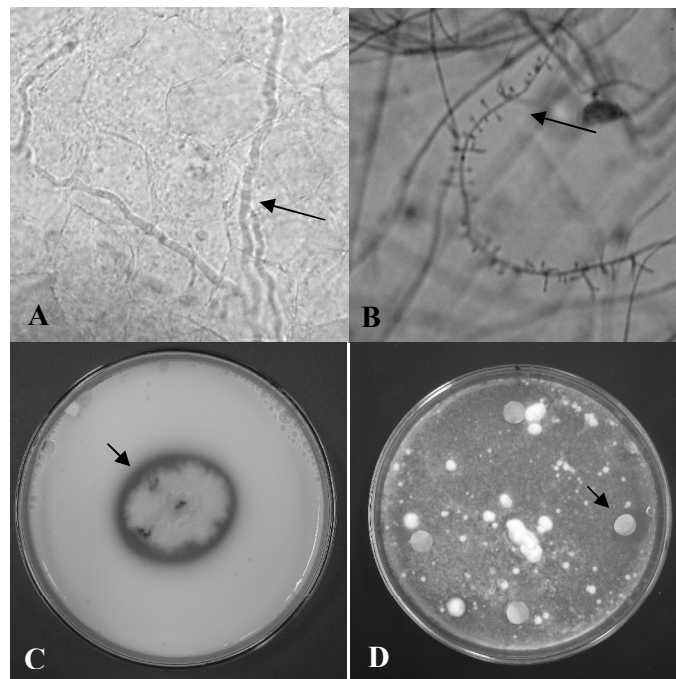


Figure 1. Direct examination (A), microscopic characteristics of *Trichophyton rubrum* (B), proteinase activity in casein agar medium with halo formation (C) and antifungal susceptibility to iturin A at 7.7mg/mL (D).

Editorial Manager(tm) for Mycopathologia
Manuscript Draft

Manuscript Number: MYCO505

Title: Inhibition of opportunistic fungi by iturin A: a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*

Article Type: Brief Report

Section/Category:

Keywords: opportunistic fungi, iturin-A, antifungal activity.

Corresponding Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

First Author: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress

Order of Authors: Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, M.D. in progress; Rejane P Neves, PhD; Polyanna N Herculano, MD; Luciana R Bandeira de Melo, MD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: *Bacillus subtilis* produces iturin A, a peptidolipid that have shown antifungal properties. In this study clinical samples from immunocompromised patients were investigated for the incidence of opportunistic fungi and activity of iturin A was tested. Paper disks impregnated with various concentrations of iturin A were placed on agar plates seeded with cell suspension of species of *Candida*, *Trichosporon* and *Paracoccidioides brasiliensis*. Most isolates were inhibited at iturin A concentrations as low as 5µg/disk and *P. brasiliensis* was strongly inhibited.

Inhibition of opportunistic fungi by iturin A: a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*

Danielle Patrícia Cerqueira Macêdo, *Rejane Pereira Neves, Polyanna Nunes Herculano
& Luciana Rezende Bandeira de Melo

Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*Corresponding author: rejadel@yahoo.com.br

R. José Paraíso, 135/01, Boa Viagem, Recife-PE, Brasil. 51030-390

Fax: (81) 2126-8570

Inhibition of opportunistic fungi by iturin A: a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*

Abstract

Bacillus subtilis produces iturin A, a peptidolipid that have shown antifungal properties. In this study clinical samples from immunocompromised patients were investigated for the incidence of opportunistic fungi and activity of iturin A was tested. Paper disks impregnated with various concentrations of iturin A were placed on agar plates seeded with cell suspension of species of *Candida*, *Trichosporon* and *Paracoccidioides brasiliensis*. Most isolates were inhibited at iturin A concentrations as low as 5µg/disk and *P. brasiliensis* was strongly inhibited.

Key words: opportunistic fungi; iturin-A; antifungal activity.

Introduction

The frequency of mycoses due to opportunistic species has increased significantly over the past two decades, and is directly related to increasing patient populations at risk, which includes individuals undergoing solid-organ transplantation, and major surgery and those with AIDS, neoplastic disease, immunosuppressive therapy, advanced age, diabetics and other underlying host conditions [1, 2, 3, 4].

Given the complexity of the patients at risk for infection and the diverse and increasing array of fungal pathogens, opportunistic mycoses pose considerable diagnostic and therapeutic challenges. Some fungi are inherently nonsusceptible to standard azole or polyene therapy and may require the use of alternative antifungal agents [4].

In recent years, there is a considerable interest in using *Bacillus subtilis* producing lipopeptides antibiotics like iturin A, especially against plant pathogens [5, 6].

This paper describes the antifungal properties of iturin-A against opportunistic fungi isolated from different clinical specimens of immunocompromised patients.

Materials and methods

In this study 23 fungi strains were obtained from clinical specimens (feces, urine, sputum, tissue biopsy, broncoalveolar lavage, peritoneal fluid and tracheal secretion) of immunocompromised patients. *Candida albicans* (10), *C. parapsilosis* (8), *C. tropicalis* (2), *C. guilliermondii* (1), *Trichosporon cutaneum* (1) and *Paracoccidioides brasiliensis* (1) were used in iturin A test. These isolates were stocked at International URM Culture Collection of Department of Mycology, Federal University of Pernambuco, Brazil.

Bioassay

Cells of each 23 fungal isolates were suspended in an aqueous solution at a concentration measured by the absorbance at 600nm, and spread evenly on the agar surface of Petri plates containing Sabouraud agar (Difco). Sterile Whatman #4 filter paper disks (7mm in diameter) were impregnated with 3 μ L of iturin A (Sigma) concentrations of 7.7, 1.54 and 0.308mg/mL dissolved in methanol, resulting in final amounts of 23.1, 4.62, 0.924 μ g of iturin A per disk (Table 1). One set of disks served as controls and received only the methanol. The disks were air dried before they were placed on the seeded Petri plates. Three disks, one with each iturin A concentration, and a control, were placed on each plate. All plates were incubated for four days at 25°C in the dark. The diameter of the zone of inhibition (including the filter paper disk) was measured and recorded [5, 7].

Results and discussion

The diameters of the zones of inhibition are given in Table 1. All of the strains tested were sensitive to iturin A at the highest concentration. Differences in sensitivity to iturin A were quite evident at 7.7mg/mL. At this concentration, *C. albicans* (5380, 5311), *C. parapsilosis* (5309), *C. tropicalis* (5359) and *P. brasiliensis* (5169) were inhibited and showed zones that ranged from 8.45 to 17mm. However, *C. albicans* (5383) and *C. parapsilosis* (5288, 5384) were resistant on all concentrations. *T. cutaneum* were inhibited at the concentrations 7.7 and 1.54 mg/mL. Interestingly *P. brasiliensis* demonstrated high sensibility to iturin A, inhibited in all tested concentrations (Figure 1).

The results show predominance of *C. albicans* in immunocompromised patients and the resistance of one *C. albicans* isolate obtained from sputum. Considering the

sensibility from majority of the isolates to iturin A the test demonstrated efficacy as the active ingredient useful for preventing and curing fungal diseases.

Iturins have been used as medical and veterinary antifungal compounds [8, 9] with few toxic effects. Although we have demonstrated the efficacy of iturin A *in vitro*, many *in vivo* tests remain to be done.

The inhibitory effects of iturin A are apparently long-lasting. The plates were observed for several weeks yet the inhibitory zones did not change noticeably from those measured at four days. Thus, iturin A may be active against fungal growth as well as spore germination [5].

Iturin A shows a very strong antibiotic activity and has a broad antifungal spectrum, making it an ideal potential agent for biocontrol of plant diseases or model for the synthesis of such fungicides [10, 11].

The mode of action of these cyclic lipopeptides is due to interaction with fungal membranes creating transmembrane channels that permit release of vital ions [12]. Iturins have also been used to treat dermatomycoses of humans and animals [8, 9].

In yeast cells, iturin A disrupts the plasma membrane by the formation of small vesicles and the aggregation of intramembranous particles. It also releases electrolytes and high molecular mass products, and degrades phospholipids [13]. Iturin A dramatically increases the electrical conductance of bimolecular lipid membranes, which has stimulated discussion on the pore-forming activity of lipopeptides and their action against pathogens [14].

Conclusions

Keeping in mind that fungi are significant and increasingly cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients and that the opportunistic infections they

cause are severe and life threatening, a rapid diagnosis and efficient therapeutic measures are essential.

On the other hand, clinical trials on humans and animals have also shown iturin A to be a valuable drug for its large antifungal spectrum, its low toxicity, and low allergic effect [15]. Thus, iturin A has the potential to be used as alternative potent antifungal agents.

This research discusses potential applications of iturin A, especially because of the increasing numbers of drug-resistant fungi and the necessity for alternative lines of therapy.

References

1. Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, Vande Berg J, Hu J, Messer S, Herwaldt L, Pfaller M, Diekema D. Attributable mortality of candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 1172-1177.
2. Hajjeh RA, Sofair AN, Harrison LH, Lyon GM, Arthington-Skaggs BA, Mirza SA, Phelan M, Morgan J, Lee-Yang W, Ciblak MA, Benjamin LE, Thompson Sanza L, Huie S, Yeo SF, Brandt ME, Warnock DW. Incidence of bloodstream infections due to *Candida* species and *in vitro* susceptibilities of isolates collected from 1998 to 2000 in a population-based active surveillance program. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1519-1527.
3. Pfaller MA, Diekema DJ, Messer SA, Boyken L, Hollis RJ, Jones RN. *In vitro* susceptibilities of rare *Candida* bloodstream isolates to ravuconazole and three comparative antifungal agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 101-105.
4. Walsh TJ, Groll A, Hiemenz J, Flemming R, Roilides E, Anaissie E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (1): 48-66.

5. Klich MA, Lax AR, Bland JM. Inhibition of some mycotoxigenic fungi by iturin A, a peptidolipid produced by *Bacillus subtilis*. Mycopathologia 1991; 116: 77- 80.
6. Bais HP, Fall R, Vivanco M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol 2004; 134: 307-319.
7. Mhammedi A, Peypoux F, Besson F, Michel G. Bacillomycin F, a new antibiotic of iturin group : isolation and characterization. Journal of Antibiotics 1982; 35(3): 306-311.
8. Blocquiaux S, Delcambe L. Essais de traitement de dermatomycoses par l'iturine Arch Belg Dermatol Syphiligr 1956; 12 : 224-226.
9. Delcambe L, Peypoux F, Guinand M, Michel G. Iturin and iturinic acids. Revue des Fermentations et des Industries Alimentares 1976; 31: 147-151.
10. Sandrin C, Peypoux F, Michel G. Co-production of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. Biotechnol Appl Biochem 1990; 12: 370-375.
11. Maget-Dana R, Peypoux F. Iturins, a special class of pore forming lipopeptides: biological and physiochemical properties. Toxicology 1994; 87: 151-174.
12. Latoud C, Peypoux F, Michel G, Genet R, Morgat, JL. Interactions of antibiotics of the iturin group with human erythrocytes. 1986; 856(3): 526-535.
13. Thimon L. et al. Effect of lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiol Lett 1995; 128: 101-106.
14. Maget-Dana R. et al. Pore-forming properties of iturin A, a lipopeptide antibiotic. Biochim Biophys Acta 1985; 815: 405-409.
15. De Lucca AJ, Walsh TJ. Antifungal peptide: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1-11.

Table 1. Diameter of inhibition zone (mm) at three concentrations of iturin A on Sabouraud agar media.

Zone of inhibition (mm)	0	0.308mg/mL	1.54 mg/mL	7.7 mg/mL
<i>Candida albicans</i> (5380)	0 ^a	0	0	8.45
<i>C. albicans</i> (5381)	0	0	0	7.75
<i>C. albicans</i> (5382)	0	0	0	7.5
<i>C. albicans</i> (5383)	0	0	0	0
<i>C. albicans</i> (5312)	0	0	0	7.25
<i>C. albicans</i> (5311)	0	0	0	8.5
<i>C. albicans</i> (5361)	0	0	0	7
<i>C. albicans</i> (5358)	0	0	0	7.5
<i>C. albicans</i> (5357)	0	0	0	7.2
<i>C. albicans</i> (5356)	0	0	0	7.75
<i>C. parapsilosis</i> (5313)	0	0	0	7.5
<i>C. parapsilosis</i> (5288)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (5289)	0	0	0	7
<i>C. parapsilosis</i> (5290)	0	0	0	7.4
<i>C. parapsilosis</i> (5309)	0	0	0	8.75
<i>C. parapsilosis</i> (5384)	0	0	0	0
<i>C. parapsilosis</i> (5308)	0	0	0	7.2
<i>C. parapsilosis</i> (5310)	0	0	0	7.2
<i>C. tropicalis</i> (5359)	0	0	0	8.5
<i>C. tropicalis</i> (5360)	0	0	0	7.2
<i>C. guilliermondii</i> (5355)	0	0	0	7.75
<i>Trichosporon cutaneum</i> (5287)	0	0	7	7.5
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i> (5169)	0	9,5	12	17

^a 0 indicates that the 7mm impregnated disk was completely overgrown by the fungus.

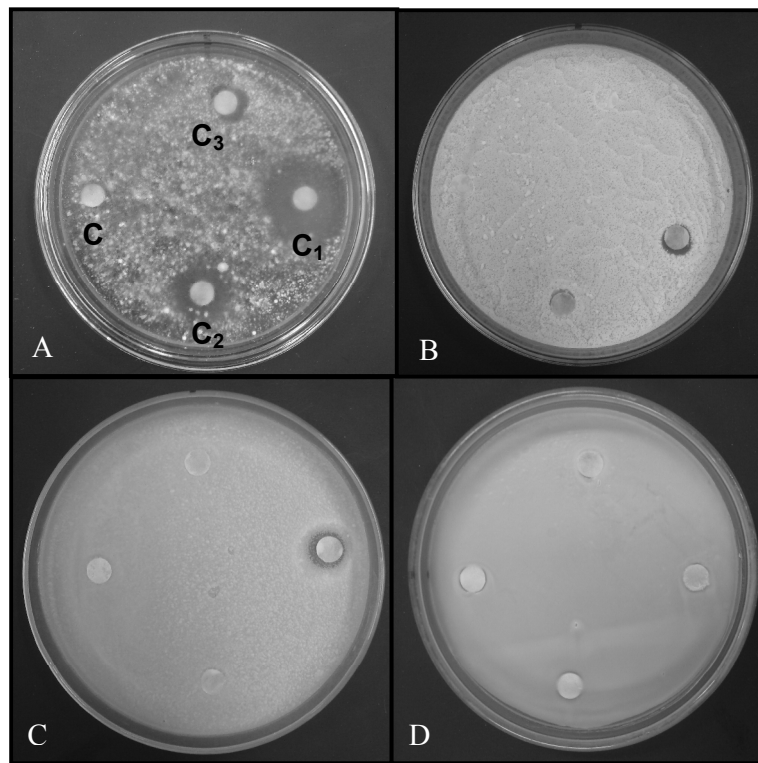


Figure 1. Activity of iturin A against isolates from immunocompromised patients:

Paracoccidioides brasiliensis susceptible at three concentrations (A), *Trichosporon cutaneum* at two (B), *Candida tropicalis* 5360 at one (C), and *C. albicans* 5383 resistance (D).

*C (control), C₁ (7.7mg/mL), C₂ (1.54mg/mL) and C₃ (0.308mg/mL).

Springer Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. To publish via Springer Open Choice, upon acceptance please visit

www.springeronline.com/openchoice to complete the relevant order form and provide the required payment information. Payment must be received in full before publication or articles will publish as regular subscription-model articles.

Instructions to Authors

Mycopathologia is an international journal devoted to the study of the role of fungi in disease and biodeterioration. As such, the journal covers a diverse, interdisciplinary range of topics that is unique in breadth and depth, including original articles and reviews highlighting important developments in the fields of medical and veterinary mycology, plant mycology and crop protection, mycotoxicoses and mycotoxins, molecular mycology, environmental aeromycology, entomopathogenic fungi and applied industrial mycology. In addition to research papers and review articles, the journal publishes also brief reports, meeting reports and book reviews.

Original Research Papers:

These should describe new and carefully confirmed findings. Experimental procedures should be given in sufficient detail for others to verify the work. The length of a full paper should be the minimum required to describe and interpret the work clearly.

Brief Reports:

A Brief Report is suitable for recording the results of complete but small investigations or giving details of new methods, techniques or apparatus. Progress reports are not acceptable.

Review Papers:

These should be submitted only after consultation with the Editor-in-Chief.

Meeting Reports and Book Reviews

These are usually solicited by the editors of the journal.

Manuscript Presentation

Manuscripts not conforming to the instructions below will be returned for reformatting without review. You should refer to a previously published article in the journal which can be downloaded from the journal website at

<http://www.springeronline.com>. The journal's language is English. British English or American English spelling and terminology may be used, but either one should be followed consistently throughout the article. If English is not your first language, please ensure that the language is corrected by a fluent English speaker or via consulting www.manuscript-improvement.com before submission. Manuscripts submitted in poor English may be returned for revision without review.

Text should be formatted to fit A4 or US Letter paper size, leaving adequate margins on all sides to allow reviewers' remarks. Please double-space all material, including notes and references. Quotations of more than 40 words should be set off clearly, either by indenting the left-hand margin or by using a smaller typeface. Use double quotation marks for direct quotations and single quotation marks for quotations within quotations and for words or phrases used in a special sense.

Number the pages consecutively with the first page containing:

- title
- author(s)
- affiliation(s)
- full address for correspondence, including telephone and fax number and e-mail address

Abstract

Please provide a short abstract of 100 to 250 words. The summary should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Key Words

Please provide a maximum of 6 key words or short phrases in alphabetical order.

Abbreviations

List alphabetically only those abbreviations, which are not familiar and/or commonly used.

Main text

Presentation of the main text depends on the type of article. Section headings in your manuscript should be clearly distinguishable but not numbered.

Original Research papers should be presented under the following headers:

Introduction (including a consideration of the current literature and the objectives of the study), **Materials & Methods** (with sufficient detail to allow the work to be repeated), **Results** (focus the reader's attention on your key results) and **Discussion** (put your key results into the context of current information and include concluding remarks at the end of the discussion; avoid unwarranted or unsupported speculations). Results and Discussion can be combined as appropriate.

The style of main sections of *Brief Reports* need not conform to that of full-length papers. However, we encourage authors to present the main text under the following headers: Introduction, Materials & Methods, Results & Discussion and Conclusions.

Appendices

Supplementary material should be collected in an Appendix and placed before the Notes and Reference sections

Notes

Please use endnotes rather than footnotes. Notes should be indicated by consecutive superscript numbers in the text and listed at the end of the article before the references. A source reference note should be indicated by means of an asterisk after the title. This note should be placed at the bottom of the first page.

Acknowledgements

Acknowledgements (including funding agencies and help from other colleagues) should be placed in a separate section before the References.

References

Cross-referencing:

References should be listed at the end of the article in numbered order following the Vancouver style. In the text, references are identified by a number in square brackets e.g. [15]. If, in the text, a reference is identified by means of an author's name, it should be followed by the reference number in square brackets. When there are more than two authors, only the first authors name should be mentioned, followed by et al. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like a and b after the date to distinguish the works.

Examples:

Winograd [1]

Bullen and Bennet [2a]

Bullen and Bennet [2b]

Reference list:

References to books, journal articles, articles in collections and conference or workshop proceedings, and technical reports should be listed at the end of the paper in numbered order following the Vancouver style (see examples below).. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the

reference list but should only be mentioned in the article text (e.g., T. Moore, personal communication).

References to books should include the author's name; year of publication; title; page numbers where appropriate; publisher; place of publication, in the order given in the example below.

Espinell-Ingroff AV. Medical Mycology and Training in the United States: A Historical Analysis (1894-1996). Dordrecht: Springer, 2003; 1-26

Al-Doory Y, DiSalvo AF, eds. Blastomycosis. New York: Plenum Publishing Corp, 1992

References to articles in an edited collection should include the author's name; year of publication; article title; editor's name; title of collection; first and last page numbers; publisher; place of publication; in the order given in the example below.

Yoshizawa T. Chromatographic Methods for Trichothecenes. In: Truckness MW, Pohland AE, eds. Methods in Molecular Biology, The Humana Press Inc., Totowa, 1999:118-129.

References to articles in conference proceedings should include the author's name; year of publication; article title; editor's name (if any); title of proceedings; first and last page numbers; place and date of conference; publisher and/or organization from which the proceedings can be obtained; place of publication; ISBN number, in the order given in the example below.

Nichita G, Curtui V, Miclea V, Trif A. Mycotic and mycotoxic pollution of feed-risk factor for animal health. Proceedings of the Scientific Communications Meeting of Aurel Vlaicu University, 3rd ed. Arad, 1996:65-68.

References to articles in periodicals should include the author's name; year of publication; article title; full title of periodical; volume number (issue number where appropriate); first and last page numbers, in the order given in the example below.

Walters D, Raynor L, Mitchell A, Walker R, Walker K. Antifungal activities of four fatty acids against plant pathogenic fungi. Mycopathologia 2004; 157: 87-90.

Van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. EMBO Rep. 2003 4: 844-9.

References to technical reports or doctoral dissertations, which **must** be in the public domain, should include the author's name; year of publication; title of report or dissertation; institution; location of institution, in the order given in the example below.

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Dissertation]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 pp.

Figure Legends

Figure legends should follow the references on a separate page and precede the tables. Each figure should be mentioned in the text.

Tables

Each table should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Please provide a short explanatory caption (without abbreviations) to each table, refer to the table in the text and note its approximate location in the margin. In tables, footnotes are preferable to long explanatory material in either the heading or body of the table. Such explanatory footnotes, identified by superscript letters, a, b, c etc., should be placed immediately below the table. Finally, please place the tables after the figure legends in the manuscript.

Figures

All photographs, graphs and diagrams should be referred to as a 'Figure' and they should be numbered consecutively (1, 2, etc.). Multipart figures ought to be labeled with lower case letters (a, b, etc.). Please insert keys and scale bars directly in the figures. Relatively small text and great variation in text sizes within figures should be avoided as figures are often reduced in size. Figures may be sized to fit approximately within the column(s) of the journal. Provide a detailed legend (without abbreviations) to each figure, refer to the figure in the text and note its approximate location in the margin. Please place the legends in the manuscript after the references.

For vector graphics, EPS is the preferred format. For bitmapped graphics, TIFF is the preferred format. The following resolutions are optimal: line figures – 600 – 1200 dpi; photographs – 300 dpi; screen dumps – leave as is. Colour figures can be submitted in the RGB color system. Font-related problems can be avoided by using standard fonts such as Times Roman, Courier and Helvetica.

Policy on Color Figures:

Springer treats the inclusion of color figures on a per article basis and offers two options 1) Free Online Color, the color figures will only appear in color on the journals' website and b/w in the printed version of the journal 2) Online and Printed Color which comes at a charge of Euro 950/ USD 1150 per article. The color figures will appear in color on the website and in the printed version of the journal.

Symbols and Units

Only recommended SI units and abbreviations should be used, although some quantities may be expressed in common units, e.g. mmHg.

Nomenclature

Microorganisms must be correctly named using the current codes for fungi; (see Microbiology 1999, 145 (January), p. viii). Guidelines for genetic nomenclature are quoted in the same publication. Any deviations ought to be properly explained with literature citation.

Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional or regional) or with the Helsinki Declaration (1964, amended in 1975 and 1983) of the World Medical Association.

Do not use patients' names, initials, or hospital numbers, especially in any illustrative material! When reporting experiments on animals, indicate whether the institutions or the National Research Councils guide for, or any national law on, the care and use of laboratory animals was followed according to all applicable institutional and/or national and international guidelines.

It is the responsibility of the author to obtain written permission for a quotation from unpublished material, or for all quotations in excess of 250 words in one extract or words in total from any work still in copyright, and for the reprinting of figures, tables or poems from unpublished or copyrighted material.

Manuscript Submission

Mycopathologia has a fully web-enabled manuscript submission and review system. This system offers authors the option of tracking in real time the review process of their manuscripts. The online manuscript and review system offers easy and straightforward login and submission procedures. This system supports a wide range of submission file formats:

For manuscripts - Word, WordPerfect, RTF, TXT and LaTeX

For figures - TIFF, EPS, PS, GIF, JPEG and PPT

PDF is NOT a recommended format.

Manuscripts should be submitted to:

<http://myco.edmgr.com>

Authors are requested to download the Consent to Publish and Transfer of Copyright form from this system.

Please send a completed and signed form either by mail or fax to the *Mycopathologia* Office.

Mycopathologia
Springer, Journals Editorial Office
Van Godewijckstraat 30
3311 GX Dordrecht
The Netherlands

Fax: (+31) 78 6576254

NOTE: By using the online manuscript submission and review system, it is NOT necessary to submit the manuscript also as printout + disk. In case you encounter any difficulties while submitting your manuscript online, please get in touch with the responsible Editorial Assistant by clicking on "CONTACT US" from the toolbar. Please read the **checklist** (see below) before submitting your manuscript to *Mycopathologia*.

Submitted manuscripts should not be in consideration in whole or in part by another journal. Nor has it already appeared in print, in whole or in part, in any language, in any other journal.

Reviewing Procedure

During the submission process via Editorial Manager you will have to select two Editors from the Editorial Board to review your article based on their keyword preferences. Moreover, you should provide names and complete contact addresses (including E-mail addresses) of 4 additional reviewers that you consider experts in the subject of your study. The journal reserves the rights to obtain additional reviews as necessary.

Proofs

Proofs will be sent to the corresponding author by e-mail (if no e-mail address is available or appears to be out of order, proofs will be sent by regular mail).

Your response, with or without corrections, should be sent within 72 hours!

Corrections should be sent as an e-mail attachment to:
proofscorrection@springer-sbm.com.

Always quote **the four-letter journal code** and **article number** from your proof in the subject field of your e-mail.

Checklist for preparing Manuscripts for Submission

Please also read the Instructions to Authors above, which contains additional information. Failure to comply with these instructions may delay assessment of your paper.

- Authors whose first language is not English are strongly urged to have their manuscript thoroughly checked before submission.
- Avoid redundant words or phrases such as 'a blue color', 'at a temperature of 30°C', (Blue is a color and does not need stating!) Also phrases such as 'It was observed that...' are also redundant and may, without exception, be deleted.
- Nomenclature: Only 'Système International' units and abbreviations are used. Non-standard abbreviations are defined at first use.
- All text is double-spaced (**NOT 1,5 spacing**).
- All pages are numbered.
- The title should be informative and clear. Do not use phrases such as "The effect of..." or "Study of ...".
- The abstract is clear and concise. Please avoid beginning with a phrase such as "This study shows...", or "We show in this paper...".
- Maximum of 6 key words in alphabetical order.
- Sub-headings in all sections are clearly indicated and **NOT** numbered.
- Introduction: includes consideration of the current literature and the objectives of the study.
- Materials & Methods; with sufficient detail to allow the work to be repeated.
- Discussion: your key results are discussed within the context of current information. Unwarranted or unsupported speculations are avoided.
- Tables and figures are self-explanatory with key details of procedures given in the legend or footnotes
- Micrographs have a clear scale bar on the photograph with the magnification given in the legend.
- References agree between text and list.
- **Two Editorial Board members are selected to review the manuscript + names of 4 independent reviewers.**
- The corresponding author has provided a valid e-mail address
- Proofs need to be returned within 72 hrs!!

Offprints

Fifty (50) offprints of each article will be provided free of charge. Additional offprints (both hard copies and PDF files) can be ordered by means of an offprint order form supplied with the proofs.

Page Charge

No page charges are levied on authors or their institutions.

Copyright

Authors will be asked, upon acceptance of an article, to transfer copyright of the article to the Publisher (see section Manuscript Submission). This will ensure the widest possible dissemination of information under copyright laws.

Article Plus

Contributors to *Mycopathologia* are encouraged to publish additional article-related materials on the journal website. These materials are items that compliment and reinforce information published in the print Journal that may be too lengthy or cost-prohibitive to print in their original/complete format. Examples of supplementary materials typically added to an online journal using ArticlePlus include:

- Extensive data sets contained in lengthy tables or spreadsheets
- Supplementary reference lists or acknowledgements
- Erratum notices and corrections

In the majority of instances, supplementary materials posted using ArticlePlus are called out within the article so that readers are aware that there is important information not printed (in its entirety or at all) is available for viewing online.

All materials posted to IPS websites using ArticlePlus are freely accessible to all site visitors.

These materials cannot be posted using ArticlePlus until the online article itself is posted on IPS. There cannot be any ArticlePlus material on the journal site without an article that refers to this material.

Material (such as graphics) embedded in or linked to from the ArticlePlus material must be included with the ArticlePlus material. For example, if the ArticlePlus material is an HTML file, all graphics linked to from within the HTML file must be submitted along with the HTML file.

Acceptable ArticlePlus file types

The types of materials that may be submitted include, short video or audio clips, color photographs, data graphs and charts, short audio files, web site URLs, word documents, and spreadsheets. An expanded list of acceptable file formats follows:

File Type and Accepted File Extension(s)

HTML = .html

PDF = .pdf

Image Files = .gif, .jpg, .jpeg

Audio Files = .wav

Video Files = .avi, .mov, .qt, .mpg, .mpeg

Excel Spreadsheet = .xls

Word Document = .doc, .txt

Director Files = .dcr, dco

Shockwave Files = .swf

PDA Files = .pdb, prc

PowerPoint = .ppt

ArticlePlus File Submission Instructions

Authors should clearly indicate any material to be considered for Article Plus. Since all materials submitted for Article Plus are posted exactly as presented, authors are advised to review their materials carefully. ArticlePlus data will be posted as submitted and will not be professionally copyedited or proofread. No additional work or file processing will be performed. The Publisher will not be responsible for errors or omissions.

If the submitted materials require processing, the author will be informed of any associated charge and will be responsible for these costs. For this reason, authors should carefully review their material.

The Article Plus repository for any given article may not exceed 5MB. The repository may consist of one file or any number of related files whose total combine size does not exceed this size specification. Files larger than 5MB will be returned to the author, un-posted, for re-submission. This file size limitation is strictly enforced.

Web Address/URLs (web links)

Must contain the complete path for the destination web site.

Web Documents (.htm files)

Web documents must be submitted already in HTML format and have .htm as the file extension. If imbedded images files are present in the HTML file, please supply these separately. Please be sure that all HTML coding is accurate to assure cross-browser display. Again, these files will not be reviewed or edited prior to posting, so authors should review the HTML coding carefully.

Audio and Video Files

Short audio and video clips may be submitted for posting on the web site in one of the file formats specified above. Audio and video files must be compressed to the smallest possible size that still allows for high resolution and quality presentation. The size of each clip should not exceed 5MB. File size limitation is intended to insure that end-users are able to download and view files in a reasonable time frame. If files exceed the specified size limitation, they will not be posted to the web site and returned to the author for re-submission.

Text Files and Spreadsheets

Text documents and spreadsheets should be submitted completely formatted for easy viewing and printing.

Please be sure that data chart and graph layouts are done correctly so that page run-over is not present and the information is easy to view and read on screen.

All submissions received in final format, as approved by the Editor/Reviewer(s) will not be returned to the submitter. Materials will be kept for future use if needed.

Copyright. As with all materials published in *Mycopathologia*, copyright on materials published on the web site using ArticlePlus will be held by the Publisher, Springer. These materials are legal property of the copyright holder and are subject to the copyright assignment/transfer agreement form submitted in association with the associated article.

Additional Information

Mike van den Bosch, PhD
Publishing Editor
Springer
P.O. Box 17
3300 AA Dordrecht
The Netherlands

Phone: +31(0) 78 6576-188
Fax: +31(0) 786576-388
mike.vandenbosch@springer-sbm.com