

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

CIBELE MASSOTTI MAGAGNIN

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Trichophyton sp.* DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Porto Alegre, Janeiro de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

CIBELE MASSOTTI MAGAGNIN

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS
DE *Trichophyton sp.* DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker
Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas, UFRGS, como requisito para
obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Janeiro de 2013.

CIP - Catalogação na Publicação

Massotti Magagnin, Cibele
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Trichophyton* sp. DO ESTADO DO
RIO GRANDE DO SUL / Cibele Massotti Magagnin. --
2013.
56 f.

Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2013.

1. Dermatófitos. 2. *Trichophyton interdigitale* .
3. Caracterização fenotípica. 4. Caracterização
genotípica. I. Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II.
Título.

A minha família,

*pela dedicação, pelo apoio e pelo amor
incondicional.*

Compartilho esta conquista com vocês.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por iluminar o meu caminho e permitir que eu realizasse mais esta conquista.

À minha orientadora, Maria Lúcia Scroferneker, por toda ajuda, por oportunizar a realização deste trabalho, pelos conselhos, pelas conversas e por me acompanhar desde a iniciação científica.

Às colegas de pós-graduação e amigas Cheila Stopiglia, Daiane Heidrich e Tatiane Doaboit por me acompanharem desde que entrei no laboratório e por terem compartilhado comigo seus conhecimentos, conversas, amizade e boas risadas!

Às bolsistas de iniciação científica e também amigas Karine Alvez, Lúcia Meirelles e Suelen Vigolo por dividirem comigo companhia, bom humor e muito trabalho! Muito obrigada, meninas!!

À prof^a Patrícia Valente pelos ensinamentos e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas Maurício Castrillón e Sandra Mendes pela ajuda e pelos ensinamentos relacionados aos experimentos em Biologia Molecular.

Às querias Elisângela Rosa dos Santos e Nara Costa Lodeiro pela correção desta dissertação e do artigo, respectivamente.

Aos meus pais, Mauri e Eliane, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis e por compreenderem minha ausência em alguns momentos. Serei eternamente grata.

Aos meus irmãos, Amauri e Cinara, pelo carinho e pela compreensão.

À minha avó Cecília e aos demais familiares que, mesmo longe, torceram por mim e me apoiaram em mais essa caminhada.

Ao meu namorado Gustavo L. Black, pela compreensão, pelo incentivo e pelo amor sempre demonstrados.

Às minhas amigas Caroline Bandeira, Mariana Luchese e Rafaela Medeiros pela amizade e pelo companheirismo de sempre. Juntas em mais essa caminhada!

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público, gratuito e de qualidade e ao CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À todos que de alguma forma participaram desta conquista.

Muito Obrigada!!!

RESUMO

As dermatofitoses apresentam alta prevalência na população em geral, sendo *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes*) a segunda espécie mais frequentemente relatada como causadora de infecção em humanos. O objetivo do trabalho foi determinar a identidade genética, o perfil enzimático e de assimilação de açúcares e a suscetibilidade a antifúngicos de isolados clínicos do gênero *Trichophyton*. Os isolados foram avaliados por de ensaios enzimáticos, assimilação de fontes de carbono e da atividade antifúngica *in vitro*. A caracterização genotípica foi realizada através da amplificação e do sequenciamento da região do gene que codifica a região interna do gene DNA ribossomal dos isolados testados. No estudo, todos os isolados secretaram DNase, mas nenhum deles foi capaz de secretar fosfolipase e proteinase. Por outro lado, urease e lipase foram produzidas pela maioria dos isolados testados. Entre os antifúngicos avaliados, a terbinafina e o itraconazol demonstraram melhores resultados de sensibilidade, enquanto o fluconazol apresentou baixa atividade para as amostras. A anfotericina B, apesar de menos eficaz que a terbinafina e o itraconazol, também demonstrou resultados satisfatórios. A combinação entre os antifúngicos tioconazol e terbinafina demonstrou ter atividade antagônica em todos os isolados. Todos os dermatófitos testados assimilaram inulina, sorbitol, manose, glicose e trealose. Os demais carboidratos tiveram assimilação variável entre os isolados. Genotipicamente, todos os isolados do estudo foram identificados como pertencentes à espécie *T. interdigitale*. Os ensaios enzimáticos e de assimilação de carboidratos apresentaram resultados variáveis entre os isolados testados, inferindo variação intraespecífica entre as amostras de *T. interdigitale*. O perfil de sensibilidade aos antimicóticos testados seguiu o padrão de resultados observado em estudos anteriores. A identificação genotípica através da amplificação e do sequenciamento da região ITS permitiu garantir a identidade entre os isolados testados.

Palavras-chave: dermatófitos, *Trichophyton interdigitale*, enzimas, atividade antifúngica, DNA ribossomal.

ABSTRACT

The prevalence of dermatophytosis among population is high, and *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes*) is the second most frequently reported species to cause infection in humans. This study objective was to evaluate the genetic identity, the enzymatic profile and the assimilation of carbon sources, as well as the antifungal susceptibility of clinical isolates of *Trichophyton sp.* The isolates were analyzed phenotypically by enzymatic assays, assimilation of carbon sources and antifungal activity *in vitro*. The genotypic characterization was performed by amplification and sequencing the gene region encoding the internal region of the DNA ribosomal gene of the isolates tested. In our study, all isolates secreted DNase, while none of them was capable of secreting phospholipase, keratinase and proteinase. On the other hand, lipase and urease were secreted by most of the isolates. Of the antifungal agents tested, the best results in terms of sensitivity were found with terbinafine and itraconazole, while the antifungal activity of fluconazole was found to be weak. Amphotericin B, although less effective than terbinafine and itraconazole, also yielded satisfactory results. Evaluation of the drug combination of tioconazole and terbinafine revealed an antagonistic effect for all tested isolates. All isolates assimilated inulin, sorbitol, glucose, trehalose and mannose. Arabinose, dulcitol, galactose and xylose were assimilated by some of the isolates, whereas the most isolates assimilated cellobiose, dulcitol, erytritol and mannitol. Genotypically, all isolates in the study were identified as belonging to *Trichophyton interdigitale* species. In general, enzyme assays and assimilation of carbohydrates showed variable results among the isolates tested, inferring intraspecific variation between *Trichophyton interdigitale* samples. The sensitivity profile of the antifungal agents tested in this study was similar to results obtained in previous studies. The genotypic identification, by amplification and sequencing of the ITS region, has ensured the identity of the isolates tested.

Keywords: dermatophyte; *Trichophyton interdigitale*; enzymes; antifungal activity; ribosomal DNA

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. ETIOLOGIA DAS DERMATOFIToses | 9 |
| 3. EPIDEMIOLOGIA | 11 |
| 4. MORFOLOGIA | 12 |
| 5. ASPECTOS CLÍNICOS | 14 |
| 6. DIAGNÓSTICO | 17 |
| 7. TRATAMENTO | 19 |
| 8. AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE | 25 |
| 9. FATORES DE VIRULÊNCIA | 28 |
| 10. OBJETIVOS | 30 |
| 11. REFERÊNCIAS | 31 |
| 12. Phenotypic and genotypic analysis of 26 strains of <i>Trichophyton sp.</i> | 43 |
| 13. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 56 |

1. INTRODUÇÃO

Dermatofitoses são infecções fúngicas superficiais causadas por fungos dermatófitos, os quais constituem um grupo especializado de fungos que acometem o tecido queratinoso de seres humanos e outros vertebrados, causando infecções superficiais. Segundo a Organização Mundial de Saúde, os dermatófitos afetam cerca de 25% da população mundial, sendo *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes*) a segunda espécie mais frequentemente relatada como causadora de infecção em humanos. Nos últimos anos, o número de infecções causadas por esses fungos aumentou consideravelmente, provocando preocupação especial quando acometem pacientes imunocomprometidos, cujas manifestações podem ser atípicas e graves, produzindo extensas lesões.

Fenotipicamente, os fungos responsáveis pelas dermatofitoses apresentam semelhanças morfológicas entre isolados de espécies distintas, variabilidade intraespecífica e pleomorfismos, tornando a sua identificação restrita a micologistas. Por isso, a aplicação de métodos moleculares permite uma identificação mais rápida e fidedigna desses fungos. A escolha do tratamento adequado é determinada pelo local e pela extensão da infecção, pela espécie envolvida, bem como pela eficácia, pelo perfil de segurança e pela cinética dos antifúngicos disponíveis. O espectro de atividade desses medicamentos é variável, podendo levar a falha no tratamento, possivelmente devido a fatores como baixa adesão dos pacientes, falta de penetração do fármaco, biodisponibilidade do medicamento, interações medicamentosas ou resistência. A análise da atividade antifúngica *in vitro* desses agentes permite a comparação entre diferentes antifúngicos, vindo a auxiliar na escolha de uma terapia eficaz para os pacientes acometidos por tais infecções.

A secreção de enzimas para o meio extracelular pode ser um importante mecanismo adaptativo durante o ciclo de vida dos fungos. Durante as primeiras fases da infecção, os dermatófitos secretam várias enzimas, como adesinas, lipases, fosfatases, DNases, proteases não específicas e queratinases. Essa maquinaria enzimática é um dos fatores de virulência mais bem-caracterizados dos dermatófitos, permitindo a hidrólise de componentes estruturais do tecido epidérmico e fazendo com que esses patógenos tornem-se invasivos.

Testes bioquímicos como assimilação e fermentação de fontes de carbono, usados com sucesso na identificação de organismos como bactérias e leveduras, não são comercialmente disponíveis para dermatófitos. No entanto, ao longo do tempo, alguns estudos utilizando

diferentes fontes de carbono foram realizados na tentativa de diferenciar espécies de dermatófitos a partir de testes nutricionais.

Com o desenvolvimento da biologia molecular, técnicas como PCR seguido de *Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR em tempo real, PCR multiplex, PCR utilizando primers arbitrários, análise de DNA amplificado ao acaso, análise de DNA mitocondrial e sequenciamento de regiões ITS foram adaptados para a identificação de dermatófitos a partir de amostras clínicas. Esses métodos moleculares apresentam um bom potencial para a detecção direta de dermatófitos, embora essas técnicas requeiram laboratórios bem-equipados e ainda não estejam padronizadas para a rotina dos laboratórios clínicos.

Dentro deste contexto, o estudo visou caracterizar fenotipicamente 26 isolados de dermatófitos do gênero *Trichophyton* por meio de ensaios enzimáticos de DNase, fosfolipase, lipase, proteinase e urease. A atividade antifúngica *in vitro* dos isolados contra antifúngicos comercialmente disponíveis para tratamento de dermatofitoses também foi avaliada, assim como a assimilação de fontes de carbono e a caracterização molecular por meio do sequenciamento das regiões ITS.

2. ETIOLOGIA DAS DERMATOFITOSES

Dermatofitoses são infecções fúngicas superficiais causadas por fungos dermatófitos, os quais são um grupo especializado de fungos que acometem o tecido queratinoso de seres humanos e outros vertebrados, causando infecções superficiais. Podem ser classificados como zoofílicos, antropofílicos ou geofílicos, dependendo de sua fonte primária de infecção (animal, humana ou solo).¹ A infecção por fungos dermatófitos em seres humanos parece ser tão antiga quanto a história da humanidade. Segundo Greer², a existência de fungos queratinofílicos saprófitas remanesce da era Mesozoica. Assim, podemos concluir que as dermatofitoses acompanham a própria existência dos seres humanos.³

De acordo com Seeliger,⁴ a primeira observação de um dermatófito presente em lesão foi feita por Remak em 1835 ao examinar microscopicamente estruturas alongadas e arredondadas, contidas em material coletado de tinea fávica. Porém, Remak não reconheceu essas estruturas como fúngicas e não publicou suas observações. Posteriormente, em 1939, Schoenlein determinou a natureza micótica da lesão fávica.⁵

Em 1890, Sabouraud deu início ao estudo sistemático dos dermatófitos. Em 1934, Emmons classificou esses fungos em apenas três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Tais avanços no conhecimento das dermatofitoses constituem um pilar no desenvolvimento da micologia médica, já que estes foram os primeiros fungos patogênicos humanos a serem reconhecidos.⁶

2.1 Gênero *Trichophyton*

O gênero *Trichophyton* é particularmente importante e representa o gênero com maior número de dermatófitos isolados a partir de seres humanos. Existem pelo menos 15 espécies pertencentes ao gênero *Trichophyton*, além de diversas variantes no complexo de espécies conhecido como *Trichophyton mentagrophytes*.⁷

O complexo *Trichophyton mentagrophytes* (atualmente conhecido como espécies *Trichophyton interdigitale*) consiste no segundo grupo mais frequentemente causador de dermatofitoses. Duas espécies sexuais (espécies teleomórfica) foram identificadas como pertencentes a esse complexo: *Arthroderma (A.) benhamiae*, identificada por Ajello e Cheng em 1967, e *A. vanbreuseghemii*, identificada por Takashio em 1973.^{8,9}

Originalmente, o complexo *Trichophyton mentagrophytes* compreendia em variedade antropofílica –à qual pertenciam as subespécies *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *nodulare* (sinônimo *T. krajdinii*) e *T. mentagrophytes* var. *goetzii*– e variedade zoofílica –à qual pertenciam as subespécies *T. mentagrophytes* var. *granulosum* (roedores), *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (ouriço) e *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (camundongos). Entretanto, de acordo com recentes estudos moleculares, a expressão *T. mentagrophytes* sp. agora só é usada para se referir a *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, um patógeno altamente incomum.^{8,10}

As variedades antropofílicas de *T. mentagrophytes*, bem como diversos isolados zoofílicos anteriormente classificados como var. *mentagrophytes* ou var. *granulosum*, não são geneticamente distinguíveis de *T. interdigitale* e, por isso, são conhecidas em conjunto como espécies de *T. interdigitale*. Por outro lado, o *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, que antigamente era considerado uma variedade de *T. mentagrophytes*, é agora considerado uma espécie distinta e está intimamente relacionado com *A. benhamiae*.^{8,10}

2.1.1 *Trichophyton interdigitale*

T. interdigitale foi descrito pela primeira vez em 1917 por Henry Priestley¹¹ como uma nova espécie de *Trichophyton*. O dermatófito foi isolado a partir da *tinea interdigitalis* e apresentava colônias com uma superfície felpuda de coloração amarelo-clara no centro e branca nas bordas. Microscopicamente, apresentava conídios em forma de cachos de uva e esporos fusiformes multisseptados.

Em 1967, Ajello não incluiu *T. interdigitale* em sua revisão taxonômica de dermatófitos. Entretanto, em estudos posteriores, *T. interdigitale* foi classificado como uma variedade antropofílica de *T. mentagrophytes*.¹³ Em 1979, 331 isolados de *T. mentagrophytes* foram investigados quanto a morfologia, reprodução, patogenicidade e distribuição geográfica para esclarecer as diferentes espécies que compõem o complexo *T. mentagrophytes* no Japão, citado por Anzawa et al.¹⁴

Atualmente, com base em resultados de biologia molecular, as variantes antropofílicas de *T. mentagrophytes* bem como alguns isolados zoofílicos que foram classificados como

variações de *T. mentagrophytes* não são geneticamente distinguíveis de *T. interdigitale* e, por isso, estão agrupados como espécies de *T. interdigitale*.^{8,10}

3. EPIDEMIOLOGIA

Das diferentes espécies de dermatófitos conhecidas, a maioria está taxonomicamente classificada em três gêneros anamórficos: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.¹⁴ As espécies mais comumente relatadas como causadoras de infecção em humanos são *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans* e *Epidermophyton floccosum*,¹⁵ as quais estão distribuídas geograficamente de maneira universal. Existem espécies que apresentam restrição geográfica parcial, tais como *T. schoenleinii* (Eurásia e África), *T. soudanense* (África), *T. violaceum* (África, Ásia e Europa) e *T. concentricum* (Ilhas do Pacífico, Extremo Oriente e Índia). A epidemiologia da infecção por dermatófitos é provavelmente alterada com a mudança dos padrões de migração, crescimento do turismo e mudanças nas condições socioeconômicas.¹⁶⁻¹⁸

No Brasil, a prevalência das espécies de dermatófitos de importância epidemiológica e terapêutica varia de região para região.¹⁹ As regiões Sul e Sudeste têm apresentado alta incidência de infecções causadas por *T. rubrum*, seguido de *T. mentagrophytes* e *M. canis*. A literatura contém dados coletados e analisados a partir dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Minas Gerais, onde se observa o predomínio de tais espécies como agentes causadores de dermatofitoses.^{20,21} Na região Nordeste, há maior prevalência de *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Estudos realizados nos estados da Paraíba e do Ceará corroboram esses dados, citado por Peres et al e Rezende et al.^{20,22} Recentemente, em um estudo realizado no Amazonas, *T. tonsurans* foi o agente fúngico isolado com maior frequência, seguido de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.²³

Estudos epidemiológicos indicam que a infecção por dermatófitos está entre as mais prevalentes no mundo, sendo considerada a segunda doença de pele mais frequente na população adulta,^{2,24} visto que afeta 20-25% da população mundial e que sua incidência continua a crescer.²⁵ Nos últimos anos, o número de infecções causadas por esses fungos aumentou consideravelmente, provocando preocupação especial quando acometem pacientes imunocomprometidos, cujas manifestações podem ser atípicas e graves, produzindo extensas lesões.²⁶

4. MORFOLOGIA

A identificação dos dermatófitos é feita essencialmente de acordo com a classificação descrita por Emmons, baseando-se na observação ao microscópio das estruturas fúngicas tratadas com hidróxido de potássio (10 a 20%) e na observação das colônias crescidas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA). A adição de 1% de extrato de levedura ao meio SDA ou a utilização de outros meios (Cornmeal Dextrose Agar ou Potato Dextrose Agar) pode ser necessária para estimular a esporulação.²⁷

Para certas espécies, a utilização de testes adicionais, como testes nutricionais e fisiológicos, poderá ser essencial para uma correta identificação.¹⁹ Alguns dermatófitos são capazes de hidrolisar ureia a altas concentrações. Assim, a avaliação da atividade da urease pode ser útil para diferenciar espécies do gênero *Trichophyton*, como *T. rubrum*, os quais são urease negativo, e *T. interdigitale*, os quais são urease positivo. A maior parte dos isolados de *T. soudanense* são urease negativo, ao passo que para espécies de crescimento lento, como *T. verrucosum* ou *T. violaceum*, os resultados podem ser variáveis. Esse teste sofre algumas limitações porque, após 10 dias, todos os dermatófitos podem ser positivos.²⁷

In vitro, alguns dermatófitos são capazes de penetrar e invadir a haste do cabelo, enquanto outras espécies atacam o cabelo por simples erosões periféricas. O ensaio *in vitro* de perfuração do cabelo permite a diferenciação entre os isolados de *T. rubrum* (que não perfuram o cabelo) de isolados de *T. mentagrophytes* (que são capazes de penetrar no fio do cabelo). Também pode ser útil para a distinção entre as linhagens atípicas de *M. canis* (teste positivo) e *M. audouinii* ou *M. equinum* (teste negativo). No entanto, assim como a avaliação da atividade de urease, a contribuição desse teste para identificação de espécies é limitado, visto que isolados atípicos de *T. rubrum* também podem causar perfurações.²⁷

Outros ensaios podem ser igualmente utilizados para identificar os dermatófitos. O crescimento em meio Bromocresol Purple (BCP)-Milk Solids-Glucose pode ser útil para distinguir *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* uma vez que, ao contrário da primeira, essa espécie apresenta um bom crescimento e alcaliniza esse meio, provocando a alteração de sua cor original (azul-acinzentado) para violeta.²⁸

Relativamente às observações macroscópicas, a presença de pigmentação, as cores das colônias na superfície e no verso, a textura das superfícies, a topografia das margens das colônias e a taxa de crescimento do fungo deverão ser examinadas. No que diz respeito à

observação microscópica, o tipo de conídios produzidos, a sua forma e dimensão, assim como a presença de outras estruturas são critérios essenciais para a identificação. A maioria das espécies de dermatófitos produz dois tipos de conídios: grandes (macroconídios pluricelulares) e pequenos (microconídios unicelulares). A presença ou ausência desses dois tipos de conídios e o tipo de parede (rugosa ou lisa) são importantes para a identificação das espécies de dermatófitos.⁵

4.1 Aspectos morfológicos de *T. interdigitale*

Macroscopicamente, os isolados de *T. interdigitale* caracterizam-se por apresentar colônias geralmente planas, de coloração branca a creme. No verso, apresentam superfície amarelada com pigmento marrom-rosado, podendo ser ainda vermelho-escuro quando se trata de culturas antigas.

Microscopicamente, *T. interdigitale* apresenta numerosos microconídeos piriformes, hifas esféricas e também clamidoconídeos, sobretudo em culturas antigas. Macroconídeos lisos, multisseptados e delgados também estão presentes em algumas culturas.²⁹

A variabilidade morfológica que alguns isolados podem apresentar, as formas atípicas observadas em certos casos e a taxa de crescimento de certos fungos tornam a identificação de dermatófitos restrita, muitas vezes, a micologistas especializados.³⁰

5. ASPECTOS CLÍNICOS DAS DERMATOFIToses

Os aspectos clínicos das dermatofitoses são bastante variáveis e resultam da combinação da destruição da queratina com a resposta inflamatória do hospedeiro. Fatores importantes que levam a diferentes formas clínicas incluem o tipo de fungo invasor (fungos zoofílicos tendem a causar uma reação inflamatória mais intensa do que antropofílicos), o estado imunológico do hospedeiro e, principalmente, a queratinização do local afetado. Visto que diferentes espécies demonstram predileção por diversos locais do organismo, as dermatofitoses são caracterizadas conforme o local em que ocorre a infecção.¹ Assim, pode-se fazer uma divisão das principais infecções da pele glabra (*tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea*

faciei), da pele altamente queratinizada (palmas das mãos e plantas dos pés), da pele rica em folículos pilosos (*tinea capitis*, *tinea barbae*) e das unhas (onicomicoses).³⁰

A *Tinea corporis* é uma micose típica da pele glabra exposta e pode ser causada por todas as espécies de dermatófitos conhecidas. Por isso, a prevalência do agente causador dessa infecção apresenta variação geográfica. A lesão característica é circular, geralmente bem-delimitada e de coloração rosa. À medida que a lesão progride, assume forma anular. Entretanto, algumas espécies causam lesões com aspectos distintos daqueles descritos. Infecções por *T. rubrum* podem causar lesões extensas, crônicas e de característica não inflamatória.^{31,32}

A infecção *Tinea cruris* caracteriza-se pela reação inflamatória crônica da pele da região inguinal. É uma infecção comum e de maior incidência em climas quentes, sendo que os adultos são mais acometidos do que as crianças. *T. rubrum* é o agente etiológico mais frequente, embora *T. interdigitale* também possa causar esse tipo de infecção.³¹

A micose denominada *Tinea faciei* tem um aspecto clínico similar ao da *tinea corporis*, porém com acometimento da região facial. As lesões podem ter o aspecto típico de *tinea corporis*, porém a descamação do local atingido é menos pronunciada. Os agentes causais variam de acordo com as regiões geográficas; contudo, a origem da infecção costuma ser zoofílica ou representara extensão de uma infecção de outra região do corpo.³²

A *Tinea pedis* trata-se do tipo mais comum de infecções por dermatófitos em países desenvolvidos, sendo a forma interdigital o subtipo mais frequente. Em geral, essa infecção, comumente chamada “pé-de-atleta”, acomete a região entre os dedos dos pés, e a apresentação clínica pode ser caracterizada por ressecamento, descamação e fissuras ou por esbranquiçamento da região afetada. Irritação e prurido estão comumente presentes. Em alguns casos, a infecção estende-se até a superfície dorsal do pé e apresenta-se como *tinea corporis* típica, com o avanço da lesão.^{32,33}

A infecção fúngica da palma das mãos é denominada de *Tinea manus*, é muito rara e costuma afetar apenas uma das mãos. Se ambas as mãos forem afetadas, utiliza-se o termo *tinea manuum*. A espécie *T. rubrum* é o agente etiológico mais comum e, na maioria dos casos, há uma infecção preexistente no pé, com ou sem envolvimento ungueal.^{30,32}

A *Tinea capitis* é uma dermatofitose cuja epidemiologia mudou de modo significativo, especialmente em países ocidentais. Em muitos países do mundo, é a micose superficial mais comum em crianças.³⁴⁻³⁸ Sua incidência tem aumentado nos últimos anos e ocorreram mudanças significativas nas espécies responsáveis por essa infecção, visto que, na maioria dos países europeus, o *M. audouinii* foi substituído pelo *M. canis*.³⁹ A lesão inicial é uma pequena pápula vermelha em torno do folículo piloso do cabelo que, com a progressão da lesão, torna-se mais pálida e escamosa, podendo resultar em alopecias.^{30,40}

Uma infecção conhecida como *Tinea barbae*, na maioria dos casos, é causada por os fungos *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes*. Essa infecção acomete barba e sobrancelhas de homens adultos, e o quadro clínico caracteriza-se por uma reação inflamatória intensa.³⁰

A *Tinea favosa* (Favus) é uma infecção fúngica crônica caracterizada por densa massa micelial e restos epiteliais nos folículos pilosos. Aglomerados de folículos infectados podem causar entrançamento do cabelo, e depois de anos, ocorre atrofia da pele, causando alopecia permanente. Na maioria dos casos, favus é causada por *Trichophyton schoenleinii*.⁴¹ Enquanto *Tinea imbricata* (micose Tokelau) é uma infecção que se apresenta sob a forma de escalonamento generalizada, frequentemente dispostas em anéis concêntricos ou com folhas grandes de descamação. A infecção pode se desenvolver no início da vida e persistir na idade avançada, sem o desenvolvimento de medidas imunitárias eficazes. *Tinea imbricata* muitas vezes afeta grandes áreas do corpo, poupando apenas dobras do corpo e couro cabeludo.⁴²

Tinea incognito (tinea esteróide modificada) é uma infecção dermatofítica em que o uso tópico ou sistêmico de esteróides, administrada como resultado de erros de diagnóstico dermatológico ou patologias pré-existentes, modificou a aparência clínica da infecção fúngica, transformando a micose típica e imitando outras doenças de pele.⁴³

A onicomicose é uma infecção fúngica crônica conhecida como *tinea ungueal* que afeta as unhas e pode ser causada por dermatófitos, fungos filamentosos não dermatófitos e leveduras (principalmente espécies do gênero *Candida*). É uma das doenças mais comuns em muitos países. Em 80% dos casos de onicomicose, o acometimento afeta as unhas dos pés e *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* são as espécies causadoras da infecção em mais de 90% dos casos.^{44,45} Cinco tipos de onicomicoses, caracterizadas conforme a apresentação clínica e a via de invasão, são conhecidas: onicomicose subungueal distal e lateral, superficial branca, subungueal proximal, e distrófica total.^{30,31}

A maioria dos casos de onicomicose subungueal distal e lateral deve-se à infecção por dermatófitos. Esse tipo de onicomicose geralmente afeta o hiponíquio, nas bordas laterais, e segue proximalmente ao longo do leito, resultando em hiperkeratose e onicolise (descolamento da lâmina do leito ungueal). Esse espaço subungueal acaba servindo como um reservatório de bactérias e fungos, que darão aspecto marrom-amarelado à lesão. Onicomicose subungueal distal e lateral pode desenvolver-se nas unhas das mãos, dos pés ou de ambos, e a principal espécie causadora da infecção é *T. rubrum*. Entretanto, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* e *E. floccosum* também são reconhecidos como agentes causadores.^{46,47} Enquanto que a onicomicose subungueal proximal

Essa infecção é também conhecida como onicomicose subungueal proximal branca e constitui um subtipo relativamente raro, que ocorre quando microrganismos invadem a unha através da cutícula, penetram na lâmina ungueal e migram para a porção distal. A apresentação clínica inclui hiperkeratose subungueal, onicolise proximal, leuconíquia e destruição da lâmina ungueal proximal. No Brasil, *T. rubrum* é o principal agente causador da onicomicose subungueal proximal. Embora essa infecção seja de ocorrência rara na população em geral, sua frequência aumenta em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana (AIDS), sendo considerado um marcador clínico precoce de infecção por HIV. A infecção pode ainda ocorrer secundariamente a trauma e, além disso, condições como doença vascular periférica e diabetes também podem apresentar-se dessa maneira.^{40,48}

A onicomicose superficial branca é uma infecção que ocorre quando certos fungos invadem diretamente a camada superficial da lâmina ungueal. Posteriormente, a infecção pode mover-se através da lâmina ungueal para infectar a camada queratinizada (leito e o hiponíquio). Esse tipo de onicomicose caracteriza-se pela presença de opacidades bem-delineadas, conhecidas como "ilhas brancas" na placa ungueal externa, que se aglutinam e se espalham conforme a doença progride. Nesses locais, a unha fica áspera, maleável e friável. Em geral, não há foco de inflamação, pois o tecido viável não está envolvido. A onicomicose branca superficial ocorre principalmente nas unhas dos pés, sendo *T. mentagrophytes* o agente etiológico mais comum.^{44,47}

Qualquer uma das variedades citadas de onicomicose pode eventualmente evoluir para distrofia ungueal total, situação em que a lâmina ungueal é quase totalmente destruída⁴⁴ e então é denominada de onicomicose distrófica total.

6. DIAGNÓSTICO DAS DERMATOFITOSE

Dermatofitose pode não ser facilmente diagnosticada apenas com base nas manifestações clínicas, dado que inúmeras patologias apresentam características semelhantes a esse tipo de infecção. Contudo, a sua identificação é essencial para o diagnóstico correto e para a adoção adequada das estratégias terapêuticas.^{50,51} Assim, o diagnóstico diferencial das dermatofitoses inclui dermatite seborreica, dermatite atópica, dermatite de contato, psoríase, candidíase, eritrasma e eczema.⁵² Convém salientar que é mais difícil diagnosticar dermatofitose em pacientes imunodeprimidos, pois as apresentações clínicas são frequentemente atípicas.⁵³

Além da observação das condições dermatológicas, o exame micológico direto é a forma de diagnóstico rápido das dermatofitoses, e o exame cultural identifica o agente etiológico da infecção. Para tanto, é importante que se faça uma coleta adequada do material, já que o resultado da análise laboratorial depende diretamente da qualidade (presença de estruturas fúngicas) na amostra clínica.³ No entanto, esse tipo de diagnóstico apresenta limitações, pois muitas vezes os fungos não crescem em cultura, cujo tempo de espera é cerca de uma a três semanas. Recomenda-se então a realização de ao menos duas amostras sequenciais para melhorar a precisão do diagnóstico micológico, sobretudo antes de iniciar o tratamento antifúngico oral.⁵⁴ Além disso, isolados de pacientes em tratamento com antifúngicos geralmente não apresentam cultura com morfologia característica.

6.1 Assimilação de fontes de carbono e nitrogênio

Testes bioquímicos como assimilação e fermentação de fontes de carbono, usados com sucesso na identificação de outros organismos como bactérias e leveduras, não são comercialmente disponíveis para dermatófitos. Contudo, ao longo dos anos, alguns estudos utilizando diferentes fontes de carbono foram realizados na tentativa de diferenciar espécies de dermatófitos a partir de testes nutricionais.²⁷ Apesar desse esforço, a contribuição de métodos bioquímicos para a identificação de espécies de dermatófitos é bastante limitada.

Em 1923, Hopkins e Iwamoto verificaram a assimilação de diferentes compostos de carbono como únicas fontes de carbono. Como resultado, observaram que as diferenças na capacidade de assimilar os compostos dependiam da espécie.⁵⁵

Em 1977, Philpot investigou a capacidade de 147 isolados de dermatófitos pertencentes a 22 espécies quanto à capacidade de assimilar 23 fontes de carbono e quatro fontes de nitrogênio e de hidrolisar caseína, tirosina, amido, gelatina e ureia. Foram observadas diferenças entre espécies na taxa de crescimento em onze das fontes de carbono, duas das fontes de hidrogênio e o tempo necessário para hidrolisar ureia. As diferenças no padrão de assimilação das fontes de carbono não se correlacionaram com as divisões morfológicas.⁵⁶

Em 1991, Rezusta et al. avaliaram a capacidade de assimilação de 19 fontes de carbono por isolados de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*. Dos compostos testados, glicerol, 2-ceto-D-gluconato, L-arabinose, xilose, adonitol, xilitol, inositol, ácido alfa-metil-D-glucósido, lactose, sacarose, melezitose e rafinose não foram assimilados por nenhum dos isolados. Sorbitol foi assimilado por todos os isolados de *T. rubrum* e por nenhum isolado de *T. mentagrophytes*.⁵⁷

Em 2001, Santos et al. testaram a capacidade de 53 isolados de *T. rubrum* de assimilar 21 fontes de carbono. No estudo, nenhuma das amostras assimilou as fontes de carbono arabinose, dulcitol, lactose, melibiose, ribose e xilose, enquanto todas as amostras assimilaram maltose, sacarose e sorbitol.⁵⁸

6.2 Diferenciação de dermatófitos por biologia molecular

Com o desenvolvimento da biologia molecular, técnicas como PCR seguido de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), PCR em tempo real, PCR multiplex, PCR utilizando primers arbitrários (AP-PCR), análise de DNA amplificado ao acaso (RAPD), análise de DNA mitocondrial e sequenciamento de regiões ITS foram adaptados para a detecção de dermatófitos a partir de amostras clínicas.⁵⁹ Recentemente, passou a ser comercializado um kit baseado em PCR-ELISA, o qual utiliza sondas específicas para dermatófitos. Esse teste permite o diagnóstico de onicomicose em apenas 24-48 horas após a coleta.

Em estudo realizado com 438 pacientes com suspeita de onicomicose, o kit demonstrou sensibilidade próxima à encontrada em técnicas micológicas convencionais.²⁷ No entanto, como não é fornecida a identificação da espécie, o exame cultural continua sendo

essencial. Tal problema poderia ser definitivamente resolvido com a utilização de métodos de hibridização de oligonucleotídeos, que permitem tanto a detecção direta de DNA de fungos em amostras clínicas quanto a identificação em nível de espécie.⁶⁰⁻⁶²

Para diferenciação de espécies do complexo *T. mentagrophytes*, o mais adequado é obter dados de sequência a partir das regiões internas espaçadoras (ITS) do rDNA. A vantagem desse método é que todos os outros dermatófitos, incluindo a maioria dos patogênicos para os seres humanos, podem ser identificados. Outros segmentos de genes adequados são aqueles que codificam sintetase de quitina I e a subunidade ribossomal (28S) maior.⁹

7. TRATAMENTO

Agentes de uso tópico são as escolhas mais frequentes para tratamento de dermatofitoses. Entretanto, nos casos de *tinea unguium* e *tinea capitis*, bem como para pacientes imunocomprometidos, a via mais recomendada é a oral.³ Entre os agentes de uso tópico, destacam-se diversos antimicóticos imidazólicos e seus derivados, agentes morfolínicos (amorolfina), alilamínicos (terbinafina, naftifina e butenafina), hidroxipiridonas (ciclopirox olamina e piroctona olamina) e outros agentes representantes de várias classes de medicamentos.⁶³ Para uso oral, os antimicóticos de escolha são os derivados azólicos cetoconazol, itraconazol e fluconazol, seguidos de alilamina terbinafina e griseofulvina.^{3,64}

A incidência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a urgência no desenvolvimento de mais efetivas para o tratamento destas doenças. A descoberta de novos alvos exclusivos dos fungos e o entendimento dos mecanismos moleculares de resistência são etapas fundamentais neste processo.^{65,66} A resistência microbiana deve-se a mutações que ocorrem naturalmente nas células, e a droga apenas age como agente seletivo daquelas mais resistentes de uma população. Assim, os isolados que apresentam mutações estáveis ligadas à resistência irão predominar e persistir, mesmo na ausência da pressão seletiva da droga.⁶⁷ Dentre os mecanismos de resistência utilizados pelos fungos é importante ressaltar a superprodução de enzimas, a implementação de vias metabólicas alternativas e a produção de bombas de efluxo que expulsam o medicamento da célula fúngica.⁶⁷⁻⁷⁰

7.1 Antifúngicos

A preferência por tratamentos com antimicóticos de uso tópico está associada a infecções que não acometem grandes áreas.⁷¹ Alguns autores consideram que esse tipo de terapia só é eficaz quando realizada nos estágios iniciais da infecção.⁷² Para onicomicoses, por exemplo, o fracasso terapêutico com uso de agentes tópicos pode chegar a 85% dos casos. Em geral, os resultados obtidos com esse tipo de terapia podem ser melhorados mediante associação com tratamentos que utilizam medicações antimicóticas de uso oral. Em termos terapêuticos, a utilidade do tratamento com antifúngicos de uso tópico é indicada como profilaxia ou nos casos em que há contraindicação da administração oral.^{63, 73, 74}

O tratamento com terapia oral é recomendado para pacientes que apresentam fracasso terapêutico através da administração de antifúngicos de uso tópico. Nesses casos, pode ocorrer associação de antifúngicos, embora não ocorra aumento no espectro de ação, mas sim a potencialização do efeito terapêutico. De modo geral, a escolha do tratamento por via oral produz melhores resultados que o tratamento tópico; porém, a eliminação por via hepática e renal da maioria dos antifúngicos é uma das desvantagens que esse tipo de terapia apresenta.^{63, 73}

7.1.1 Alilaminas

Os antifúngicos dessa classe têm mecanismo de ação fundamentado na inibição seletiva da enzima esqualeno epoxidase, a qual está envolvida na síntese do ergosterol, um constituinte da membrana celular fúngica.⁷⁴ Fármacos dessa classe desempenham tanto ação fungicida quanto fungistática. A terbinafina, principal representante, é o antifúngico de escolha para tratamento de fungos dermatófitos que causam onicomicoses, *tinea unguium* e *tinea capitis*,³ apresentando elevada atividade contra fungos dermatófitos, fungos filamentosos, dimórficos e dematiáceos, além de algumas espécies de levedura.⁷⁵

A formulação tópica da terbinafina é rapidamente absorvida pela pele, pelo tecido adiposo e pelas unhas, devido ao caráter lipofílico da molécula. Quando utilizada na forma oral, o mecanismo de ação desse antifúngico não interfere na ação de enzimas dependentes do citocromo P450, mas os efeitos adversos causados por sua utilização incluem alterações cutâneas, distúrbios gastrintestinais leves e outros efeitos colaterais de maior importância,

como disfunção hepática. Por isso, a terbinafina está contraindicada para pacientes com tal disfunção, já que nessa condição os níveis plasmáticos do fármaco são aumentados de maneira imprevisível.⁷⁶

7.1.2 Azóis

O mecanismo de ação desse grupo de antifúngicos restringe-se à inibição da enzima lanosterol-14- α -demetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450. Essa inibição prejudica a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática e acarreta o acúmulo de 14- α -metilesteróis, que não apresentam a mesma forma nem as mesmas propriedades físicas que o ergosterol e levam à formação da membrana com propriedades alteradas, não desempenhando as funções básicas necessárias ao desenvolvimento do fungo. Podem ter ação fungicida ou fungistática, dependendo do fármaco e da dose de tratamento.⁷⁴

Os representantes dessa classe de antimicótico atuam mais lentamente se comparados com os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e demonstram seletividade maior para as membranas fúngicas do que para as membranas dos mamíferos, o que garante menor toxicidade. Além disso, alguns representantes como o itraconazol, por exemplo, apresentam acentuado caráter lipofílico, o que facilita o acúmulo de moléculas ativas no estrato córneo da pele.^{63,76}

7.1.2.1 Azóis de administração oral

Cetoconazol, itraconazol e fluconazol são três derivados azólicos de absorção oral. Os dois primeiros são lipofílicos, enquanto o terceiro é hidrofílico. Eles apresentam um espectro de atividade bastante semelhante contra fungos dermatófitos; porém, para outras espécies de fungos, o seu espectro de ação e a sua farmacodinâmica são diferenciados.³

7.1.2.2 Azóis de administração tópica

O tioconazol é um antifúngico com amplo espectro de ação, sendo ativo contra leveduras, fungos filamentosos dermatófitos e não dermatófitos, bem como bactérias.

Apresenta perfil de atividade superior ao do miconazol, sendo principalmente eficaz para o tratamento de micoses com infecção secundária por bactérias.⁶³

O miconazol é indicado para o tratamento de onicomicoses causadas pelo gênero *Candida* e para a profilaxia de dermatofitoses, com a finalidade de evitar reinfecções.^{63,72}

7.1.3 Griseofulvina

A griseofulvina foi o primeiro antifúngico químico com capacidade seletiva contra os fungos a ser testado em humanos.⁷⁷ O seu mecanismo de ação fundamenta-se na interferência sobre a estrutura e sobre a função dos microtúbulos, o que resulta em um efeito inibitório da reprodução celular. O fármaco acumula-se preferencialmente em células precursoras de queratina, proporcionando o aumento da resistência dessa proteína ao ataque dos fungos queratinofílicos. Sua atividade fungistática só é ativa sobre fungos dermatófitos.^{63,78}

7.1.4 Hidroxipiridonas

Fármacos dessa classe, como o cicliporox olamina e a piroctona olamina, são substâncias que atuam como bloqueadoras da reprodução celular, constituindo-se em antifúngicos de rápida absorção por via oral cuja eliminação se dá por via renal. Na formulação em creme ou gel, a atividade desses fármacos é vista em leveduras, fungos dermatófitos e outros fungos filamentosos.^{63,75}

7.1.5 Morfolinas

A amorolfina, principal representante dessa classe de antimicóticos, é uma substância de amplo espectro e elevada atividade antifúngica para o tratamento de onicomicoses. Seu mecanismo de ação fundamenta-se na modificação da permeabilidade da membrana fúngica, inibindo a síntese de ergosterol mediante a inibição das enzimas delta-14-redutase e delta-7,8-isomerase. Ensaios clínicos relatam que o seu potencial de ação varia de 60% a 76%. Sua principal vantagem é a capacidade de atuar sobre estruturas de resistência dos fungos e, por isso, reduz o risco de recidivas.⁶³

7.1.6 Polienos

Esses antifúngicos são produzidos por várias espécies de *Streptomyces*. Atuam na membrana associando-se aos esteróis e formando poros. A formação desses poros destrói o equilíbrio iônico da célula por permitir a livre troca de pequenos íons. A maioria das células eucariotas possui esteróis em sua membrana, fazendo com que os antifúngicos da família dos polienos não apresentem uma ação seletiva.⁷⁹

A anfotericina B, principal representante dessa classe, é utilizada em injeções intravenosas, sendo empregada principalmente em tratamentos de doenças fúngicas que representam risco para a vida. O seu largo espectro faz desse composto a escolha ideal para o uso imediato e antes da possível identificação do fungo. No entanto, a utilização intravenosa da anfotericina B provoca sérios efeitos tóxicos, especialmente sobre os rins.⁷⁷

7.1.7 Novos antifúngicos

Na última década, as investigações sobre novos antifúngicos têm-se concentrado em melhorar antigas formulações e torná-las menos tóxicas, além de desenvolver novos fármacos com base em estruturas já conhecidas. A partir da primeira geração de triazólicos surgem o voriconazol, o ravuconazol e o posaconazol, classificados como a segunda geração de triazólicos, sendo mais potentes e apresentando amplo espectro de ação sobre leveduras e fungos filamentosos.⁸⁰ Com aprovação concedida em 2002, o voriconazol é estruturalmente relacionado ao fluconazol e também possui biodisponibilidade clinicamente relevante após administração oral, pois não sofre degradação pelo pH gástrico. Com características farmacocinéticas complexas, o voriconazol apresenta extensa metabolização hepática, meia-vida estimada em aproximadamente 24 horas com doses de 4-6 mg/kg endovenosa duas vezes ao dia,^{80,81} além de atingir concentrações terapêuticas no líquido cefalorraquidiano, sendo sugerido como potencial alternativa terapêutica para tratamento de meningite criptocócica.⁸²

A síntese de novos derivados triazólicos como o KP-103, o qual apresenta boa atividade *in vitro*, tem oferecido uma alternativa para o tratamento de infecções fúngicas por via tópica. Alguns ensaios de *tinea unguium* em modelos animais têm revelado uma atividade superior dessa molécula em comparação à terbinafina oral e à amorolfina tópica. De modo

semelhante, o óxido de cariofilina, molécula utilizada como conservante alimentar, também tem demonstrado atividade em modelos animais de onicomicoses.^{63, 83}

7.1.8 Tratamento combinado

A combinação de antifúngicos tem produzido avanços no tratamento de infecções fúngicas, em especial daquelas que se mostram graves e múltiplas. São descritas associações de terbinafina e itraconazol oral administrados de forma consecutiva; administração tópica de tioconazol e griseofulvina oral, ciclopirox olamina e terbinafina, amorolfina e griseofulvina, entre outras combinações. Algumas dessas combinações têm efeito sobre estruturas de resistência dos fungos dermatófitos, mas todas elas apresentam evidências de melhora das infecções quando comparadas ao tratamento oral convencional com apenas um antifúngico.⁸⁴

Em 2003, Gupta et al. testaram a suscetibilidade de 110 isolados de dermatófitos a ciclopirox olamina, itraconazol e terbinafina. O ciclopirox também foi testado em combinação com itraconazol e terbinafina. No estudo, os testes de suscetibilidade *in vitro* indicaram que a terbinafina foi o agente mais potente e que o ciclopirox pode ter um amplo perfil antimicrobiano, incluindo dermatófitos, leveduras e outros fungos não dermatófitos. Avaliação *in vitro* da atividade de ciclopirox e terbinafina sugere exemplos de sinergismo ou aditismo; para ciclopirox e itraconazol, o estudo demonstrou que pode haver um sinergismo, indiferença ou aditismo.⁸⁵

Em 2006, Santos e Hamdan testaram a atividade antifúngica *in vitro* de 52 isolados de *T. rubrum* e 40 isolados de *T. mentagrophytes* para griseofulvina, terbinafina, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e ciclopirox olamina. A combinação de itraconazol e ciclopirox olamina e cetoconazol e ciclopirox olamina também foi investigada. No estudo, a terbinafina foi o antifúngico mais ativo contra os isolados testados, seguido de itraconazol, ciclopirox olamina, cetoconazol, griseofulvina e fluconazol. Além disso, as combinações entre itraconazol e ciclopirox olamina e cetoconazol e ciclopirox olamina revelaram efeito sinérgico.⁸⁶

Em 2007, Amit et al. avaliaram a eficácia do uso de terbinafina por via oral e em combinação com a administração tópica de ciclopirox olamina 8% ou cloridrato de amorolfina tópica 5% em pacientes com oncomicose causada por dermatófitos. O estudo

demonstrou que o uso de terbinafina é uma alternativa eficaz e segura para o tratamento de onicomicoses. Por outro lado, a terapia de combinação com ciclopirox tópica ou amorolfina não mostrou nenhuma diferença significativa na eficácia em comparação à monoterapia com terbinafina oral.⁸⁷

Em 2011, Shi et al. avaliaram o efeito sinérgico da tetrandrina sobre a atividade antifúngica tópica do cetoconazol. As concentrações inibitórias mínimas para cetoconazol e cetoconazol combinado com tetrandrina foram comparadas *in vitro*. Como resultado, observou-se que a tetrandrina aumentou a eficácia clínica do creme de cetoconazol no tratamento de dermatofitoses.⁸⁸

8. AVALIAÇÃO DE SUSCETIBILIDADE

Entre os métodos utilizados para realização de testes de suscetibilidade a antimicrobianos, o teste de disco-difusão é o teste de escolha para avaliar patógenos comuns e de crescimento rápido. Entretanto, não são aceitáveis testes de disco-difusão baseados apenas na presença ou na ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo.⁸⁹

Além disso, tal metodologia depende diretamente da difusão do agente antimicrobiano no meio de cultura, o que se torna bastante problemático para fármacos lipossolúveis, como acontece com a maior parte dos antifúngicos. Considerando essa metodologia e os agravos na evolução das doenças fúngicas humanas, tornou-se imprescindível o aperfeiçoamento das metodologias laboratoriais para determinação das suscetibilidades *in vitro* dos diferentes patógenos frente aos agentes antifúngicos disponíveis para uso clínico. A possibilidade de prever o insucesso terapêutico revela a importância da correlação entre um ensaio de suscetibilidade e a resposta clínica. Esses testes também podem ser utilizados na descoberta de novos fármacos e em estudos epidemiológicos.⁹⁰

Em diversos estudos, métodos como macro e microdiluição em caldo, diluição em ágar, E-test[®] e disco-difusão foram utilizados para determinar a suscetibilidade de dermatófitos em relação aos agentes antifúngicos. Contudo, em 2002, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) padronizou um método de microdiluição em caldo para testes de suscetibilidade de agentes antifúngicos contra alguns fungos filamentosos. Tal padronização está descrita no documento M38-A, porém os fungos dermatófitos não foram incluídos.

Vários estudos *in vitro* foram realizados com metodologia semelhante à descrita pelo protocolo M38-A, incluindo alguns parâmetros como temperatura, tempo de incubação, meio de cultura e concentração do inóculo adaptados a esses fungos.^{64,91-94} Em 2008, o CLSI suplementou o documento M38-A2, o qual forneceu os moldes padronizados para testar a atividade antifúngica de fungos filamentosos, incluindo dermatófitos, a partir da técnica de microdiluição em caldo.⁹⁵

Em 2003, Fernández-Torres et al. compararam a atividade antifúngica *in vitro* de eberconazol e cloritrimazol, cetoconazol e miconazol contra 200 isolados pertencentes a 19 espécies de dermatófitos. Em geral, todos os antifúngicos apresentaram boa atividade, embora o eberconazol tenha apresentado a menor média geométrica entre os quatro antifúngicos testados.⁹⁶

Em 2004, Carrilo-Muñoz et al. avaliaram a atividade antifúngica de anfotericina B em comparação à atividade de griseofulvina, cetoconazol, cloritrimazol e terbinafina frente a 193 isolados de fungos dermatófitos e *Scopulariopsis brevicaulis*. No estudo, anfotericina B apresentou atividade antifúngica semelhante à do cetoconazol, porém inferior à da terbinafina e do cloritrimazol.⁹⁷

Em 2006, Santos et al. apresentaram os resultados dos estudos de suscetibilidade *in vitro* de 52 isolados de *T. rubrum* e 40 de *T. mentagrophytes* para griseofulvina, terbinafina, itraconazol, cetoconazol, fluconazol e ciclopiroxolamina. Além disso, investigaram a combinação de ciclopiroxolamina, itraconazol, ciclopiroxolamina e cetoconazol. A análise dos dados revelou que a terbinafina foi o antifúngico mais eficaz *in vitro* contra todos os isolados, seguido por itraconazol, ciclopiroxolamina, cetoconazol e fluconazol. Interações sinérgicas foram observadas nas duas combinações de antifúngicos com todos os isolados testados de dermatófitos.⁹⁸

Em 2007, Barros et al. avaliaram o perfil de suscetibilidade de 50 isolados de dermatófitos pertencentes às espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* contra fluconazol, itraconazol, terbinafina e griseofulvina. No estudo, a terbinafina foi o agente mais potente. Entre os azólicos, o itraconazol mostrou-se mais ativo que o fluconazol.⁹⁹

Em 2007, Nwezei et al. investigaram o perfil de suscetibilidade de 71 isolados de dermatófitos de diferentes espécies contra os antifúngicos itraconazol, cetoconazol,

fluconazol, terbinafina e griseofulvina. No estudo, o cetoconazol apresentou os melhores resultados de concentração inibitória mínima, seguido pela terbinafina e pelo itraconazol.¹⁰⁰

Em 2009, Araújo et al. investigaram o perfil de suscetibilidade de 60 isolados de dermatófitos pertencentes às espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* contra os antifúngicos fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terbinafina e griseofulvina. Em geral, as espécies de dermatófitos apresentaram padrões semelhantes de suscetibilidade a cada agente antifúngico testado.¹⁰¹

Em 2009, Mota et al. compararam os métodos de diluição em ágar e diluição em caldo para a determinação de concentração inibitória mínima de fluconazol, itraconazol, cetoconazol, griseofulvina e terbinafina para 60 amostras de dermatófitos pertencentes às espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*. A porcentagem de acordo entre os dois métodos para todos os isolados testados foi de 91,6% para cetoconazol e griseofulvina, de 88,3% para itraconazol, de 81,6% para terbinafina e de 73,3% para fluconazol. Uma concordância de 100% foi obtida para isolados de *T. mentagrophytes* avaliados com cetoconazol e griseofulvina.¹⁰²

Em 2010, Ozcan et al. testaram a suscetibilidade *in vitro* de isolados de dermatófitos de pacientes diabéticos e não diabéticos para terbinafina, itraconazol e fluconazol. Os valores médios de concentração inibitória mínima desses agentes antifúngicos para todos os isolados de dermatófitos foram semelhantes nos dois grupos, sendo a terbinafina o agente mais ativo *in vitro* em ambos os grupos.¹⁰³

Em 2010, Bueno et al. investigaram a atividade *in vitro* dos antifúngicos terbinafina, itraconazol, voriconazol e fluconazol, segundo o protocolo M38-A do CLSI, com modificações para dermatófitos. No estudo, a terbinafina e o voriconazol foram os antifúngicos mais potentes contra os 30 isolados de dermatófitos testados.¹⁰⁴

Em 2012, Itoi et al. testaram a suscetibilidade *in vitro* de 54 isolados clínicos de dermatofitos oriundos de animais para cetoconazol, itraconazol e terbinafina usando os testes de microdiluição (CLSI M38-A2) e o E-test®. No estudo, os valores de concentração inibitória mínima desses agentes foram semelhantes para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* isolados de humanos e animais.¹⁰⁵

9. FATORES DE VIRULÊNCIA

A secreção de enzimas proteolíticas por dermatófitos é um fator-chave em sua invasão e posterior disseminação através do estrato córneo do hospedeiro. Durante as primeiras fases da infecção, os dermatófitos secretam enzimas como adesinas, lipases, fosfatases, DNases, proteases não específicas e queratinases.¹⁰⁶ Essa maquinaria enzimática é um dos fatores de virulência mais bem-caracterizados dos dermatófitos, permitindo a hidrólise de componentes estruturais do tecido epidérmico e fazendo com que esses patógenos tornem-se invasivos.¹⁶

Estudos têm demonstrado que, para os dermatófitos, as queratinases representam os fatores de virulência mais importantes na invasão do tecido do hospedeiro, enquanto as elastases influem na indução de lesões na pele humana. A DNase em níveis elevados está correlacionada à intensidade da inflamação gerada pela infecção, ao passo que as lipases e proteases desempenham um papel relevante na fase inicial de infecção e em sua patogênese.¹⁰⁷

Em 1994, Lopez-Martinez et al. investigaram a atividade enzimática das espécies de dermatófitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis* e *E. floccosum*. Os resultados demonstraram que 84,2% dos isolados produziram DNase, 82,9% elastase e 65,8% lipase, sendo que todos os isolados de *T. rubrum* produziram lipase.¹⁰⁸

Em 1997, Muhsin et al. demonstraram que os dermatófitos *E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* apresentam atividade lipolítica quando cultivados em diferentes fontes de lipídios, resultando na secreção de lipases e fosfolipases. Os autores também observaram elevada atividade queratinofílica e secreção de proteases pelos isolados testados.¹⁰⁹

Em 2001, Muhsin et al. verificaram a produção de enzimas hidrolíticas em dermatófitos, relatando que todas as espécies testadas produziram queratinase, mais intensamente por isolados de *T. mentagrophytes* var. *erinacei*, *M. gypseum*, *E. floccosum*. As espécies *M. gypseum*, *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes* var. *nodulare* foram capazes de produzir protease, lipase e amilase. Nesse estudo, os isolados de *T. mentagrophytes* var. *erinacei* não produziram lipase e amilase.¹¹⁰

Em 2002, Santos et al. descreveram a atividade de queratinase, proteinase, fosfolipase, lipase e DNase em 53 isolados de *T. rubrum*. Os autores observaram que todos os isolados

secretaram queratinase e DNase, enquanto nenhum deles foi capaz de secretar fosfolipase. Lipase e proteinase foram secretadas apenas por alguns isolados.⁵⁸

Em 2005, Silva et al. descreveram a atividade de amostras de *T. rubrum* isolados de pacientes com HIV e AIDS quanto à capacidade de secretar queratinases, proteases, fosfolipases, lipases e DNases. Em relação à secreção das enzimas, todas as amostras secretaram queratinases e DNases, enquanto nenhuma delas secretou fosfolipase. Proteases e lipases foram secretadas apenas por alguns deles.¹¹¹

Em 2011, Cafarchia et al. testaram a atividade de *M. canis* e *T. mentagrophytes* para as enzimas elastase, gelatinase, queratinase, lipase e DNase. Isolados de *T. mentagrophytes* produziram as cinco enzimas testadas, enquanto isolados de *M. canis* não produziram elastase e gelatinase.¹¹²

10. OBJETIVOS

10.1 Objetivo geral

Determinar a identidade genética, caracterizar por meio do perfil de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio 26 isolados de dermatófitos do gênero *Trichophyton*.

10.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos incluem:

- a) identificar o perfil enzimático e o perfil de assimilação de hidratos de carbono;
- b) avaliar a suscetibilidade *in vitro frente* aos antifúngicos comercialmente disponíveis: anfotericina B, cetoconazol, ciclopirox olamina, fluconazol, griseofulvina, itraconazol, miconazol, piroctona olamina, terbinafina, tioconazol e voriconazol;
- c) caracterizar o perfil genético por meio de sequenciamento da região interna do gene DNA ribossomal

11. REFERÊNCIAS

1. Mims C, Playfair JHL, Roitt I, Wakelin D, Williams R. *Microbiologia médica*. 1.ed. São Paulo: Ed. Manole LTDA., 1995. p. 28.14.
2. Greer DL. An overview of common dermatophytes. *J Am Acad Dermatol*. 1994;31:S112-16.
3. Rubio MA, Rezusta A, Tomás JG, Ruesca RB. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Rev Iberoam Micol*. 1999;16:16-22.
4. Seeliger HPR. The discovery of *Achorion Schoenleinii*: facts and “stories”. *Mykosen* 1985;28:161-82.
5. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8(2):240-59.
6. Negroni, R. Historical aspects of dermatomycosis. *Clin Dermatol*. 2010; 28(2):125-32.
7. Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. *J Med Microbiol*. 1997; 46:1043-46.
8. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale?* A dermatophyte in the course of time. *JDDG*. 2007; 5:198-202.
9. Summerbell RC, Kane J. The genera *Trichophyton* and *Epidermophyton*. In: Kane J, Summerbell RC, Sigler L, Krajden S, Land G. *Laboratory handbook of dermatophytes*. Star Publishing Company, Belmont, USA, 1997: 131-191.
10. Summerbell RC. *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, and agents of superficial mycoses. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 2003 ;2(8):1798-1819.
11. Priestley H. Ringworm and allied parasitic skin diseases in Australia. *Med J Aus*. 1917; 2:471-75.
12. Ajello L. A taxonomic review of the dermatophytes and related species. *Sabouraudia* 1967;6:147-59.

13. Rippon JW. Dermatophytosis and dermatomycosis. In: *Med Mycol J.* 1982:154-248.
14. Anzawa K, Kawasaki M, Hironaga M, Mochizuki T. Genetic relationship between *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *Arthroderma vanbreuseghemii*. *Med Mycol J.* 2011; 52(3):223-7.
15. Rezende C, Borsari GP, Da Silva AC, Cavalcanti FR. Dermatophytosis epidemiologic study in public institution of Barretos city, São Paulo, Brazil. *Rev Bras An Clin.* 2008; 40(1):13-6.
16. Ellabib MS, Khalifa Z, Kavanagh K. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Tripoli, Libya. *Mycoses* 2002; 45:101-4.
17. Morar N, Dlova NC, Gupta AK, Aboobaker J. *Tinea capitis* in Kwa-Zulu Natal, South Africa. *Paediatr Dermatol.* 2004; 21:444-7.
18. Woldeamanuel Y, Leekassa R, Chryssanthou E. Prevalence of *tinea capitis* in Ethiopian school children. *Mycoses* 2005; 48:137-41.
19. Araújo CR, Miranda KC, Fernandes OFL, Soares AJ, Silva MRR. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med Trop.* 2009; 51(1):9-12.
20. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi, NM. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol.* 2010; 85(5):657-67.
21. Costa-Orlandi CB, Magalhães GM, Oliveira MB, Taylor EL, Marques CR, de Resende-Stoianoff MA. Prevalence of dermatomycosis in a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 2012; 174(5-6):489-97.
22. Rezende C, Borsari GP, Silva ACF, Cavalcanti FR. Dermatophytosis epidemiologic study in public institution of Barretos city, São Paulo, Brazil. *Rev Bras An Clin.* 2008; 40(1):13-16.
23. Cortez AC, de Souza JV, Sadahiro A, de Oliveira JA. Frequency and a etiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2012; 29(4):223-6.

24. Murray PR, Kobayashi GS, Pfaller M.A., Rosenthal KS. Superficial, cutaneous and subcutaneous mycosis. In: *Microbiol Med*. 1994: 404-37.
25. Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 2010; 28:197-201.
26. Fernández-Torres AJ, Carrillo E, Martin A, Del Palacio MK, Moore A, Valverde M, Serrano, Guarro J. *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45(9):2524-8.
27. Robert R, Pihet M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; 166(5-6):295-306.
28. Disponível on-line em <http://www.hardydiagnostics.com/>.
29. CMPT Basic Mycology 0704-2 *T. mentagrophytes*.
30. Padhye AA, Weitzman I. The dermatophytes. *Med Mycol J* 1999; 9(4): 215-36.
31. Degreef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia* 2008;166(5-6):257-65.
32. Bolognia JL, Bolognia J, Bylaws Task Force. Proposed revisions to bylaws of the International Society of Dermatology. *Int J Dermatol*. 2009; 48(2):196-200.
33. Degreef H, De Doncker P, editors. *Fighting fungal infections around the globe. Itraconazole in perspective*. Kent: Wells Medical Holdings, 2000. p. 57-89.
34. Leyden JJ. Progression of interdigital infections from simplex to complex. *J Am Acad Dermatol*. 1993; 28(5):7-11.
35. Cantrell WC, Jacobs MK, Sobera JO, Parrish CA, Warner J, Elewski BE. *Tinea capitis* in Birmingham: Survey of Elementary School Students. *Pediatr Dermatol*. 2010; *In press*.
36. Del Boz J, Crespo V, Rivas-Ruiz F, De Troya M.A 30-year survey of paediatric *tinea capitis* in southern Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2010; *In press*.
37. Rook A, Dawber R. Ringworm of the scalp. In: *Infections and infestations: diseases of the hair and scalp*. London: Blackwell Scientific Pub., 1982. p. 367-85.

38. Elewski BE. *Tinea capitis*: a current perspective. *J Am Acad Dermatol.* 2000; 42:1-20.
39. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. *Tinea capitis* in dermatophytosis and other superficial mycosis. In: *Principles and practice of infectious disease.* New York: Churchill Livingstone, 1995. p. 2379-82.
40. Ang CC, Tay YK. Inflammatory *tinea capitis*: non-healing plaque on the occiput of a 4-year-old child. *Ann Acad Med Singapore* 2010; 39(5):412-4.
41. Matte SMW, Lopes JO, Melo IS, Beber AAC. A focus of favus due to *Trichophyton schoenleinii* in Rio Grande do Sul. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39(1):1-3.
42. Hay R, Bendeck SE, Chen S, Estrada R, Haddix A, McLeod T, et al. Skin Diseases. In: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, editors. *Disease Control Priorities in Developing Countries.* 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006. p. 707-721.
43. Romano C, Maritati E, Gianni C. *Tinea incognita* in Italy: a 15-year survey. *Mycoses.* 2006; 49:383–387.
44. Roberts DT, Taylor WD, Boyle J. Guidelines for treatment of onychomycosis. *Br J Dermatol.* 2003; 148:402-10.
45. Elewski BE. Onychomycosis: Pathogenesis, diagnosis and management. *Rev Clin Microbiol.* 1998; 11(3):415-29.
46. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2009; *In press.*
47. Elewski BE. Large scale epidemiological study of the causal agents of onychomycosis: mycological findings from the multicenter onychomycosis study of terbinafine. *Arch Dermatol.* 1997;133:1317-8.
48. Cohen JL, Scher RK, Pappert AS. *The nail and fungus infections* 1992, p.106-122.
49. Aly R, Berger T. Common superficial fungal infections in patients with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1996; 22(S2):128-32.

50. Shiraki Y, Soda N, Hirose N, Hiruma M. Screening examination and management of dermatophytosis by *Trichophyton tonsurans* in the Judo Club of a University. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* 2004; 45:7-12.
51. Urano S, Shirai S, Suzuki Y, Sugaya K, Takigawa M, Mochizuki T. A case of *tinea capitis* caused by *Trichophyton tonsurans*. *J Med Mycol.* 2003; 44:25-9.
52. Barry I, Hainer MD. Dermatophyte infections. *Am Fam Phys.* 2003; 67:101-8.
53. Odom RB. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. *J Am Acad Dermatol.* 1994; 31:56-9.
54. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica.* 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p. 252-352.
55. Hopkins, JG, Iwamoto K. 1923. Fermentation reactions of the ringworm fungi. *Arch Derm Syphilol.* 1923;8(6):838-43.
56. Philpot CM. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. *Sabouraudia* 1977; 15(2):141-50.
57. Rezusta A, Rubio MC, Alejandre MC. Differentiation between *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* by sorbitol assimilation. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(1):219-20.
58. Dos Santos JI, Vicente EJ, Paula CR, Gambale W. Phenotypic characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. *Eur J Epidemiol.* 2001; 17(8):729-35.
59. Jackson CJ, Barton RC, Evans EG. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(4):931-6.
60. Yang G, Zhang M, Li W, An L. Direct species identification of common pathogenic dermatophyte fungi in clinical specimens by semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Mycopathologia* 2008; 166:203-8.

61. Arabatzis M, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Kuijper EJ, de Hoog GS, Lavrijsen AP, Templeton K, Raaij-Helmer EM van der, Velegraki A, Gräser Y, Summerbell RC. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time Polymerase Chain Reaction detection/identification scheme. *Br J Dermatol*. 2007; 157:681-9.
62. Brillowska DA, Saunte DM, Arendrup MC. Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:1200-4.
63. Muñoz-Carrillo AJ, Tur Tur C, Hernández- Molina JM, Santos P, Cárdena D, Giusiano G. Antifúngicos disponibles para el tratamiento de las micosis ungueales. *Rev Iberoam Micol*. 2010; 27(2):49-56.
64. Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Munõz AJ, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:3999-4003.
65. Baixench MT, Aoun, N, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Ramires S, Piketty C, Dannaoui E. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(6): 1076-1083.
66. Perlin DS, Seto-Young D, Monk BC. The plasma membrane H(+)-ATPase of fungi. A candidate drug target? *Ann N Y Acad Sci*. 1997; 3(834): 609-617.
67. White TC, Kieren AM, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Reviews*. 1998; 11: 382-402.
68. Ferreira ME, Colombo A L, Paulsen I, Ren Q, Wortman J, Huang J, Goldman MH, Goldman GH. The ergosterol biosynthesis pathway, transporter genes, and azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol*. 2005; 43:313-319.
69. Goldman GH, Da Silva Ferreira ME, Dos Reis Marques E, Savoldi M, Perlin D, Park S, Godoy Martinez PC, Goldman MH, Colombo AL. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 50; 25-32.

70. Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(7): 1029-1050.
71. Gupta AK, Carney PS, Jegasothy SM, Turner JE, Werschler WP, Epstein B. Onychomycosis: management and treatment. *Cutis* 2004;74:16-25.
72. Del Palácio A, Garau M, Cuétara MS. Tratamiento actual de las dermatofitosis. *Rev Iberoam Micol.* 2002; 19:69-71.
73. Baran R, Gupta AK, Piérard GE. Pharmacotherapy of onychomycosis. *Expert Opin Pharmacother.* 2005; 6:609-24.
74. Baran R, Kaoukhov A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19:21-9.
75. Bennett, JE. Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. Goodman & Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica.* 10.ed. Rio de Janeiro: McGraw- Hill, 2003. p. 859-75.
76. Balfourds JA, Fauls D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic, properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs* 1992; 43:259-84.
77. Barak O, Loo DS. AN-2690, a novel antifungal for the topical treatment of onychomycosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2007; 8:662-8.
78. Odds, FC, Brown AJP, Gow NAR. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol.* 2003; 11(6):272-9.
79. Bellmann R. Clinical pharmacokinetics of systemically administered anti-mycotics. *Curr Clin Pharmacol.* 2007; 2:37-58.
80. Deacon, J. Principles and practice of controlling fungal growth. In: *Fungal biology.* 4.ed. Australia: Blackwell Publishing, 2006. p. 338-60.
81. Carrillo-Muñoz AJ, Brió S, Quindós G. Una nueva generación de fármacos antifúngicos. *Rev Iberoam Micol.* 2001; 8:2-5.

82. Chen SCA, Sorrel TC. Antifungal agents. *Medical J Aust.* 2007; 187(7):404-9.
83. Serena C, Pastor RFJ, Mariné M, Rodríguez M, Guarro J. Efficacy of voriconazole in a murine model of cryptococcal central nervous system infection. *J Antimicrob Chemot.* 2007; (60):162-5.
84. Carrillo-Munñoz AJ, Giusiano G, EzkurraPA , Quindós G. Mecanismos de acción de antifúngicos em leveduras. *Rev Esp Quimioter.* 2006; 19:130-9.
85. Grover C, Bansal S, Nanda S, Reddy BS, Kumar V. Combination of surgical avulsion and topical therapy for single nail onychomycosis: a randomized controlled trial. *Br J Dermatol.* 2007; 157:364-8.
86. Gupta AK, Kohli Y. Clinical and Laboratory Investigations In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol.* 2003; 149(2):296-305.
87. Santos DA, Hamdan JS. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. *J Med Mycol.* 2006; 44:357-362.
88. Amit J, SharmaRP, Garg AP. *Indian J Dermatol Venereol Lepr.* 2007; 73(6):393-396.
89. Shi JP, Zhang H, Zhang ZD, Zhang GH, Gao AL, Xiang SB. Synergistic effects of tetrandrine on the antifungal activity of topical ketoconazole cream in the treatment of dermatophytoses: a clinical trial. *Chin J Integr Med.* 2011; 17(7):499-504.
90. Clinical and Laboratory Standards Institute (2003). *Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão: norma aprovada.* Oitava Edição.
91. Rex JH, Pfaller MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Esoniel-Ingroff A, Ghannoum MA, Gosey LL, Odds FC, Rinaldi MG, Sheehan DJ, Warnock DW. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):643-8.
92. Gupta AK, Kohl Y. Clinical and Laboratory Investigations In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br J Dermatol.* 2003; 149:296-305.

93. Favre B, Hofbauer B, Hildering KS. Comparison of *in vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4817-9.
94. Mota CR, Miranda KC, Lemos J, Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, Menezes e Silva H, Silva Mdo R. Comparison of *in vitro* activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(3):250-4.
95. Ozcan D, Seçkin D, Demirbilek M. *In vitro* antifungal susceptibility of dermatophyte strains causing *tinea pedis* and onychomycosis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a case-control study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; *In press.*
96. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. Approved Standard- Second Edition.
97. Fernández-Torres B, Inza I, Guarro J. *In vitro* activities of the new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(11):5209-11.
98. Carrillo-Muñoz AJ, Santos P, del Valle O, Casals JB, Quindós G. Is amphotericin B active against dermatophytes and *Scopulariopsis brevicaulis*? *Rev Esp Quimioter.* 2004; 17(3):244-9.
99. Santos DA, Hamdan JS. *In vitro* antifungal oral drug and drug-combination activity against onychomycosis causative dermatophytes. *Med Mycol.* 2006; 44(4):357-62.
100. Da Silva Barros ME, de Assis Santos D, Hamdan JS. Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophyte* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J Med Microbiol.* 2007; 56(4):514-8.
101. Nweze EI, Ogbonna CC, Okafor JI. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated from pediatric cases in Nigeria against five antifungals. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2007; 49(5):293-5.

102. Araújo CR, Miranda KC, Fernandes Ode F, Soares AJ, Silva M. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2009; 51(1):9-12.
103. Mota CR, Miranda KC, Lemos J de A, Costa CR, Hasimoto e Souza LK, Passos XS, Meneses e Silva H, Silva M do R. Comparison of *in vitro* activity of five antifungal agents against dermatophytes, using the agar dilution and broth microdilution methods. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(3):250-4.
104. Ozcan D, Seçkin D, Demirbilek M. *In vitro* antifungal susceptibility of dermatophyte strains causing tinea pedis and onychomycosis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a case-control study. *Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010; 24(12):1442-6.
105. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol.* 2010; 35(6):658-63.
106. Itoi S, Kano R, Hasegawa A, Kamata H. *In vitro* activities of antifungal agents against clinical isolates of dermatophytes from animals. *J Vet Med Sci.* 2012; 74(8):1067-9.
107. Martinez-Rossi NM, Persinoti GF, Peres NT, Rossi A. Role of Ph in the pathogenesis of dermatophytoses. *Mycoses* 2012; 55(5):381-7.
108. Cafarchia C, Figueredo LA, Coccioli C, Camarda A, Otranto D. Enzymatic activity of *Microsporum cani* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 2012; 55(1):45-9.
109. López-Martínez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, Méndez-Tovar LJ, Hernández-Hernández F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. *Rev Latinoam Microbiol.* 1994; 36(1):17-20.
110. Muhsin TM, Aubaid AH, al-Duboon AH. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses* 1997; 40(11-12):465-9.
111. Muhsin TM, Salih TH. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia* 2001; 150(2):49-52.

112. Da Silva BCM, Auler ME, Ruiz LSR, Gandra F, Dos Santos JI, Paula CR, Yoshioka MCN, Castro LGM, Nunes RS, Bouchara JP, 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* 2005; 51:21-26.
113. Cafarchia C, Figueredo LA, Coccioli C, Camarda A, Otranto D. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 2011; 55:45-49.

**Este artigo foi elaborado segundo as normas da
“Journal of Microbiology”**

Phenotypic and genotypic analysis of strains of dermatophytes

Cibele MassottiMagagnin^a, Cheila Denise OttonelliStopiglia^a, Mauricio Ramírez^b, Daiane Heidrich^a, Karine de Oliveira Alves^a, Suelen Vigolo^a, Lucia CollaresMeirelles^a, Tatiane Caroline Daboit^a, PatriciaValente^c, Maria Lúcia Scroferneker^{a,c*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

^cDepartamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

*Correspondence and reprints: Maria Lúcia Scroferneker, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 sala 210, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br)

Study undertaken at the Human Pathogenic Fungi Laboratory, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the ability of assimilation of different carbon sources and the pattern of secretion of enzymes DNase, esterase, phospholipase, proteinase and urease of isolates of the species *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes*), as well as confirmation by analyzing the ITS region of the rDNA gene of the species. The susceptibility profile *in vitro* of the species to 11 antifungal agents was also evaluated. The profile of secretion of hydrolytic enzymes tested in this study were similar to results obtained in previous studies, with others species. Of the antifungal agents tested, the best results in terms of sensitivity were found with terbinafine and itraconazole, while the antifungal activity of fluconazole was found to be weak. Amphotericin B, although less effective than terbinafine and itraconazole, also yielded satisfactory results. the variable assimilation pattern exhibited for several carbohydrates would be useless in the

differentiation of *T. interdigitale* from other dermatophyte species Based on our findings, the molecular identification of the causative agents of dermatophytosis was relevant for correct identification.

Key-words: dermatophyte; *Trichophytoninterdigitale*; enzymes; antifungal activity; ribosomal DNA; internal transcribed spacer (ITS) region sequences

Introduction

Dermatophytosis are superficial fungal infections of the hair, skin and nails, caused by *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton species*, which are a specialized group of fungi that affect the keratinous tissue of humans and animals (Mims et al1995). According to the World Health Organization, dermatophytosis is among the most prevalent infections in the world, affecting about 25% of the world population (Peres et al 2010). It is estimated that 10-15% of the general population may be affected by these microorganisms at some time in their lives (Mazón et al1997; Dos Santos et al1997). The risk factors associated with dermatophytoses include aging, immunosuppression, a family history of diabetes mellitus, peripheral vascular disease, skin-related disorders such as hyperhidrosis and psoriasis, the use of tight-fitting footwear and trauma to the nails (Kuvandik et al2007).

Due to colonial and morphological uniformity observed among strains of dermatophytes, laboratory tests are performed in order to confirm the species. However, accurate identification is time consuming and requires a significant level of knowledge and technological expertise (Sun et al2010). The application of urease activity assays and the *in vitro* hair perforation have very limited results for the purpose of distinguishing species of dermatophytes(Kanbe, 2008).

Techniques of mitochondrial DNA restriction analysis, arbitrarily primed PCR random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis, PCR fingerprinting and PCR-based identification of dermatophytes targeting 18S rDNA and ITS regions can all differentiate species of the three dermatophytes genera. Molecular techniques, including the sequencing of rRNA genes and their flanking ITS regions are increasingly used for identification because they have shown that many of these genotypic characteristics are strain specific for recognition of either species or genera (NobreeViegas, 1972).

A large number of enzymes secreted by dermatophytes such as proteases, elastases, collagenases, phosphatases and esterases are related to the infectious process (Peres et al 2010). Although studies based on the

pattern of enzyme secretion have been successful in distinguishing species of dermatophytes (Dos Santos et al 2001; Nobree Viegas, 1972) few studies have focused on the enzymatic characterization combined with genetic typing of clinical isolates of *dermatophytes* (Do Nascimento e Martinez-Rossi, 2001).

The objective of this study was to evaluate the ability of assimilation of different carbon sources and the pattern of secretion of urease, proteinase, phospholipase, lipase and deoxyribonuclease (DNase) of isolates of dermatophytes, as well as to obtain confirmation by analyzing the ITS region of the rDNA gene of the species. The susceptibility profile of the species to amphotericin B, ketoconazole, ciclopiroxolamine, fluconazole, griseofulvin, itraconazole, miconazole, piroctoneolamine, terbinafine, tioconazole and voriconazole was also evaluated.

Materials and methods

Strains

Twenty-six isolates of dermatophytes are patient's isolates (Table 1) and were obtained from the Laboratory of Pathogenic Fungi of the Department of Microbiology of the Institute of Basic Health Sciences at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, and stored on Sabouraud agar, immersed in mineral oil (Uniao Quimica, São Paulo, Brazil) at room temperature. All isolates are from Porto Alegre metropolitan's region. For all enzyme assays, the strains were removed from the oil and cultured for 14 days on Sabouraud agar, at 25°C.

Candida albicans ATCC 10231, *Malassezia furfur* IMTSP 225, *Nocardia brasiliensis* IMTSP 739 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were utilized as positive controls in the enzyme assays. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 were used as methodology controls for antifungal activity.

Candida species and *S. aureus* were previously cultured for 24h and *M. furfur* and *N. brasiliensis* for 14 days. *S. aureus* was cultured on nutrient agar. *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *M. furfur* and *N. brasiliensis* were cultured on Sabouraud agar.

Urease activity was determined according to the method proposed by Christensen (1946) and Seeliger (1956). The strains were grown for four days at 25°C and were considered positive when the medium became pinkish. *N. brasiliensis* IMTSP 739 was utilized as positive control.

Table 1
Strainsstudy

| Name | Strainnumber | Cross ref. number |
|-------------------------|--------------|-------------------|
| <i>T. interdigitale</i> | 69096 | 69096 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69112 | 69112 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69382 | 69382 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69392 | 69392 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69575 | 69575 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69588 | 69588 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69732 | 69732 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69784 | 69784 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69793 | 69793 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69794 | 69794 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69798 | 69798 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69809 | 69809 |
| <i>T. interdigitale</i> | 69829 | 69829 |
| <i>T. interdigitale</i> | 71121 | 71121 |
| <i>T. interdigitale</i> | 71213 | 71213 |
| <i>T. interdigitale</i> | 71276 | 71276 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73535 | 73535 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73550 | 73550 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73653 | 73653 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73673 | 73673 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73691 | 73691 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73706 | 73706 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73727 | 73727 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73814 | 73814 |
| <i>T. interdigitale</i> | 73826 | 73826 |
| <i>T. interdigitale</i> | 76221 | 76221 |

Enzymatic assays

Dermatophytesstrains previously cultured on Sabouraud dextrose medioimmersed in mineral oil, were transferred to potato dextrose agar slants at 25°C, for seven days. The colonies were covered with approximately 1mL of sterile 0.85% saline and a suspension was prepared by scraping across all colonies with the tip of a pipette. After wards it was allowed the resulting suspension to stand for five to 10 minutes, the conidia were counted with a hemacytometer and the concentration adjusted as needed. The final concentration in the wells was 1 to 3 x 10⁴ CFU/mL. The inoculum was transferred in triplicate onto other plates containing the specific medium (Carfachia et al 2011).

Phospholipase activity was determined according to the method described by Price et al (1977). *C. albicans* ATCC 10231 was used as positive control. The medium consisted of 1% peptone, 2% glucose, 5.73%

sodium chloride, 0.05% calcium chloride and 2% agar. The medium was sterilized and then cooled to approximately 50 °C before the addition of sterile egg yolk at a final concentration of 4%. The plates were incubated at 25 °C for up to 30 days. Precipitation around the colonies attested phospholipase production.

The esterase assay was carried out according to the method described by Muhsinet al (1997). *M. furfur* IMTSP 225 was used as positive control. The esterase medium consisted of 1% peptone, 5% sodium chloride, 0.01% calcium chloride and 2% agar. Tween 80 was sterilized separately and added to the medium at a final concentration of 1%. After inoculation, the plates were incubated at 25 °C for up to 14 days. Formation of a precipitate around the colonies demonstrated esterase production.

DNase activity was determined according to the method proposed by Lopez-Martinez et al (1994). *S. aureus* ATCC 25923 was utilized as positive control. For the DNase assay, the isolates were inoculated on plates containing DNase commercial medium, which were then incubated at 25 °C for up to 17 days. The assay was considered positive when a degradation halo was visualized around the colonies after the addition of 5N HCl.

The proteinase assay was carried out as described by Rùchel et al (1982) The proteinase medium consisted of yeast carbon base 1.17% (Difco), and bovine serum albumin fraction V (Sigma) 0.2%, plus 2.5 mL of Protovit (Roche) in distilled water. The isolates were inoculated on the plates and incubated at 25°C for 14 days. The plates were stained with black starch 1.0% in acetic acid solution 20% and excess stain washed away with a 5% acetic acid solution. *C. albicans* ATCC 10231 was used as positive control.

Carbon sources assimilation

Assimilation of carbon sources was carried out on Petri dishes as described by Philpot (1977). The basal medium consisted of 0.5% ammonium sulfate, 0.1% monobasic potassium phosphate, 0.05% magnesium sulfate and 1.5% agar in distilled water. Carbohydrates were prepared in sterile distilled water, filtered and added to the basal medium to give a final concentration of 1%. The carbon sources were: L-arabinose, D-cellobiose, dextrin, dulcitol, erythritol, D-fructose, D-galactose, D-glucose, inulin, lactose, maltose, mannitol, D-mannose, D-melibiose, D-raffinose, L-rhamnose, sorbitol, D-sucrose, D-trehalose and D-xylose. The colonies were covered with approximately 1mL of sterile 0.85% saline and a suspension was prepared by scraping across all colonies with the tip of a pipette. After wards it was allowed the resulting suspension to stand for five to 10 minutes, the conidia were counted with a hemacytometer and the concentration adjusted as needed. The final concentration in the wells was 1 to 3 x 10⁴CFU/mL. The plates were inoculated and were incubated for up to

four weeks at 25°C. The basal medium without add Carbohydrates was used as negative control and glucose was used as positive control.

Antifungal activity in vitro

The antifungal assay was performed according to the protocol M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute, by the microdilution technique (CLSI, 2008). For inoculum preparation, dermatophyte isolates were grown on potato dextrose agar at 28°C for seven days or until good conidial growth was present. The colonies were covered with approximately 1 mL of sterile 0.85% saline and a suspension was prepared by scraping across all colonies with the tip of a pipette. After wards the resulting suspension was allowed to stand for five to 10 minutes, the conidia were counted with a hemacytometer and the concentration adjusted as needed. The final concentration in the wells was 1 to 3×10^4 CFU/mL. Eleven commercially available antifungal agents were used: Amphotericin B (Bristol-Myers Squibb, New York, USA), ketoconazole (Bayer, Barcelona, Spain), ciclopiroxolamine (Aventis, Dermik Laboratories, Berwyn, PA, USA), griseofulvin (Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brazil), itraconazole (Jansen-Cilag, São Paulo, Brazil), miconazole (Jansen-Cilag, São Paulo, Brazil), piroctoneolamine (IFFECT, CHEMPHAR, China), terbinafine (Novartis Research Institute, Vienna, Austria), tioconazole (Pfizer Inc., New York, USA) and voriconazole (Pfizer Inc., New York, USA). The stock solution of antifungal agents was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Vetec, Brazil) and dilutions were later made in RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) buffered at pH 7.0 with 165 mM of 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS; Sigma) to obtain concentrations of 0.125 to 64 µg/mL for fluconazole and griseofulvin; 0.06 to 32 µg/mL for ciclopiroxolamine; 0.001 to 0.5 for itraconazole and terbinafine and 0.03 to 16 µg/mL for the other antifungal agents.

The assay was performed using sterile, 96-well plates with a U-shaped base into which 100 µL of each antifungal concentration to be tested were added. Next, 100 µL aliquots of the 1:50 dilution of the inoculum were added to each one of the wells. The plates were incubated at 35°C, without agitation, for four days. Minimum inhibitory concentration (MIC) was visually determined by comparing the test with the growth of the drug-free control. All the experiments were performed in triplicate.

After reading the MIC, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. A 100 µL aliquot from the wells in which no growth was observed was transferred to test tubes containing 2 mL of Sabouraud-dextrose broth (Difco). A positive control (growth control) and a negative control (sterility control) were included in the test. The tubes were incubated for seven days at 30°C and growth was visually observed. MFC

was defined as the minimum concentration in which no fungal growth occurred (Stopiglia et al 2011). These assays were performed in duplicate.

A two-dimensional, two-agent broth microdilution checkerboard technique was used to study the interaction between the two drugs (Cuenca-Estrella, 2004). The interaction between terbinafine and tioconazole (drugs with lower MICs obtained in another study realized in our laboratory (Magagnin et al 2011) was analyzed by the fractional inhibitory concentration index (FICI). Based on FICI, interactions were interpreted as synergistic ($FICI \leq 0.5$), indifferent ($0.5 < FICI \leq 4$) or antagonistic ($FICI > 4$) as applied in recent studies (Argenta et al 2008; Daboit et al 2012). The FICI values were calculated as follows: $FICI = (MIC A \text{ in combination} / MIC A \text{ alone}) + (MIC B \text{ in combination} / MIC B \text{ alone})$.

Molecular identification

For the molecular identification, the strains were grown aerobically in Sabouraud broth at 25°C, with shaking at 180 rpm, until growth attained mid-log phase. Total genomic DNA was extracted and purified from 100 mL cultures using the UltraCleans Soil DNA Isolation Kit (Mobio, USA). Sequencing of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was performed using the universal primers ITS1 and ITS4 (White *et al.*, 1990). The amplification conditions were: initial denaturation at 94°C for 5 min, 35 cycles of denaturation at 94°C for 15s min, annealing at 55°C for 45 s, extension at 72°C for 90s, and final extension at 72°C for 6 min. The PCR product was purified by the Power soil Kit (Mobio, USA), and sequenced in the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The sequence was assembled and compared with sequences reported in GenBank using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm.

Results

Enzymatic activity

All the 26 strains showed urease activity and secreted DNase, whereas none of them was capable of secreting phospholipase or protease. Nearly 81% (n=21) of the strains showed esterase activity.

Carbon sources

All isolates assimilated D-mannose, D-glucose, sorbitol, D-threhalose and inulin, whereas L-arabinose, D-cellobiose, dextrin, dulcitol, erythritol, D-fructose, D-galactose, lactose, maltose, mannitol, D-melibiose, D-raffinose, L-rhamnose, D-sucrose and D-xylose were assimilated by some of the isolates (Table 2).

Table 2
Physiologic testes

| Strains | ARA | CELL | DEXT | DUL | ERYT | FRUC | GALA | LAC | MAL | MANI | MELI | RAFF | RHAM | SUC | XIL |
|---------|-----|------|------|-----|------|------|------|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|
| 69096 | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 69112 | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | - |
| 69382 | - | + | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | + | + | - |
| 69392 | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | - | - |
| 69575 | - | + | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 69588 | - | + | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - |
| 69732 | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | - | - |
| 69784 | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 69793 | - | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| 69794 | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 69798 | - | - | + | - | + | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| 69809 | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - |
| 69829 | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 71121 | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 71213 | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | - | + | - | + | - |
| 71276 | - | - | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - |
| 73535 | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 73550 | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + |
| 73653 | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - |
| 73673 | - | + | - | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 73691 | - | + | + | - | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - | - |
| 73706 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + |
| 73727 | - | + | - | - | + | - | - | - | - | + | - | + | - | - | - |
| 73814 | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | + | - |
| 73826 | - | + | + | - | + | + | + | - | - | + | + | + | - | - | - |
| 76221 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - |

(+) Assimilation; (-) no assimilation; ara = arabinose; cell = cellobiose; dext = dextrin; dul=dulcitol; eryt = erythritol; fruc =fructose; gala = galactose; lac= lactose; mani = mannitol; meli= melibiose; raff = raffinose; rham =rhamnose; suc= sucrose; xyl= xylose. D-mannose, sorbitol, threhalose and inulin were assimilated by all isolates.

Antifungal activity in vitro

The resulting values of the *in vitro* susceptibility for the 26 isolates of *T. interdigitaleare* shown in Table 3. Of the azole antifungal agents, the best results in terms of MIC values were found with itraconazole, tioconazole, miconazole and cetoconazole. Of these, the results obtained with itraconazole were significantly better, since this drug had the lowest geometric mean MIC. On the other hand, the activity of fluconazole was weak against all the strains. Of the non-azole antifungal agents tested, terbinafine was found to be the most effective, followed by amphotericin B.

Evaluation of the drug combination between tioconazole and terbinafine revealed an antagonistic effect for all tested isolates, since all indexes FIC >4. The MIC values for terbinafine tested alone (Table 4) were lower than when tested in combination with tioconazole.

Table 3
In vitro activities of eleven antifungal agents against 26 strains of dermatophytes

| | FCZ | KTZ | ITZ | MCZ | TCZ | VCZ | AMB | CPX | OPX | GSF | TFN |
|--------------|-------|---------|-------------|--------|-----------|--------|---------|--------|-------|-------|--------------|
| MIC | | | | | | | | | | | |
| GM | 18.80 | 0.20 | 0.02 | 0.10 | 0.08 | 0.76 | 0.15 | 0.95 | 1.34 | 0.60 | 0.002 |
| Range | 4-32 | 0.1-0.5 | 0.003- 0.06 | 0.06-1 | 0.03-0.25 | 0.12-4 | 0.06-1 | 0.25-2 | 1-2 | 0.1-4 | 0.001- 0.007 |
| MFC | | | | | | | | | | | |
| GM | 64.0 | 5.8 | 0.5 | 3.2 | 3.8 | 8.4 | 1.02 | 3.6 | 10.2 | 9.7 | 0.04 |
| Range | >64 | 0.5->16 | 0.5>0.5 | 0.5-8 | 0.1->16 | 4->16 | 0.125-8 | 1->32 | 1->16 | 4->64 | 0.003-0.1 |

FCZ: fluconazole; KTZ: ketoconazole; ITZ: itraconazole; MCZ: miconazole; TCZ: tioconazole; VCZ: voriconazole; AMB: amphotericin B; CPX: ciclopiroxolamine; OPX: piroctoneolamine; GSF: griseofulvin; TFN: terbinafine; MIC: minimum inhibitory concentration; MFC: minimum fungicidal concentration; GM: geometric mean.

Molecular identification

Through this technique, the etiologic agent was confirmed as *Trichophyton interdigitale* since it had 100% sequence identity.

Discussion

Fungal infections are most frequent worldwide, affecting individuals in all age groups and impairing the quality of life of affected patients, while also increasing economic burden due to the cost of treatment (Lamb et al 2013). Given the increase in *Trichophyton* infections and their public health importance (Aquino et al 2007), there is a need to search into tools for species delineation. Although the capability of dermatophytes to hydrolyze urea was repeatedly studied and became one of the criteria for differentiation between *T. interdigitale* and *T. rubrum* strains (Rosenthal e Sokolsky, 1965; Philpot, 1967), the use of other biochemical and molecular tools has been applied in the differentiation of species and varieties (Kanbe, 2008; Kong et al 2008).

In this study, the strains of *T. interdigitale* were phenotypically characterized by means of the secretory capacity of DNase, urease, esterase, phospholipase and protease. The results achieved for the tests of DNase and esterase were similar to those reported by Mushin et al (2001) and Cafarchia et al (2011) since they the isolates of *T. interdigitale* were capable of producing these enzymes. The esterase test may have application to the study of virulence of these strains, since the presence of secretion of such enzyme has been reported in 76% of dermatophytes strains from chronic infections (Lopez-Martinez et al 1994). The use of esterase activity for

differentiating fungal genera closely related to dermatophyte infection was also reported in the literature (NobreeViegas, 1972).

Our study not detected the presence of secretion of the phospholipase and proteinase for isolates. Different results were obtained by Chopra et al (1981) in the study of secretion of phospholipase A, since the *T. interdigitale* strain was capable of producing this enzyme; and by Mushin et al (1997), since they the isolates of *T. interdigitale* showed high activity of protease. These differences may be due to the specificity of the test.

The results from sources of carbon and nitrogen assimilation indicate a large variability between the samples. Previous studies enabled to distinguish dermatophytes based on the pattern of assimilation of carbohydrates (Dos Santos et al 2001; Rezusta et al 1991). The results obtained in our study reported a wide variation exhibited by isolates of *T. interdigitale* for their assimilative capacity of several types of carbohydrates. One possible explanation is that the samples used among researchers belong to different varieties of *T. interdigitale*.

The data obtained from the antifungal test were similar to those reported in previous studies (NobreeViegas, 1972; Fernández-Torres et al 2001). Fluconazole remains the antifungal azole with the lowest capacity of inhibition of all the antifungal agents evaluated and this is in agreement with previous results (Magagnin et al 2011), while itraconazole showed the best results in the *in vitro* assay. Among the non-azole group, terbinafine showed significant inhibition. These results corroborate the findings that both itraconazole and terbinafine are the best oral antifungal treatment for *tinea pedis* in humans (Gupta e Cooper, 2008).

The techniques of sequencing and the analysis of sequence data of the ribosomal DNA (rDNA) Internal Transcribed Spacer (ITS) regions have demonstrated the importance of molecular methods in confirming the species (Kong et al 2008). Often the results provided by standard methods present unusual morphologic, biochemical, and phenotypic features, suggesting that they are not always the most appropriate methods. The use of molecular methodologies is of utmost importance in the clinic, because it improved the accuracy in identifying species and is very useful in epidemiological studies (Kanbe, 2008; Jackson et al 1999).

Conclusions

In general, the profile of secretion of hydrolytic enzymes and antifungal agents susceptibility tested in this study were similar to results obtained in previous studies, with others species. The pattern of sugar assimilation was not conclusive to characterize the species. Based on our findings, we can claim to be of extreme importance the molecular identification of the causative agents of dermatophytosis for correct identification.

Acknowledgments

The authors want to thank CAPES (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior*) and CNPq (*Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico*) for the financial support and scholarships.

References

1. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DI, Cavalheiro AS, Spanemberg A, Ferreira L (2008). *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Ch* 52: 767–769.
2. Aquino VR, Constante CC, Bakos, L (2007). Frequency of dermatophytosis in mycological examinations at a general hospital in Porto Alegre, Brazil. *An Bras Dermatol* 82:239-44.
3. Cafarchia C, Figueredo LA, Coccioli C, Camarda A, Otranto D (2011). Enzymatic activity of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. *Mycoses* 55: 45–49.
4. Christensen WB (1946). Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J Bacteriol* 52:461-466.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard M38-A2; 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
6. Cuenca-Estrella M (2004). Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? *Antimicrob Agents Ch* 54: 854–69.
7. Chopra A, Larroya S, Khuller GK (1981). Studies on the phospholipase A of dermatophytes. *Curr Microbiol* 6: 171-173
8. Dabot TC, Duquia RP, Magagnin CM (2012). A case of *Exophiala spinifera* infection in Southern Brazil: molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol* 1: 72–75.
9. Dos Santos JI, Negri CM, Wagner DC, Philipi R, Nappi BP, Coelho MP et al (1997). Some aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Rev I Med Trop* 39: 137-40.

10. Dos Santos JI, Vicente EJ, Paula CR, Gambale W (2001). Phenotypic Characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. *Eur J Epidemiol* 17: 729–735.
11. Do Nascimento AM, Nilce MMR (2001). 18S-rDNA sequencing, enzyme patterns and morphological characterization of *Trichopyton* isolates. *Braz J Microbiol* 32: 179-186
12. Fernández-Torres AJ, Carrillo E, Martín A, Del Palacio MK, Moore A, Valverde M, Serrano GJ (2001). In Vitro Activities of 10 Antifungal Drugs against 508 Dermatophyte Strains. *Antimicrob Agents Ch* 45:2524–2528.
13. Gupta AK., Cooper EA (2008). Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166: 353–367
14. Jackson CJ, Barton R C, Evans EGV (1999). Species Identification and Strain Differentiation of Dermatophyte Fungi by Analysis of Ribosomal-DNA Intergenic Spacer Regions. *J Clin Microbiol* 37: 931-936.
15. Kanbe T (2008). Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166: 307–317.
16. Kong F, Tong Z, Chen X, Sorrell T, Wang B, Wu Q, Ellis D, Chen S (2008). Rapid Identification and Differentiation of *Trichophyton* Species, Based on Sequence Polymorphisms of the Ribosomal Internal Transcribed Spacer Regions, by Rolling-Circle Amplification. *J Clin Microbiol* 46:1192–1199.
17. Kuvandik G, Cetin M, Genctoy G, Horoz M, Duru M, Akcali C, **Salim S, Kiykim AA, Kaya H (2007)**. The prevalence, epidemiology and risk factors for onychomycosis in hemodialysis patients. *BMC Infect Dis* 7:102.
18. Lamb FM, Stopiglia CDO, Vettoratto G, Goldani JC, Scroferneker ML (2013). Frequency of Onychomycoses in Chronic Renal Failure Patients Undergoing Hemodialysis in Porto Alegre, Brazil. *Acta Dermatovenerol Croat* 21(1):20-24.
19. Lopez-Martinez R, Manzano-Gayosso P, Mier T, Mendez-Tova LJ, Hernández- Hernández F (1994). Exoenzimas de dermatofitos aislados de tiñas agudas y crónicas. *Revlat-amer Microbiol* 36:17-20.
20. Magagnin CM, Stopiglia CDO, Vieira FJ, Heidrich D, Machado M, Vettoratto G, Lamb FM, Scroferneker ML (2011). Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. *An Bras Dermatol* 86: 694-701.
21. Mazón A, Salvo S, Vives R, Valcayo A, Sabalza MA (1997). Estudio etiológico y epidemiológico de las dermatofitosis en Navarra (España). *Rev Iberoam Micol* 14: 65-68.

22. Mims C, Playfair JHL, Roitt I, Wakelin D, Williams R(1995). *Microbiologia Médica*, EDN 1. São Paulo, Brasil, pp. 28.14.
23. Muhsin TM, Aubaid AH, Al-Duboon AH (1997). Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. *Mycoses* 40:465
24. Muhsin TM, Salih TH. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. *Mycopathologia* 2001; 150(2):49-52
25. Nobre GG, Viegas MP(1972). Lipolytic activity of dermatophytes. *Mycopathologia*. 46, 319-323.
26. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM(2010). Dermatophytes: host-Pathogen interaction and antifungal resistance. *An Bras Dermatol* 85: 657-667.
27. Philpot CM(1967). The differentiation of *Trichophytonmentagrophytes* from *Trichophytonrubrum* by a simple urease test. *Sabouraudia* 5:189.
28. Philpot CM(1977). The use of nutritional tests for differentiation of dermatophytes. *Sabouraudia* 15: 141–150.
29. Price MF, Cawson RA (1977). Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia* 15:179-185.
30. RezustaA, Rubio MC, Alejandre MC (1991). Differentiation between *Trichophytonmentagrophytes* and *T. rubrum* by Sorbitol Assimilation. *J ClinMicrobiol* 29: 219-220.
31. Rosenthal SA, Sokolsky H(1995). Enzymatic studies with pathogenic fungi. *Dermatol Internal*4:72.
32. Rüchel R, Tegeler R, Trost MA (1982). A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia* 20: 233–234.
33. Seeliger HPR(1956). Use of a urease test for the screening and identification of cryptococci. *J Bacteriol* 72:127-131.
34. Stopiglia CD, Vieira FJ, Mondadori AG (2011). *In vitro* antifungal activity of dihydroxyacetone against causative agents of dermatomycosis. *Mycopathologia* 171: 267- 271.
35. Sun PL, Hsieh HM, Ju YM, Jee SH (2010). Molecular characterization of dermatophytes of the *Trichophytonmentagrophytes* complex found in Taiwan with emphasis on their correlation with clinical observations. *Brit J Dermatol*163: 1312-1318.
36. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J(1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. New York, pp 315–322.

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A caracterização fenotípica de dermatófitos realizada por meio de ensaios enzimáticos e de assimilação de carboidratos permitiu a avaliação dos fatores de virulência e a caracterização nutricional dos isolados testados. Entretanto, tais métodos não são recomendados para identificação de espécies, visto que os resultados encontrados em nosso estudo não seguiram um padrão semelhante entre os 26 isolados de *Trichophyton interdigitale* testados, inferindo variabilidade intraespecífica.

Na avaliação da sensibilidade dos isolados aos antifúngicos comercialmente disponíveis para tratamento das dermatofitoses, os resultados observados apontam a terbinafina como o agente mais potente. Entre os azólicos, o itraconazol foi o antifúngico com maior atividade, enquanto o fluconazol foi o agente com menor atividade entre os isolados deste estudo. Tais resultados corroboram com o padrão de resultados de estudos anteriores e ratificam a relevância da análise *in vitro* do perfil de sensibilidade a antifúngicos, considerando as diferenças obtidas no perfil de sensibilidade a antifúngicos por diferentes isolados da mesma espécie.

Paralelamente à caracterização fenotípica, procedeu-se à identificação dos isolados por biologia molecular através da amplificação da região ITS, utilizando-se os *primers* ITS1 e ITS4. Posteriormente, realizou-se o sequenciamento através de sequenciadores automatizados. Todos os isolados do estudo foram identificados como pertencentes à espécie *Trichophyton interdigitale*. A identificação genotípica com o uso dos *primers* ITS1 e ITS4 permitiu identificar e diferenciar os isolados de dermatófitos testados.

Os resultados deste estudo permitem-nos afirmar que as metodologias utilizadas para caracterizar fenotipicamente os isolados de dermatófitos não são adequadas para identificar espécies, visto que fungos de uma mesma espécie podem apresentar variabilidade fenotípica intraespecífica. Além disso, tais resultados ratificam a importância da aplicação de métodos moleculares para uma identificação mais rápida e fidedigna desses fungos.