

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Crystiane Rodrigues de Araujo

**Testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para avaliação  
da suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva

**Dissertação de Mestrado**

**Goiânia – GO**

**2007**

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**

Crystiane Rodrigues de Araujo

**Testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para avaliação  
da suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva

**Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical, na área de concentração: Microbiologia.**

**Goiânia – GO**

**2007**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG**

A663t Araujo, Crystiane Rodrigues.  
Testes de microdiluição em caldo e diluição em ágar para avaliação da suscetibilidade in vitro de dermatófitos [manuscrito] / Crystiane Rodrigues de Araujo. - 2007.  
xv, 69 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria do Rosário Rodrigues Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2007.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Dermatófitos – Testes de suscetibilidade. 2. Dermatófitos – Concentração inibitória mínima. 3. Dermatofitose. I. Título.

CDU: 602.3:582.281.21

*“Muitas vezes o começo é o final.*

*Porque chegar ao final pode ser a única maneira de começar.*

*O final é o ponto onde começamos.”*

*T. S. Eliot*

*Dedico este trabalho aos meus pais Hamilton Araujo e Syrlei Araujo pelo amor, apoio e incentivo na busca do conhecimento e crescimento profissional. Ao Marcos Mota, companheiro em todos os momentos, por toda compreensão e paciência. Aos meus irmãos Luciano Araujo e Bruno Araujo, e ao meu querido sobrinho, Mateus Araujo, sempre presentes na minha vida e em meu coração!*

*A vocês todo meu amor e gratidão!*

## *Agradecimentos*

*A Deus, que tem conduzido a minha vida com muito amor e graça! Por meio Dele e para Ele são todas as coisas!*

*A minha orientadora prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria do Rosário Rodrigues Silva não só pela dedicação na realização deste trabalho e excelente orientação, mas por todo carinho, paciência, compreensão e, principalmente, amizade que levarei por toda vida! Agradeço a credibilidade depositada desde o primeiro momento, os ensinamentos e as oportunidades. Você sempre será muito especial para mim!*

*A prof<sup>a</sup> Orionalda de Fátima Lisboa Fernandes pelo sorriso com que sempre me acolheu. A alegria e a simplicidade como ser humano faz de você uma pessoa muito especial! Obrigada por ter acreditado em mim!*

*A prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Kioko Hasimoto e Souza pela amizade, que espero durar para sempre... Carinho, força, palavras de incentivo e ensinamentos que contribuíram muito para a realização deste trabalho! Obrigada por toda atenção que sempre dedica a mim!*

*A minha amiga Karla Carvalho Miranda, um instrumento de Deus na minha vida, a quem sempre terei gratidão. Sua amizade, carinho, força e companheirismo foram indispensáveis na realização deste sonho!*

*A Hildene Meneses e Silva pela alegria de viver que contagia a todos. Conviver com você é para mim um privilégio! Você é uma pessoa iluminada por Deus!*

*A Janine de Aquino Lemos, amizade, carinho e disponibilidade em todos os momentos. Obrigada pelo companheirismo desde que cheguei ao laboratório!*

*A Carolina Rodrigues Costa, exemplo de fé, pela amizade e carinho que encontrei durante todo o curso, sentimentos que certamente ficarão para sempre!*

*A Xisto Sena Passos, com quem aprendi muito sobre organização, dedicação e perseverança. Obrigada pela amizade e por estar sempre disposto a colaborar!*

*Aos colegas do laboratório de Micologia, Ana Cristina Machado, Fábio Silvestre e Marina Moreira pelo convívio e amizade.*

*A Maria do Socorro e Cícero Júnior sempre prontos a nos ajudar.*

*A coordenação e professores do curso de pós-graduação em Medicina Tropical pela oportunidade de realização profissional.*

*A todos que, de alguma forma, tenham colaborado para a realização desse trabalho. Muito obrigada!*

## Resumo

Os dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos capazes de colonizar e invadir o extrato córneo da pele, pêlo e unhas produzindo as dermatofitoses. Há vários agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatofitoses, entretanto as espécies de dermatófitos possuem perfis de suscetibilidade diferentes, podendo ocorrer resistência relativa ou absoluta. O documento M38-A desenvolvido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de diferentes agentes antifúngicos para fungos filamentosos, não inclui os dermatófitos. O método de microdiluição em caldo tem sido avaliado por vários pesquisadores, e alguns parâmetros como tamanho do inóculo, temperatura e tempo de incubação e determinação das leituras de CIM são investigados. Neste trabalho, foi avaliada a atividade *in vitro* de fluconazol, itraconazol, cetoconazol, griseofulvina e terbinafina para 60 isolados de dermatófitos, pertencentes a três espécies, através da técnica de microdiluição em caldo, com modificações na temperatura e tempo de incubação. Adicionalmente, os valores de CIM obtidos pelo método de microdiluição em caldo foram comparados com aqueles obtidos pela técnica de diluição em ágar. Os resultados encontrados através do método de microdiluição em caldo mostraram que todos os isolados produziram crescimento claramente detectável a temperatura de 28°C e os valores de CIMs foram determinados após 4 dias de incubação para os isolados de *Trichophyton mentagrophytes* e 5 dias para os isolados de *T. rubrum* e *Microsporum canis*. Itraconazol, cetoconazol e terbinafina mostraram os menores valores de CIM (0,03 µg/ml) para 33,3%, 31,6% e 15% dos isolados, respectivamente. Uma boa concordância foi observada entre os métodos de diluição em ágar e microdiluição em caldo. A concordância entre os dois métodos foi de 91,6% para cetoconazol e griseofulvina, 83,3% para itraconazol, 81,6% para terbinafina e 73,3% para fluconazol para todos os isolados analisados. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que uma incubação de 5 dias e temperatura de 28°C, utilizados no método de microdiluição em caldo e diluição em ágar, podem contribuir para definir e melhor interpretar os valores de CIM. Além disso, até que um método de referência de teste de suscetibilidade para dermatófitos seja padronizado, os resultados similares entre os métodos de microdiluição em caldo e diluição em ágar tornam este último útil para testar a suscetibilidade *in vitro* destes fungos.

## Abstract

Dermatophytes are keratinophilic fungi that colonize and invade the stratum corneum of the skin, hair and nails causing the dermatophytosis. An increasing number of antifungal agents has become available for the treatment of dermatophytosis, however not all species have the same susceptibility pattern and may occur relative or absolute resistance of some dermatophytes. The document M38-A developed by *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) for determining the minimal inhibitory concentration (MIC) of different antifungal agents against filamentous fungi, has not included the dermatophytes. The broth microdilution method has been evaluated by various researchers, and some parameters as inoculum size, temperature and duration of incubation and endpoint determination has been investigated. In this study, the *in vitro* activity of fluconazole, itraconazole, ketoconazole, griseofulvin and terbinafine against 60 dermatophyte isolates, belong to three species, using the broth microdilution technique, with modifications at temperature and incubation time was used. Additionally, the MIC values obtained by broth microdilution method were compared with those obtained by the agar dilution technique. The results obtained by broth microdilution method showed that all isolates produced clearly detectable growth at 28°C and the MIC values could be determined after 4 days of incubation for the isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and 5 days for *T. rubrum* and *Microsporum canis* isolates. Itraconazole, ketoconazole and terbinafine had the lowest MIC values (0.03 µg/ml) for 33.3%, 31.6% and 15% of the isolates, respectively. A good concordance was observed between the agar dilution and broth microdilution methods. The levels of agreement were 91.6% with ketoconazole and griseofulvin, 83.3% with itraconazole, 81.6% with terbinafine and 73.3% with fluconazole for all the tested isolates. In summary, the results of this study suggest that an incubation time of 5 days and temperature at 28°C used in broth microdilution and agar dilution methods can contribute to define and to better interpret the MIC values. Beside, until a reference method for testing the susceptibilities of dermatophytes is standardized, the similar results with broth microdilution method become the agar dilution useful for testing the susceptibility of these fungi.

## **Lista de Abreviaturas**

**ATCC** - *American Type Culture Collection*

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**CLSI** - *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**KOH** - Hidróxido de potássio

**MIC** - *Minimal Inhibitory Concentration*

**MOPS** - Ácido morfolino-propanossulfônico

**PDA** - *Potato Dextrose Agar*

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Aspectos Gerais</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Dermatofitoses</b>	<b>1</b>
1.2.1 Etiologia	1
1.2.1.1 Gêneros de dermatófitos	1
1.2.1.1.1 <i>Trichophyton</i>	2
1.2.1.1.2 <i>Microsporum</i>	4
1.2.1.1.3. <i>Epidermophyton</i>	5
1.2.1.2 Habitat dos dermatófitos	5
1.2.2 Manifestações Clínicas	7
1.2.3 Epidemiologia	9
1.2.4. Tratamento	11
<b>1.3. Suscetibilidade <i>in vitro</i> para dermatófitos</b>	<b>14</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Isolados de dermatófitos</b>	<b>17</b>
3.1.1 Identificação	17
<b>3.2 Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i></b>	<b>19</b>
3.2.1 Microdiluição em caldo	19
3.2.1.1 Agentes Antifúngicos	19

3.2.1.2 Inóculo	19
3.2.1.3 Procedimento do teste	20
3.2.1.4 Incubação e leitura do teste	20
3.2.2 Diluição em ágar	21
3.2.2.1 Agentes Antifúngicos	21
3.2.2.2 Inóculo	22
3.2.2.3 Procedimento do teste	22
3.2.2.4 Incubação e leitura do teste	22
<b>3.3 Amostra controle dos testes de suscetibilidade</b>	<b>23</b>
<b>3.4 Análise dos dados</b>	<b>23</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>25</b>
<b>6. ARTIGO 1: <i>IN VITRO</i> SUSCEPTIBILITY TESTING OF DERMATOPHYTES ISOLATES IN GOIANIA, BRAZIL, AGAINST FIVE ANTOFUNGALAGENTES BY BROTH MICRODILUTION METHOD.</b>	<b>36</b>
<b>7. ARTIGO 2: EVALUATION OF AGAR DILUTION AND BROTH MICRODILUTION METHODS FOR ANTIFUNGAL SUSCEPTIBILITY TESTING OF DERMATOPHYTES.</b>	<b><u>49</u></b>
<b>8. CONCLUSÕES</b>	<b><u>62</u></b>
<b>9. ANEXOS</b>	<b><u>63</u></b>

## **1. Introdução**

### **1.1 Aspectos Gerais**

Os dermatófitos, fungos filamentosos queratinofílicos, constituídos pelos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, são capazes de invadir o extrato córneo da pele e de outros tecidos queratinizados de animais, produzindo infecções superficiais cutâneas, denominadas dermatofitoses (Fernandes et al. 2001; Liu et al. 2002; Koc et al. 2005). Embora estas infecções normalmente se restrinjam às estruturas córneas superficiais, ocasionalmente podem envolver a derme e o tecido subcutâneo (Duek et al. 2004). Um grande número de agentes antifúngicos pode ser utilizado no tratamento das dermatofitoses, porém a resposta de cada dermatófito pode ser diferente, verificando-se constantemente recidivas (Benger et al. 2004; Karaca & Koc 2004). Os testes de suscetibilidade *in vitro* são, portanto, de grande importância pois permitem auxiliar na escolha de fármacos mais ativos.

### **1.2. Dermatofitoses**

#### **1.2.1 Etiologia**

##### **1.2.1.1 Gêneros de dermatófitos**

Os três gêneros anamórficos *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* pertencem à família Moniliaceae, classe Hyphomycetes, subfilo *Deuteromycota* (Weitzman & Summerbell 1995). Esta classificação é baseada na formação e morfologia dos conídios (Larone 1996). As duas espécies de *Epidermophyton* se caracterizam pela presença de macroconídios em forma de clava, arredondados na extremidade distal e frequentemente agrupados, e ausência total de microconídios

(Simpanya 2000). As várias espécies de *Microsporium* se caracterizam por apresentar grande quantidade de macroconídios (células fusiformes divididas por septos transversais) e ausência ou pequenas quantidades de microconídios (Komaid & Kestelman 2002), enquanto as diferentes espécies de *Trichophyton* se caracterizam normalmente pela presença de grande quantidade de microconídios, associados a poucos ou ausentes macroconídios (Larone 1996).

Algumas espécies de *Microsporium* e *Trichophyton* apresentam a capacidade de se reproduzir sexuadamente, com produção de ascos contendo ascósporos. Estas espécies eram classificadas até 1986 como pertencentes aos gêneros *Nannizzia* e *Arthroderma*, respectivamente (Ajello 1977). Entretanto, com base em uma avaliação cuidadosa das características morfológicas utilizadas para definir estes dois gêneros, Weitzman et al. (1986) concluíram que estes gêneros apresentavam diferenças mínimas, agrupando-os em um único gênero, *Arthroderma*, por ser a denominação mais antiga. Desta forma o gênero *Arthroderma*, é classificado como pertencente à família Arthrodermataceae, subfilo *Ascomycota* (Weitzman & Summerbell 1995; Graser et al. 1998).

#### **1.2.1.1.1 *Trichophyton***

O gênero *Trichophyton* é composto por diversas espécies que se caracterizam pela presença de grande quantidade de microconídios piriformes, redondos ou ovalados, dispostos em tirso e macroconídios multi-septados de parede delgada (Larone 1996). Algumas espécies mostram-se com características diferentes, verificando-se que as espécies comuns encontradas no solo são capazes de produzir maior quantidade de macroconídios do que aquelas que têm o homem como seu habitat natural (Know-Chung & Bennett 1992). As colônias de

*Trichophyton* variam dependendo da espécie, podendo ser algodonosas, aveludadas ou pulverulentas, de cores variadas e com reverso algumas vezes pigmentado. Entre as espécies de *Trichophyton* isoladas de humanos e animais destacam-se: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*.

Os isolados típicos de *T. rubrum* produzem colônias algodonosas brancas, tornando-se posteriormente aveludadas e com reverso de pigmentação avermelhada. À microscopia observam-se microconídios delicados, regulares e em forma de lágrima dispostos ao longo das hifas ou agrupados, com poucos ou ausentes macroconídios que se apresentam longos e estreitos (Graser et al. 2000).

*T. mentagrophytes* apresenta duas variedades principais, classificadas de acordo com a morfologia, ecologia e genética desses microrganismos. *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, forma zoofílica, se diferencia de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, antropofílica, pela morfologia da colônia, sendo que a primeira apresenta-se macroscopicamente com textura pulverulenta enquanto a última, mostra-se com textura aveludada ou algodonosa. À microscopia óptica, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* mostra-se com microconídios abundantes, de forma globosa e agrupadas em cachos e macroconídios em forma de clava (mais abundantes nesta variedade do que na var. *interdigitale*), enquanto *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* mostra-se com menor quantidade de microconídios que se apresentam em forma de lágrima. Com muita frequência observam-se estruturas de ornamentação, como hifas em espiral em ambas variáveis.

A forma teleomórfica de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* é descrita como *Arthroderma benhamiae* (Howell et al. 1999). Os ascos são globosos contendo geralmente oito ascósporos.

*T. tonsurans*, fungo que atinge basicamente o homem, pode apresentar-se com colônias de textura algodonosa, que se tornam pulverulenta com o envelhecimento e de cores que variam do branco e bege até castanho-avermelhado. Na microscopia destas colônias observam-se numerosos microconídios em forma de clava ou de lágrima, de tamanhos variáveis e, eventualmente macroconídios de formatos irregulares.

#### **1.2.1.1.2 *Microsporum***

Este gênero caracteriza-se pela presença de macroconídios de forma navicular, com septos transversais, usualmente de parede espessa e espiculada e microconídios, quando presentes, são claviformes. Da mesma forma que ocorre no gênero *Trichophyton*, algumas espécies de *Microsporum* como *M. canis*, *M. gypseum* e *M. audouinii* são mais freqüentemente encontradas produzindo lesões em animais.

*M. canis*, fungo que normalmente faz seu ciclo reprodutivo no animal, principalmente o gato, apresenta colônia que se desenvolve rapidamente, formando micélio algodinoso ou aveludado, de cor branca-amarelada e com reverso amarelado. Microscopicamente mostra numerosos macroconídios com 6 a 15 septos, fusiformes e espiculados, de parede espessa e microconídios, quando presentes, são sésseis, podendo ser encontrados ao longo das hifas.

A fase teleomórfica de *M. canis*, obtida normalmente através de uma reprodução heterotática, forma ascos subglobosos contendo oito ascósporos, sendo que o fungo é denominado *A. otae* (Know-Chung & Bennett 1992).

As colônias de *M. gypseum* diferem das de *M. canis*, principalmente com relação a sua textura, mostrando-se bem pulverulenta e a sua coloração varia de

bege a marrom. Os macroconídios desta espécie apresentam quatro a seis septos e os microconídios produzidos são escassos em culturas primárias. A produção de ascos com oito ascósporos subglobosos a ovais, descrita como *A. incurvatum*, representa a fase teleomórfica desta espécie (Know-Chung & Bennett 1992).

A morfologia das colônias de *M.audouinii* mostra-se de superfície aveludada de cor branca a parda com um denso emaranhado de hifas. Embora esta espécie raramente produza conídios, a formação de clamidoconídios mamilonados facilita a sua identificação.

#### **1.2.1.1.3. *Epidermophyton***

São conhecidas duas espécies de *Epidermophyton*, denominadas *E. stockdaleae* e *E. floccosum* (Kano et al. 1999), sendo que apenas a última é capaz de produzir infecção no homem (Macêdo et al. 2005). *E. floccosum* cresce lentamente, produzindo a princípio colônias brancas que se tornam amarelo-esverdeadas. A formação de abundantes macroconídios de base larga e com extremidade arredondada é frequentemente observada nesta espécie. Uma característica importante é a formação de clamidoconídios, que normalmente impede a sua perfeita identificação. Em colônias mais velhas, estes clamidoconídios são predominantes.

#### **1.2.1.2 Habitat dos dermatófitos**

De acordo com o habitat, os dermatófitos podem ser classificados de acordo com suas associações primárias em antropofílico, zoofílico ou geofílico (Mahmoudabadi 2005). Os dermatófitos antropofílicos adaptados à queratina dos seres humanos, raramente infectam outros animais; os zoofílicos que usualmente

infectam animais, podem ocasionalmente produzir lesões em humanos, enquanto os geofílicos estão associados com restos de materiais que contém queratina de animais como pêlos, cascos, chifres encontrados no solo em fase de decomposição (Weitzman & Summerbell 1995). O último grupo de dermatófitos é capaz de parasitar tecidos queratinizados de animais que vivem em contato com o solo. Esta classificação indica sua relativa evolução, adaptação em hospedeiros específicos e habilidade de infectar e causar doença (Kushwaha & Guarro 2002).

Com relação à evolução no habitat natural dos dermatófitos, acredita-se que antes de tornar-se uma espécie antropofílica, este microrganismo teria sido um fungo zoofílico que passou a realizar o seu ciclo evolutivo apenas no homem. Outro aspecto interessante é a diferença de lesões clínicas produzidas no homem, onde se observa que o processo inflamatório causado por um dermatofito zoofílico é mais intenso do que o produzido por um fungo antropofílico.

A reprodução assexuada, através da produção de conídios, é abundante nos dermatófitos geofílicos, enquanto a fase teleomórfica, produção de ascos com ascósporos, pode ser observada apenas em algumas espécies. No processo de evolução dos fungos que vivem no solo para fungos que parasitam homem e animais ocorreram mudanças no ciclo de reprodução, observando-se uma diminuição na formação de estruturas de reprodução assexuada e perda do ciclo sexuado (Kushwaha & Guarro 2002). Torna-se evidente a diminuição na produção de conídios entre as espécies antropofílicas, como ocorre entre as variantes de *T. mentagrophytes*, onde a produção de microconídios da variedade zoofílica é maior do que a da variedade antropofílica.

As lesões produzidas pelos dermatófitos apresentam formas variadas e diferentes manifestações clínicas, dependendo da espécie envolvida na etiologia do processo.

### 1.2.2 Manifestações Clínicas

A infecção por dermatófitos ocorre pela produção de enzimas proteolíticas secretoras que promovem uma resposta inflamatória no hospedeiro e resulta em uma série de sintomas clínicos, característicos das dermatofitoses (Liu et al. 2001).

O quadro clínico da doença varia conforme o sítio anatômico acometido (Aquino & Lima 2002), podendo ocorrer em vários locais, por uma única espécie de dermatófito. Há casos relatados onde diferentes espécies podem produzir lesões clinicamente idênticas.

As dermatofitoses recebem a denominação genérica de *tinea*, que é acrescido da região do corpo, designando a doença clínica (Santos et al. 2002). *Tinea capitis* é caracterizada pela invasão do couro cabeludo, usualmente causada por espécies dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (Aquino & Lima 2002; Komaid & Kestelman 2002). As lesões produzidas por estes dois gêneros podem variar desde a formação de eritemas, com poucas áreas descamativas, à formação de reações inflamatórias e, ainda, produção de lesões extensas de descamação e alopecia, acompanhadas por febre e linfadenopatia (Ghannoum et al. 2002). Nas lesões descamativas, onde o folículo piloso é tonsurado, os gêneros de dermatófitos mostram quadros clínicos diferentes. Nas *tineas* produzidas por *Microsporum*, as lesões são únicas, enquanto naquelas causadas por *Trichophyton*, observa-se a formação de múltiplas áreas de alopecia (Aquino & Lima 2002). *M. canis*, *M. audouinii* e *T. tonsurans* são comumente responsáveis por este tipo de lesão. Nas lesões denominadas *Kerion Celsi*, há um processo inflamatório intenso, com

pústulas, secreção purulenta e formação de cicatrizes (Aquino & Lima 2002). Esta foliculite supurativa tem como agentes fungos zoofílicos, como *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum* e, ainda fungos geofílicos, como *M. gypseum* e *M. fulvum*. Uma forma clínica grave, denominada *tinea favosa*, pode ocorrer quando algumas espécies de dermatófitos, como *T. schoenleinii* e *M. gypseum*, invadem o couro cabeludo, levando à formação de uma crosta em forma de favo de mel, decorrente de uma massa densa de micélio e restos de tecido epitelial, com atrofia da pele e alopecia cicatricial (Aquino & Lima 2002).

A *tinea corporis* é infecção fúngica que tem localização em pele glabra, preferencialmente nos braços, face e tronco (Goldstein et al. 2000). Causa lesões eritematodescamativas, circinadas, isoladas ou confluentes, de crescimento centrífugo, onde observa-se vesículas ou pústulas em sua borda (Weinstein & Berman 2002). *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* têm sido descritos como os principais agentes de *tinea corporis* (Santos et al. 2002).

Características semelhantes ao quadro de *tinea corporis* são encontradas quando os dermatófitos atingem a região crural (coxas, períneo, nádegas e região pubiana), sendo nestes casos denominadas de *tinea cruris*. Estes locais são propícios à infecção por fungos, devido a constante maceração da pele, pela transpiração ou por banhos prolongados, favorecendo a implantação destes microrganismos (Hainer 2003). O agente mais comumente identificado nos casos de *tinea cruris* é o fungo antropofílico, *E. floccosum* (Santos et al. 2002).

*Tinea pedis* ou pé-de-atleta é a forma clínica mais frequentemente observada em todo mundo (Goldstein et al. 2000; Korting et al. 2001; Ogasawara et al. 2003). A sudorese, umidade, calçados não higienizados adequadamente e o descuido na higiene da pele, constituem fatores que auxiliam a implantação e o crescimento dos

fungos (Goldstein et al. 2000). A forma inflamatória, geralmente causada por *T. mentagrophytes*, é caracterizada por numerosas vesículas plantares e interdigitais (Zaias & Rebell 2003). Nos espaços interdigitais formam-se fissuras e a pele macerada predispõe às infecções secundárias, acentuando o caráter inflamatório das lesões. Na forma crônica, produzida por *T. rubrum*, as lesões aparecem na planta e nas bordas dos pés, sob a forma eritematodescamativa (Hainer 2003).

A invasão das unhas por dermatófitos, denominada *tinea unguium*, se caracteriza por ser uma infecção normalmente crônica. A sua manifestação clínica pode ser superficial, formando manchas na placa das unhas, ou invasiva, onde há o acometimento das margens lateral e distal, caracterizando-se por uma unha opaca, esbranquiçada e espessa, com acúmulo de queratina subungueal. Em alguns casos pode-se observar evolução das lesões, levando a queda da placa ungueal. As unhas das mãos são comumente parasitadas por *T. rubrum*, enquanto nas unhas dos pés, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* são frequentemente observados (Huang et al. 2004). Espécies de *Microsporum* raramente são capazes de causar infecções nas unhas.

### **1.2.3 Epidemiologia**

Os dermatófitos encontram-se amplamente distribuídos no mundo (Chinelli et al. 2003), no entanto, a frequência da dermatofitose é influenciada pela faixa etária, fatores genéticos, condições bioclimáticas, movimento ou migração humana, contato com animais domésticos além de acúmulo de indivíduos em áreas fechadas (Foster et al. 2004; Dolenc-Voljec 2005; Woldeamanuel et al. 2005).

No Brasil, país de clima subtropical e úmido tem sido verificado uma alta prevalência dessa infecção (Chinelli et al. 2003), sendo que a etiologia e a

manifestação clínica das dermatofitoses podem variar nas diferentes regiões geográficas. Na cidade de Manaus, região Norte do país, Oliveira et al. (2006) observaram maior incidência de *tinea unguium* (37,2%), quando comparada às outras infecções superficiais, detectadas na mesma região. Entre os dermatófitos, *T. rubrum* foi isolado com maior frequência como responsável pelos casos de lesões nas unhas. Alguns fatores ecológicos, como temperatura e umidade local, bem como as condições sócio-econômicas da população justificam uma maior prevalência de micoses superficiais nesta região (Oliveira et al. 2006).

Em Fortaleza, Ceará, região Nordeste, trabalho envolvendo 534 casos de dermatofitoses, constatou-se que as regiões do couro cabeludo e inguinal foram as mais frequentemente acometidas, com 33% e 32,6%, respectivamente. Nesta casuística *T. rubrum*, *T. tonsurans* e *M. canis* foram as espécies mais comuns. É importante salientar que *T. tonsurans* mostrou-se como importante patógeno de *tinea capitis* nesta região geográfica, sendo responsável por 73,9% das infecções do couro cabeludo (Brilhante et al. 2000). Em João Pessoa na Paraíba, cidade de localização da região Nordeste, em 82 casos de lesões por dermatófitos no couro cabeludo, observou-se uma predominância de *T. rubrum* (37,7%) e *T. tonsurans* foi o segundo agente mais comum, representando 28,3% dos casos (Aquino et al. 2003).

Na região Centro-Oeste, estudos realizados em Goiânia mostraram que os membros inferiores (pés e pernas) foram os locais mais atingidos por dermatófitos acometendo preferencialmente adultos jovens. *T. rubrum* seguido de *T. mentagrophytes* e de *M. canis* foram os agentes predominantes das dermatofitoses (Costa et al. 1999; Costa et al. 2002).

As diferentes regiões do corpo atingidas por dermatófitos podem variar nos dois gêneros (masculino e feminino). Alguns trabalhos têm mostrado predominância de um dos gêneros, em decorrência da localização da lesão. A *tinea unguium* é prevalente no gênero feminino (Araújo et al. 2003; Oliveira et al. 2006), enquanto que *tinea capitis* é mais comum no gênero masculino (Dias et al. 2003; Koussidou-Eremondi et al. 2005; Jahromi & Khaskar 2006). A prevalência de *tinea unguium* em mulheres pode ser explicada devido à imersão freqüente das mãos em água, associada com trabalho de dona de casa ou exposição a produtos químicos e traumas (Ellabib et al. 2002; Alvarez et al. 2004). *Tinea capitis* de ocorrência quase exclusiva em crianças, (Woldeamanuel et al. 2005), apresenta cura espontânea em adultos devido à presença de ácidos graxos que são formados na época da puberdade. Este fato explica o seu predomínio no sexo masculino, pois o homem atinge a puberdade posteriormente à mulher (Sberna et al.1993).

A ocorrência da dermatofitose pode variar de acordo com a faixa etária. A presença elevada de lesões nos pés e pernas encontradas na fase adulta, pode ser explicada pela mudança de hábitos, como o uso de sapatos fechados (Costa et al. 2002). As lesões do couro cabeludo ocorrem, entretanto, predominantemente em crianças em idade escolar (Bergson & Fernandes 2001; Dias et al. 2003; Siqueira et al. 2005). As crianças mantêm maior contato com animais (provável fonte de infecção) do que o adulto (Dias et al. 2003).

#### **1.2.4. Tratamento**

Os derivados azólicos, as alilaminas e a griseofulvina são os principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento das dermatofitoses.

Os derivados azólicos atuam inibindo a síntese de ergosterol, principal constituinte da membrana, através da inibição do citocromo P-450 dependente da enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, acarretando em um aumento da permeabilidade da membrana e inibição do crescimento celular (Jain & Sehgal 2001; Lebwohl et al. 2001; Maertens 2004). Estes agentes podem ser utilizados por vias tópica e oral, apresentando amplo espectro de ação. Clotrimazol, econazol, miconazol, oxiconazol e sulconazol, azóis de uso tópico, podem ser aplicados diariamente permanecendo por períodos prolongados na superfície da pele (Weinstein & Berman 2002). A eficácia de cada um pode variar conforme o tipo de lesão. A infecção dos pés, um dos mais comuns locais de lesão, é frequentemente tratada com clotrimazol, mostrando-se efetivo. Este antifúngico tem, entretanto, limitada eficácia na terapia de onicomicose.

Entre os derivados azólicos que podem ser administrados por via oral, destacam-se o cetoconazol, itraconazol e fluconazol. O cetoconazol é considerado de elevada eficácia no tratamento de infecções superficiais e, até mesmo, em infecções mais profundas causadas por fungos do gênero *Trichophyton* (Shin & Lin 2004). Itraconazol é ativo nos casos de infecções por *Microsporum*, enquanto o fluconazol, embora disponível no tratamento das *tineas* (Nozickova et al. 1998; Gupta et al. 2000), parece ter mais atividade nas infecções causadas por leveduras. Todos estes azóis são absorvidos pelo trato gastrointestinal, acumulando-se nos tecidos infectados e normalmente com poucos efeitos colaterais.

A terbinafina, fármaco pertencente à classe das alilaminas, atua inibindo a enzima epoxidase, importante na biossíntese do ergosterol da membrana citoplasmática fúngica (Lebwohl et al. 2001; Nakano et al. 2006). Possui uma elevada eficácia, sendo que mesmo na terapia de *tinea unguium*, micose superficial

de difícil tratamento e constantes recidivas (Torres-Rodriguez et al. 1998; Jackson et al. 1999), a administração contínua, por via oral, por um determinado período, proporciona a cura da lesão (Gupta & Del Rosso 2000). Terapia com terbinafina tem sido utilizada para o controle de *tinea capitis*, em crianças e adultos. As lesões do couro cabeludo causadas por fungos do gênero *Trichophyton*, mostram-se normalmente mais suscetíveis à terbinafina do que aquelas que têm *Microsporum* como agente causal (Hofbauer et al. 2002). Este agente antifúngico, acumulado em altas concentrações nas glândulas sebáceas, sua principal via de excreção, promove bom resultado, com poucos efeitos colaterais (Aste & Pau 2004).

Griseofulvina, derivado benzofurano, outro agente muito utilizado no tratamento das dermatofitoses, atua no núcleo da célula fúngica, interagindo com microtúbulos e desfazendo o fuso mitótico, responsável pela multiplicação celular. Este antifúngico apresenta atividade para diferentes espécies em praticamente todas as manifestações clínicas de dermatofitoses. Assim, pode ser indicado para tratamento de *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis*, *tinea capitis* e *tinea unguim*, causadas por *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* (Gupta & Del Rosso 2000). Embora muito ativo, este fármaco apresenta como efeitos colaterais distúrbios gastrointestinais (náuseas, vômitos, dor epigástrica e diarreia), além de alterações neurológicas (vertigens, confusão, perda de concentração e memória, visão turva e insônia) (Huang et al. 2004).

A dificuldade de cura, necessidade de um tempo prolongado de tratamento, as constantes recidivas, associadas ao alto custo dos medicamentos tornam necessário estabelecer o fármaco adequado para o tratamento e cura da infecção, o

que poderia ser demonstrado através dos testes de suscetibilidade *in vitro* (Colella et al. 2006).

### 1.3. Suscetibilidade *in vitro* para dermatófitos

Vários métodos *in vitro*, como macrodiluição e microdiluição em caldo, diluição em ágar, difusão em ágar e testes comerciais, podem ser utilizados para avaliar a suscetibilidade de dermatófitos a diferentes quimioterápicos (Fernández-Torres et al. 2001; Perea et al. 2001; Santos et al. 2001; Pujol et al. 2002; Fernández-Torres et al. 2003; Karaca & Koc 2004; Perrins et al. 2005).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), no ano de 2002, através do documento M38-A, propôs o uso do teste de suscetibilidade *in vitro*, através da diluição em caldo, para fungos filamentosos, como *Aspergillus* spp, *Fusarium* spp, *Pseudallescheria boydii*, *Sporothrix schenckii* e *Rhizopus* spp, não incluindo neste documento os testes para dermatófitos (Fernández-Torres et al. 2000; Gupta & Kohli 2003; Tomás et al. 2004). Macrodiluição em tubos e microdiluição em placas são as técnicas utilizadas neste protocolo, para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antifúngicos, capazes de inibir o crescimento dos fungos filamentosos.

Até o momento, não há um consenso entre os pesquisadores sobre os testes de suscetibilidade para dermatófitos. Alguns critérios como o tamanho do inóculo, tempo e temperatura de incubação e determinação de leituras de CIM, dificultam a padronização de uma técnica de suscetibilidade *in vitro* para fungos filamentosos de crescimento lento como os dermatófitos (Jessup et al. 2000; Fernández-Torres et al. 2002; Ozkutuk et al. 2006).

A importância dos dermatófitos no nosso meio, causando infecções que são muitas vezes graves, podendo alterar a estética do indivíduo, e ainda a falta de testes de suscetibilidade *in vitro* adequados para se verificar a sensibilidade dos diversos antifúngicos utilizados no tratamento das dermatofitoses justificam a realização deste trabalho.

## 2. Objetivos

### Objetivo Geral

1. Verificar a atividade *in vitro* de cinco agentes antifúngicos para dermatófitos e comparar métodos de suscetibilidade *in vitro*.

### Objetivos específicos

1. Verificar a atividade *in vitro* de cetoconazol, fluconazol, itraconazol, griseofulvina e terbinafina para os isolados de *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Microsporum canis* utilizando a técnica de microdiluição em caldo com alterações nas condições de tempo e temperatura de incubação.
2. Verificar a concordância de valores de CIM obtida pela técnica de diluição em ágar e de microdiluição em caldo.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Isolados de dermatófitos

Os isolados clínicos foram obtidos de pacientes procedentes do laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás durante o período de março a julho de 2005. As amostras clínicas foram previamente diagnosticadas através de exame direto com KOH a 40% e subsequentemente cultivadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida. Foram incluídos pacientes que concordaram em participar da pesquisa aprovada pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

##### 3.1.1 Identificação

Os 60 isolados de dermatófitos, *T. rubrum* (27), *T. mentagrophytes* (14) e *M. canis* (19) foram identificados segundo Rebell e Taplin, 1970. As características macroscópicas das colônias como cor, textura e relevo da superfície e do reverso e as características microscópicas baseadas principalmente na forma, tamanho e disposição dos conídios foram consideradas para a sua identificação. As figuras 1-3 e 4-6 mostram a morfologia macroscópica e microscópica, respectivamente, destas três espécies. Para a identificação de vários isolados foi necessária a utilização da técnica de microcultivo em lâmina, utilizando meio de ágar batata, para obtenção de elementos de frutificação típicos de cada microrganismo. Testes bioquímicos como o teste da urease e teste da perfuração do pêlo *in vitro* foram usados na diferenciação entre *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.



Figura 1. Macroscopia de *T. mentagrophytes* mostrando colônia branca, algodonosa, lisa na periferia e rugosa no centro.



Figura 4. Características microscópicas de *T. mentagrophytes* mostrando microconídios arredondados isolados ou agrupados e hifas em espiral (400X).

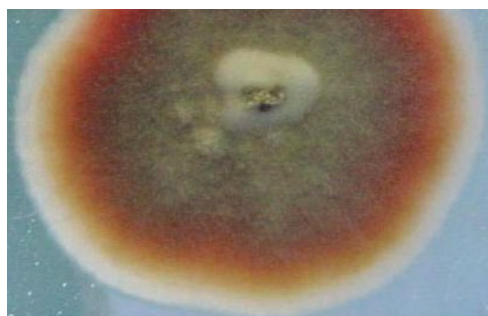


Figura 2. Colônia de *T. rubrum* com relevo central, de coloração avermelhada na periferia.

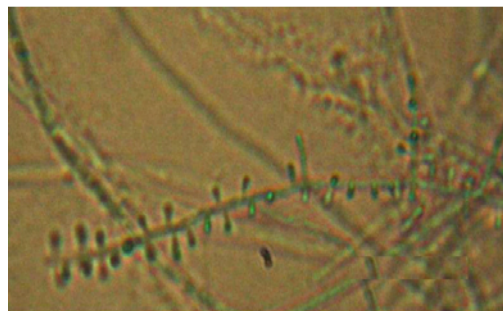


Figura 5. *T. rubrum* com microconídios em forma de lágrima dispostos em tirso (400X).



Figura 3. Colônia algodonosa e rugosa de *M. canis*, de coloração branca no centro e amarelada na periferia.



Figura 6. Macroconídio fusiforme de parede celular espessa, contendo 8 septos, típico de *M. canis* (400 X).

## **3.2 Teste de suscetibilidade *in vitro***

### **3.2.1 Microdiluição em caldo**

Esta técnica foi realizada seguindo o documento M38-A proposto pelo CLSI (2002) com algumas modificações.

#### **3.2.1.1 Agentes Antifúngicos**

Fluconazol (Pfizer International, New York, NY), cetoconazol, itraconazol (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafina (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) e griseofulvina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) foram utilizados para avaliar a suscetibilidade *in vitro* dos dermatófitos. O fluconazol foi dissolvido em água destilada, enquanto que os demais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido. Destes foram preparados soluções estoques de 1280 µg/ml, armazenados a -20°C antes do uso. Os agentes antifúngicos foram diluídos (diluição seriada ao dobro) em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com MOPS (ácido morfolino-propanossulfônico) de tal modo que as concentrações variaram de 0,25 a 128 µg/ml para fluconazol, 0,06 a 32 µg/ml para cetoconazol, itraconazol e terbinafina e 0,06 a 16 µg/ml para griseofulvina.

#### **3.2.1.2 Inóculo**

Os dermatófitos foram subcultivados em tubos contendo ágar batata dextrose, durante 7 dias a 28°C, aos quais foram adicionados 10 ml de salina estéril (0,85%). A suspensão resultante contendo conídios e hifas, transferida para um tubo estéril, foi deixada em repouso por 10 a 15 minutos para sedimentação das partículas mais pesadas. As partículas suspensas foram utilizadas para o inóculo, o qual foi ajustado

em espectrofotômetro para uma transmitância de aproximadamente 65 a 70%, em um comprimento de onda de 530 nm, que equivale a aproximadamente  $0,6$  a  $1,4 \times 10^6$  cels/ml. Em seguida, as suspensões contendo os inóculos foram diluídas em caldo RPMI 1640 de tal modo que se obtivesse uma concentração final de  $0,4$  a  $5 \times 10^4$  cels/ml.

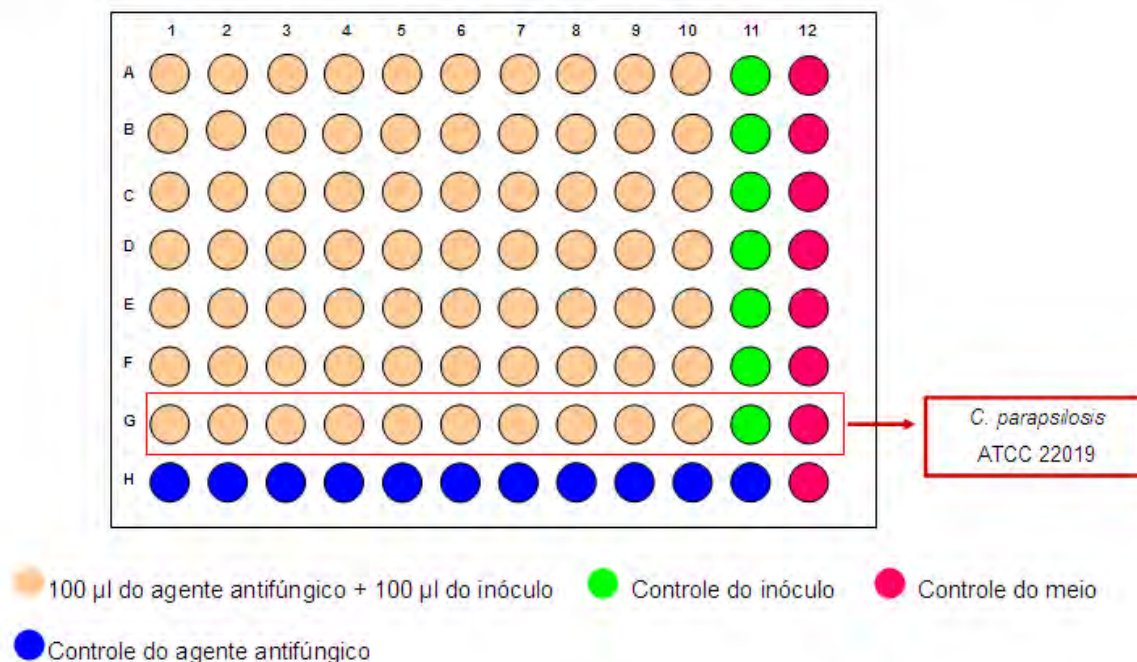
### **3.2.1.3 Procedimento do teste**

Foram utilizadas placas de microtitulação contendo 96 poços, nos quais os cinco diferentes agentes antifúngicos foram diluídos para a obtenção das concentrações citadas no item 3.2.1.1. A cada poço, contendo  $100 \mu\text{L}$  do agente antifúngico, foram adicionadas alíquotas de  $100 \mu\text{L}$  do inóculo, de tal modo que as concentrações dos fármacos ficaram diluídas ao dobro. Controles de agentes antifúngicos, inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) foram realizados em cada teste (esquema1).

### **3.2.1.4 Incubação e leitura do teste**

Em experimento prévio as placas de microdiluição foram incubadas a  $28^\circ\text{C}$  e a  $35^\circ\text{C}$ . Para a realização dos testes foi estabelecida a temperatura de  $28^\circ\text{C}$ , sendo a leitura da CIM realizada a cada 24h até indicação de crescimento no controle do inóculo. Para os derivados azólicos a CIM foi considerada como uma inibição de 50% e para terbinafina e griseofulvina, uma inibição de 80%, comparadas ao controle do inóculo.

Esquema 1. Teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo.



### 3.2.2 Diluição em ágar

Esta técnica foi realizada segundo Souza et al. (2002) com algumas modificações.

#### 3.2.2.1 Agentes Antifúngicos

Os seguintes agentes antifúngicos foram utilizados: fluconazol (Pfizer International, New York, NY), cetoconazol, itraconazol (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafina (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) e griseofulvina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo). O fluconazol foi dissolvido em água destilada, enquanto que os demais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido. Destes foram preparados soluções estoques de 12800 µg/ml, armazenados a -20°C antes do uso. Em caldo RPMI 1640, sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com MOPS, cada agente antifúngico foi diluído (diluição seriada ao dobro) a partir da solução estoque, de tal modo que as concentrações finais variaram de 1,25 a 640

$\mu\text{g/ml}$  para fluconazol, de 0,3 a 160  $\mu\text{g/ml}$  para cetoconazol, itraconazol e terbinafina e de 0,3 a 80  $\mu\text{g/ml}$  para griseofulvina.

### **3.2.2.2 Inóculo**

O inóculo utilizado para a realização dos testes foi o mesmo descrito no item 3.2.1.2.

### **3.2.2.3 Procedimento do teste**

Nesta técnica os agentes antifúngicos foram diluídos novamente 10 vezes em meio de ágar RPMI 1640 contidos em placas de Petri. A este meio ainda liquefeito, contendo o agente antifúngico, foram acrescentados 37 perfuradores de aço, que após a solidificação permitiam a formação de orifícios de aproximadamente 3 mm de diâmetro no meio de cultura. Cada orifício foi preenchido com 10  $\mu\text{L}$  do inóculo. Controle do inóculo e do meio foram realizados em cada teste (esquema 2).

### **3.2.2.4 Incubação e leitura do teste**

As placas foram incubadas a 28<sup>o</sup> C e a leitura da concentração inibitória mínima foi realizada a cada 24h até indicação de crescimento no controle do inóculo. Considerou-se concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do fungo.

Esquema 2. Teste de suscetibilidade *in vitro* pelo método de diluição em ágar.



### 3.3 Amostra controle dos testes de suscetibilidade

Uma cepa padrão, *C. parapsilosis* ATCC 22019, foi utilizada em cada teste com o objetivo de verificar a acurácia das diluições dos agentes antifúngicos e a reprodutibilidade dos resultados.

### 3.4 Análise dos dados

Os métodos de microdiluição em caldo e diluição em ágar foram comparados, sendo que a concordância entre estes foi analisada pela porcentagem de acordo de CIM. Os valores de CIM foram considerados concordantes quando não havia uma variação maior do que duas diluições entre as concentrações. Os valores de CIM encontrados pelo método de microdiluição em caldo foram considerados como referência para a comparação entre os métodos.

#### **4. Resultados e discussão**

Os resultados e discussão estão apresentados na forma de artigo.

## 5. Referência Bibliográfica

Ajello L 1977. Taxonomy of the dermatophytes: a review of their imperfect and perfect states, p: 289-297.

Aquino PMLP & Lima EO 2002. Estudo retrospectivo de 145 casos de *Tinea capitis* na população de João Pessoa-Paraíba. *RBAC* 34: 229-231.

Aquino PMLP, Lima EO, Farias NMP 2003. *Tinea capitis* em João Pessoa: visão socioeconômica. *An Bras Dermatol*, 78: 713-717.

Alvarez MI, González LA, Castro LA 2004. Onychomycosis in Cali, Colombia. *Mycopathologia* 158: 181-186.

Araújo AJG, Bastos OMP, Souza MAJ, Oliveira JC 2003. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. *An Bras Dermatol*, 78: 299-308.

Aste N & Pau M 2004. *Tinea capitis* by *Microsporum canis* treated with terbinafine. *Mycoses* 47: 428-430.

Benger S, Townsend P, Ashford RL, Lambert P 2004. An *in vitro* study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *The foot* 14: 86-91.

Bergson CL & Fernandes NC 2001. *Tinea capitis*: study of asymptomatic carriers and sick adolescents, adults and elderly who live with children with the disease. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 43: 87-91.

Brilhante RSN, Paixão GC, Salvino LK, Diógenes MJN, Bandeira SP, Rocha MFG, Santos JBF, Sidrim JJC 2000. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. *Rev Soc Bras Med Trop* 33: 417-425.

Chinelli PAV, Sofiatti AA, Nunes RS, Martins JEC 2003. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 259-263.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. *CLSI document M38-A 2002.* ‘

Colella MT, Castro M, Montiel M, Vásquez E, Mata-Essayag S, Magaldi S, Hartung de Capriles C, Pérez C, Olaizola C, Arántza R 2006. Susceptibilidad antifúngica em dermatofitos. *Kasmera* 34: 85-92.

Costa TR, Costa MR, Silva MV, Rodrigues AB, Fernandes OFL, Soares AJ, Silva MRR 1999. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 32: 367-371.

Costa M, Passos XS, Souza LKH, Miranda ATB, Lemos JA, Oliveira Júnior JG, Silva MRR 2002. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 19-22.

Dias T, Fernandes OFL, Soares AJ, Passos XS, Costa M, Souza LKH, Silva MRR. 2003. Tinha do couro cabeludo em crianças de Goiânia, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 653-655.

Dolenc-Voljc M 2005. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. *Mycoses* 48:181-186.

Duek L, Kufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. 2004. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect* 48: 175-180.

Ellabib MS, Khalifa Z, Kavanagh K. 2002. Dermatophytes and other fungi associated with skin mycoses in Trípoli, Libya. *Mycoses* 45: 101-104.

Fernandes NC, Akiti T, Barreiros MGC 2001. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 43: 83-85.

Fernández-Torres B, Vásquez-Veiga H, Llovo X, Pereiro M, Guarro J 2000. *In vitro* susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy* 46: 390-394.

Fernández-Torres B, Carrillo AJ, Martín E, Del Palacio A, Moore MK, Valverde A, Serrano M, Guarro J 2001. *In vitro* of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 2524-2528.

Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Munõz AJ, Esteban A, Inza I, Abarca L. Guarro J 2002. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. *J Clin Microbiol* 40: 3999-4003.

Fernández-Torres B, Carrillo-Muñoz A, Ortoneda M, Pujol I, Pastor FJ, Guarro J 2003. Interlaboratory evaluation of the Etest<sup>®</sup> for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol* 41: 125-130.

Foster KW, Ghannoum MA, Elewski BE 2004. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol* 50: 748-752.

Ghannoum M, Isham N, Hajjeh R, Cano M, Al-Hasawi F, Yearick D, Warner J, Long L, Jessup C, Elewski B 2002. Tinea capitis in Cleveland: survey of elementary school students. *J Am Acad Dermatol* 48: 189-193.

Goldstein AO, Smith KM, Ives TJ, Goldstein B 2000. Effective management of conditions involving the skin, hair, and nails. *Geriatrics* 55: 40-52.

Graser Y, El Fari M, Presber W, Sterry W, Tietz HJ 1998. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br J Dermatol* 138: 576-582.

Graser Y, Kuijpers AFA, Presber W, Hoog GS 2000. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. *J Clin Microbiol* 38: 3329-3336.

Gupta AK & Del Rosso JQ 2000. An evaluation of intermittent therapies used to treat onychomycosis and other dermatomycoses with the oral antifungal agents. *Int J Dermatol* 39: 401-411.

Gupta AK, Dlova N, Taborda P, Morar N, Taborda V, Lynde CW, Konnikov N, Borges M, Raboobee N, Summerbell RC, Adam P, Hofstader SLR, Aboobaker J 2000. Once weekly fluconazole is effective in children in the treatment of *tinea capitis*: a prospective, multicenter study. *Br J Dermatol* 142: 965-968.

Gupta AK & Kohli Y 2003. *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* 149: 296-305.

Hainer BL 2003. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician* 67: 101-108.

Houfbauer B, Leitner I, Ryder NS 2002. *In vitro* susceptibility of *Microsporum canis* and other dermatophyte isolates from veterinary infections during therapy with terbinafine or griseofulvin. *Med Mycol* 40: 179-183.

Howell SA, Barnard RJ, Humphreys F 1999. Application of molecular typing methods to dermatophyte species that cause skin and nail infections. *J Med Microbiol* 48: 33-40.

Huang DB, Ostrosky-Zeichner L, Wu JJ, Pang KR, Tyring SK 2004. Therapy of common superficial fungal infections. *Dermatol Therapy* 17: 517-522.

Jackson CJ, Barton RC, 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.

Jahromi SB & Khaskar AA 2006. Aetiological agents of tinea capitis in Tehran (Iran). *Mycoses* 49: 65-67.

Jain S & Sehgal VN 2001. Itraconazole: an effective oral antifungal for onychomycosis. *Int J Dermatol* 40: 1-5.

Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum MA 2000. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial

growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 38: 341-344.

Kano R, Nakamura Y, Watanabe S, Tsujimoto H, Hasegawa A 1999. Phylogenetic relation of *Epidermophyton floccosum* to the species of *Microsporum* and *Trichophyton* in chitin synthase 1 (*CHS1*) genes sequences. *Mycopathologia* 146: 111-113.

Karaca N & Koc AN 2004. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. *Diag Microbiol Inf Dis* 48: 259-264.

Know-Chung KJ & Bennett JE 1992. Dermatophytoses (Ringworm, Tinea, Dermatomycosis). In, Lea & Febiger, *Medical Mycology*, Philadelphia, p. 105-161.

Koc AN, Silici S, Ayangil D, Ferahbas A, Çankaya S 2005. Comparison of *in vitro* activities of antifungal drugs and ethanolic extract of propolis against *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by using a microdilution assay. *Mycoses* 48: 205-210.

Komaid AVG & Kestelman IB 2002. Unusual presentation of *Microsporum canis* in human hair. *Med Mycol* 40: 419-423.

Korting HC, Tietz HJ, Brautigam M, Mayser P, Rapatz G, Paul C, For the Last-Int-06 Study Group 2001. One week terbinafine 1% cream (Lamisil®) once daily is effective in the treatment of interdigital tinea pedis: a vehicle controlled study. *Med Mycol* 39: 335-340.

Koussidou-Eremondi T, Devliotou-Panagiotidou D, Mourellou-Tsatsou O, Minas A 2005. Epidemiology of dermatomycoses in children in Northern Greece 1996-2000. *Mycoses* 48: 11-16.

Kushwaha RKS & Guarro J 2002. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. *Rev Inst Med Trop S. Paulo* 44: 150.

Larone DH 1996. Culture and identification of dermatophytes. *Clin Microbiol Newsl* 18: 33-40.

Lebwohl MG, Daniel CR, Leyden J, Mormon M, Shavin JS, Tschen E, Weiss J, Zone J 2001. Efficacy and safety of terbinafine for nondermatophyte and mixed nondematophyte and dermatophyte toenail onychomycosis. *Int J Dermatol* 40: 358-360.

Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J 2001. A specific PCR assay for dermatophyte fungus *Microsporum canis*. *Med Mycol* 39: 215-219.

Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedresen J 2002. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilli*. *J Med Microbiol* 51: 117-122.

Macêdo DPC, Neves RP, Magalhães OMC, Souza-Motta CM, Queiroz LA 2005. Pathogenic aspects of *Epidermophyton floccosum* Langeron et Milochevitch as a possible aethiological agent of *tinea capitis*. *Braz J Microbiol* 36: 36-37.

Maertens JA 2004. History of the development of azole derivates. *Clin Microbiol Infect* 10: 1-10.

Mahmoudabadi AZ 2005. A study of dermatophytosis in South West of Iran (Ahwaz). *Mycopathologia* 160: 21-24.

Nakano N, Hiruma M, Shiraki Y, Chen X, Pongpermddee S, Ikeda S 2006. Combination of pulse therapy with terbinafine tablets and topical terbinafine cream for the treatment of dermatophyte onychomycosis: a pilot study. *J Dermatol* 33: 753-758.

Nozickova M, Koudelkova V, Kilikova Z, Malina L, Urbanowski S, Silny W 1998. A comparison of the efficacy of oral fluconazole, 150 mg/week versus 50 mg/day, in the treatment of tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis, and cutaneous candidosis. *Int J Dermatol* 37: 703-705.

Ogasawara Y, Hiruma M, Muto M, Ogawa H 2003. Clinical and mycological study of occult tinea pedis and tinea unguium in dermatological patients from Tokyo. *Mycoses* 46: 114-119.

Oliveira JAA, Barros JA, Cortez ACA, Oliveira JSRL 2006. Micose superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. *An Bras Dermatol* 81: 238-243.

Ozkutuk A, Ergon C, Yulug N 2007. Species distribution and antifungal susceptibilities of dermatophytes during a one year period at a university hospital in Turkey. *Mycoses* 50: 125-129.

Perea S, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG 2001. Comparison of *in vitro* activities of voriconazole and five established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. *J Clin Microbiol* 39: 385-388.

Perrins N, Howell SA, Moore M, Bond R 2005. Inhibition of the growth *in vitro* of *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton erinacei* and *Microsporum persicolor* by miconazole and chlorhexidine. *Vet Dermatol* 16: 330-333.

Pujol I, Capilla J, Fernández-Torres B, Ortoneda M, Guarro J 2002. Use of the sensititre colorimetic microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 40: 2618-2621.

Rebell G & Taplin D 1970. The dermatophytes. Their recognition and identification. University of Miami Press, Coral Gables.

Santos JJ, Paula CR, Viani FC, Gambale W 2001. Susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* to three azoles by E-test. *J Mycol Med* 11: 42-43.

Santos JI, Coelho MPP, Nappi BP 2002. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. *RBAC* 34: 3-6.

Sberna F, Farella V, Geti V 1993. Epidemiology of the dermatophytoses in the Florence area of Italy: 1985-1990. *Mycopathologia* 122: 153-162.

Shin S and Lim S 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. *J App Microbiol* 97: 1289-1296.

Simpanya MF 2000. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. *Rev Iberoam Micol* 17: 1-12.

Siqueira ABS, Toscano MG, Irmão JI, Giampaoli V, Queiroz LA 2005. Dermatomicoses e entomoparasitoses em escolares da comunidade de Brasília Teimosa, Recife-Pe, Brasil. *RBAC* 37: 71-75.

Souza Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Júnior JG, Miranda ATB, Lião LM, Silva MRR. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 247-249.

Tomás JG, Calvo CR, Ruesca RB 2004. Criterios de sensibilidad a los azoles. *Rev Esp Quimioterap* 17: 83-90.

Torres-Rodríguez JM, Madrenys-Brunet N, Urrea-Arbeláez A, López-Jodra O 1998. Terbinafina por via oral em el tratamiento de la tinea unguium de los pies. Eficácia entre 12 y 24 semanas de tratamiento. *Rev Iberoam Micol* 15: 160-162.

Zaias N & Rebell G 2003. Clinical and mycological status of the *Trichophyton mentagrophytes (interdigitale)* syndrome of chronic dermatophytosis of the skin and nails. *Int J Dermatol* 42: 779-788.

Weinstein A & Berman B 2002. Topical treatment of common superficial tinea infection. *Am Fam Physician* 65: 2095-2102.

Weitzman I, McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L 1986. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizzia*. *Mycotaxon* 25: 505-518.

Weitzman I & Summerbell RC 1995. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 8: 240-259.

Woldeamanuel Y, Mengistu Y, Chryssanthou E, Petrini B 2005. Dermatophytosis in Tulugudu Island, Ethiopia. *Med Mycol* 43: 79-82.

As referências citadas acima estão de acordo com as normas adotadas pelo periódico Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

**6. ARTIGO 1: *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania - Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method**

**Artigo a ser submetido à Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.**

***In vitro* susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania - Brazil,  
against five antifungal agents by broth microdilution method**

Crystiane Rodrigues ARAUJO, Karla Carvalho MIRANDA, Orionalda de Fatima Lisboa FERNANDES, Ailton José SOARES & Maria do Rosário Rodrigues SILVA

**SUMMARY**

The antifungal activities of fluconazole, itraconazole, ketoconazole, terbinafine and griseofulvin were tested by broth microdilution technique, against 60 dermatophytes isolated from nail or skin specimens from Goiania city patients, Brazil. In this study, the microtiter plates were incubated at 28°C allowing a reading of the minimal inhibitory concentration (MIC) after four days of incubation for *Trichophyton mentagrophytes* and five days for *T. rubrum* and *Microsporum canis*. Most of the dermatophytes had uniform patterns of susceptibility to the antifungal agents tested. Low MIC values as 0.03 µg/ml were found for 33.3%, 31.6% and 15% of isolates for itraconazole, ketoconazole and terbinafine, respectively.

**Keywords:** Dermatophytes; Broth microdilution method; Minimal Inhibitory Concentration.

---

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.  
Goiânia-GO – Brazil

**Correspondence to:** Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva ([rosario@iptsp.ufg.br](mailto:rosario@iptsp.ufg.br)).

## INTRODUCTION

Dermatophytosis, mycotic infections caused by dermatophytes, are commonly related in tropical countries and represent an important public health problem yet unresolved<sup>4</sup>. *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* and *Microsporum canis* are the most common species isolated in Brazil as causative agents of dermatophytosis<sup>1, 6, 7, 8, 21</sup>. In Goiania city, Brazil, these same aetiological agents has been recovered in studies of COSTA *et al.*<sup>6</sup> and COSTA *et al.*<sup>6, 7</sup>. Antifungal agents such as triazoles (itraconazole, fluconazole), imidazole (ketoconazole), allylamine (terbinafine) and griseofulvin have been reported to have substantial activity in dermatophytosis<sup>16, 17</sup>. However, infections due to dermatophytes are often associated with relapses after cessation of therapy<sup>20</sup>. By the way, due to relapses observed and the several drugs used in the therapy of dermatophytosis, *in vitro* antifungal susceptibility tests are necessary for therapeutic control and for selection of an effective antifungal agent for this mycosis<sup>3</sup>. A standard method for susceptibility testing of dermatophytes is lacking, but good results of MIC using either broth macrodilution or broth microdilution tests have been obtained in several reports<sup>9, 10, 12, 18</sup>. The purpose of this work was to establish the *in vitro* antifungal susceptibility of fluconazole, itraconazole, ketoconazole, terbinafine and griseofulvin against clinical dermatophytes isolates in Goiania-GO, Brazil, using the broth microdilution method.

## MATERIALS AND METHODS

**Organisms:** A total of 60 dermatophyte strains, including *Trichophyton rubrum* (n = 27), *T. mentagrophytes* (n = 14) and *Microsporum canis* (n = 19) were tested. All microorganisms were clinical isolates obtained from nail or skin specimens recovered from patients from Goiania University Hospital. The fungi were maintained in sterile distilled water at room temperature and prior to testing, the strains were

subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 28°C for 7 to 15 days to ensure the viability and the purity of the inoculum. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was included as reference strain.

***In vitro* susceptibility testing:** The broth microdilution assay for antifungal susceptibility testing of dermatophytes was performed, when possible according to the CLSI guidelines in the document M38-A of filamentous fungi<sup>5</sup>.

**Antifungal drugs dilution:** The drugs were obtained from their respective manufacturers: fluconazole (Pfizer International, New York, NY), ketoconazole, itraconazole (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafine (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) and griseofulvin (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo). Fluconazole was dissolved in distilled water while the others drugs were dissolved in 100% dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich). They were subsequently prepared as stock solution and serial twofold dilutions were performed. Final concentrations ranged from 0.125 to 64 µg/ml for fluconazole, 0.03 to 16 µg/ml for ketoconazole, itraconazole and terbinafine, and 0.03 to 8 µg/ml for griseofulvin.

**Test procedure:** Inoculum suspensions of dermatophytes were prepared from the 7 days cultures grown on potato dextrose agar at 28°C. The fungal colonies were covered with approximately 10 ml of distilled water, and the suspensions were made by scraping the surface with the tip of a sterile loop. The resulting mixture of conidia and hyphal fragments was withdrawn and transferred to sterile tubes and left for 15 to 20 minutes at room temperature to sediment the heavy particles. The optical density of the suspensions containing conidia and hyphal fragments was read at 530 nm, adjusted to transmittance of 65 to 70% (~ 2 to 4 X 10<sup>6</sup> cells/ml) and diluted with RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) to obtain the final inoculum size of approximately 0.4 to 5 X 10<sup>4</sup> cells/ml. Aliquots of 100 µl of these suspensions

were inoculated in well of microtiter plate containing 100 µl of specific antifungal drug concentration. These plates were incubated at 28°C and the reading was performed every 24 h until the indication of growth in control well drug-free. Each assay was carried out in duplicate.

**Endpoint determination:** Endpoint determination values were performed visually every 24 h until the indication of growth in control well drug-free. For azole agents and griseofulvin, the MIC was defined as the lowest concentration that produced prominent inhibition of growth (approximately 80% inhibition) while for terbinafine, was defined as lowest concentration showing 100% growth inhibition<sup>23</sup>.

## RESULTS

MICs of antifungal agents for 60 dermatophytes isolates could be determined after four days for *T. mentagrophytes* and five days for *T. rubrum* and *M. canis* when incubated at 28°C.

In general, the species of dermatophytes showed similar patterns of susceptibility to each antifungal agent tested. The determination of the isolates as susceptible or resistant is complex and not yet been established for dermatophytes, but high MIC values were found for some isolates. Seven (11.6%) dermatophytes strains (five *T. rubrum* and two *M. canis*) had MICs of fluconazole of 32 µg/ml, five (8,3%) strains (four *T. rubrum* and one *M. canis*) had MICs of ketoconazole of 4 µg/ml and one *M. canis* isolate had MIC of 8 µg/ml for griseofulvin. However the most of isolates showed low MIC values, being that 33.3%, 31.6% and 15% of isolates had MIC of 0.03 µg/ml for itraconazole, ketoconazole and terbinafine, respectively.

The table 1 summarizes the MIC ranges, concentrations inhibiting 50% (MIC<sub>50</sub>) and 90% (MIC<sub>90</sub>) of the isolates and geometric mean of the MICs of the five antifungal drugs against 60 strains of dermatophytes.

The MIC ranges of fluconazole, itraconazole and ketoconazole for *C. parapsilosis* ATCC 22019 were within the values standardized by CLSI document M-38-A.

## DISCUSSION

The determination of the *in vitro* susceptibility may prove helpful to predict the ability of a given antifungal agent to eradicate dermatophytes. Although a reference method for dermatophytes, is not available, a good correlation between the *in vitro* data, using broth microdilution method, and clinical outcome has been demonstrated<sup>19</sup>.

Some recommendations, as temperature and duration of incubation used in the broth microdilution method according with the document M 38-A of filamentous fungi were modified in this study. In this document, the temperature at 35°C is used for incubation; however we used for dermatophytes the temperature at 28°C according to BARROS *et al.*<sup>2</sup> and SANTOS *et al.*<sup>23</sup> which obtained success in their results. Studies of *in vitro* susceptibility testing for dermatophytes previously performed in our laboratory showed that the MIC values were easier to read and to interpret when the microtiter plates were incubated at 28°C than at 35°C (data not shown). It is well known that an optimal growth on culture media is obtained by dermatophytes strains when incubated between 28°C and 30°C<sup>9, 11, 22</sup>. The document M38-A establish 24 to 72 h of incubation for filamentous fungi, however, in our work, a detectable growth was observed after 4 days for *T. mentagrophytes* and after 5 days for *T. rubrum* and *M. canis*. The ideal incubation time is still a matter of debate. FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*<sup>13</sup> and SANTOS *et al.*<sup>23,24</sup> found that 7 days was sufficient to observe prominent growth in control wells, while GHANNOUM *et al.*<sup>14</sup> and JESSUP *et al.*<sup>18</sup> verified growth in four days at 28°C.

In our work, the evaluation of *in vitro* susceptibility showed that the antifungal drugs tested, with exception of fluconazole, displayed good activity against the dermatophytes. It is worth mentioning that itraconazole, ketoconazole and terbinafine had the lowest MIC values and geometric means. Similar results have been verified by others authors that showed that these drugs had low MICs against dermatophytes<sup>10, 12,15</sup>. These low MICs found for the three drugs can help to explain the promising results obtained for the treatment of dermatophytosis with these antifungal agents<sup>19</sup>.

Although fluconazole has showed the highest MIC values of all the antifungal agents tested, we verified that *T. rubrum* strains, one specie that cause a recalcitrant chronic disease, were more susceptible to this drug than *T. mentagrophytes* and *M. canis* isolates (geometric mean of 7.60 for *T. rubrum*, 9.96 for *M. canis* and 11.31 for *T. mentagrophytes*). Our results are similar to FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*<sup>10</sup> who demonstrated higher activity of fluconazole for *T. rubrum* than for *T. mentagrophytes*, *M. canis* and *M. gypseum*.

In summary, the parameters as temperature at 28°C, incubation time of five days and inoculum of 0.4 to 5 X 10<sup>4</sup> cells/ml allowed the determination of MIC for dermatophytes by using the microdilution method. Besides, our work demonstrated that *in vitro* different antifungal agents are active against dermatophytes independent of specie.

## RESUMO

### **Teste de suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos isolados –Brasil, contra cinco agentes antifúngicos pelo método de microdiluição em caldo**

Atividades antifúngicas de fluconazol, itraconazol, cetoconazol, terbinafina e griseofulvina foam testadas pelo método de microdiluição em caldo contra 60

isolados de dermatófitos. Os resultados mostraram que todos os isolados produziram crescimento claramente detectável à 28 °C e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada após quatro dias de incubação para *Trichophyton mentagrophytes* e cinco dias para *T. rubrum* e *Microsporum canis*. A maioria dos isolados teve um padrão uniforme de suscetibilidade para os agentes antifúngicos testados. Baixos valores de CIM como 0,03 µg/ml foram encontrados para 33,3%, 31,6% e 15% dos isolados para itraconazol, cetoconazol e terbinafina, respectivamente.

## REFERENCES

1. ARAÚJO, A.J.G.; BASTOS, O.M.P.; SOUZA, M.A.J.; OLIVEIRA, J.C. - Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, **78**: 299-308, 2003.
2. BARROS, M.E.S.; SANTOS, D.A.; HAMDAN, J.S. - Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **J. Clin. Microbiol.**, **56**: 514-518, 2007.
3. CARRILLO-MUNÓZ, A.J.; QUINDÓS, G.; RUESGA, M.; DEL VALLE, O.; PEMÁN J.; CANTÓN, E.; HERNÁNDEZ-MOLINA, J.M.; SANTOS, P. - In Vitro susceptibility testing of filamentous fungi with Sensititre Yeast One™. **Mycoses**, **49**: 293-297, 2006.
4. CHINELLI, P.A.V.; SOFIATTI, A.A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E.C. - Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, **45**: 259-263, 2003.

5. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous, CLSI, 2002. (Approved Standard M38-A).
6. COSTA, M.; PASSOS, X.S.; SOUZA, L.K.H.; MIRANDA, A.T.B.; LEMOS, J.A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.G.; SILVA, M.R.R. - Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**: 19-22, 2002.
7. COSTA, T.R.; COSTA, M.R.; SILVA, M.V.; RODRIGUES, A.B.; FERNANDES, O.F.L.; SOARES, A.J.; SILVA, M.R.R. - Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**: 367-371, 1999.
8. DIAS, T.; FERNANDES, O.F.L.; SOARES, A.J.; PASSOS, X.S.; COSTA, M.; SOUZA, L.K.H.; SILVA, M.R.R. - Tinha do couro cabeludo em crianças de Goiânia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **36**: 653-655, 2003.
9. FERNÁNDEZ-TORRES, B.; VÁZQUEZ-VEIGA, H.; LIOVO, X.; PEREIRO, M.; GUARRO, J. - In vitro susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. **Chemotherapy**, **46**: 390-394, 2000.
10. FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CARRILLO, A.J.; MARTÍN, E.; DEL PALACIO, A.; MOORE, M.K.; VALVERDE, A.; SERRANO, M.; GUARRO, J. - In vitro of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, **45**: 2524-2528, 2001.

11. FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CABAÑES, F.J.; CARRILLO-MUNÓZ, A.J.; ESTEBAN, A.; INZA, I.; ABARCA, L.; GUARRO, J. - Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. **J. Clin. Microbiol.**, **40**: 3999-4003, 2002.
12. FERNÁNDEZ-TORRES, B.; CARRILLO-MUÑOZ, A.; ORTOPEDA, M.; PUJOL, I.; PASTOR, F.J.; GUARRO, J. - Interlaboratory evaluation of the Etest<sup>®</sup> for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Med. Mycol.**, **41**: 125-130, 2003.
13. 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.**, **41**:5209-5211, 2003.
14. GHANNOUM, M.A.; CHATURVEDI, V.; ESPINEL-INGROFF, *et al.* - Intra and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. **J. Clin. Microbiol.**, **42**: 2977-2979, 2004.
15. GHANNOUM, M.A.; WRAI, L.A.; CAI, B.; NYIRADY, J. & ISHAH N. – Susceptibility of dermatophytes isolates obtained from a large worldwide terbinafine tinea capitis clinical trial. **Brit. J. Derm.**, **159**: 711-713, 2008.
16. GUPTA, A.K. & DEL ROSSO, J.Q. - An evaluation of intermittent therapies used to treat onychomycosis and other dermatomycoses with the oral antifungal agents. **Int. J. Dermatol.**, **39**: 401-411, 2000.
17. HAINER, B.L. - Dermatophyte infections. **Am. Fam. Physician.**, **67**: 101-108, 2003.

18. JESSUP, C.J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I.; GHANNOUM, A. - Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **J. Clin. Microbiol.**, **38**: 341-344, 2000.
19. KORTING, H.C.; OLLERT, M.; ABECK, D. - Results of German multicenter study of antimicrobial susceptibilities of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* strains causing tinea unguium. German Collaborative dermatophyte drug susceptibility study group. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **39**: 1206-1208, 1995.
20. MUKHERJEE, P.K.; LEIDICH, S.D.; ISHAM, N.; LETNER, I.; RYDER, N.S.; GHANNOUM, M.A. - Clinical *Trichophyton rubrum* strain exhibiting primary resistance to terbinafine. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47**: 82-86, 2003.
21. OLIVEIRA, J.A.A.; BARROS, J.A.; CORTEZ, A.C.A.; OLIVEIRA, J.S.R.L. - Micoses superficiais na cidade de Manaus, AM, entre março e novembro/2003. **An. Bras. Dermatol.**, **81**: 238-243, 2006.
22. PUJOL, I.; CAPILLA, J.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; ORTOPEDA, M.; GUARRO, J. - Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J. Clin. Microbiol.**, **40**: 2618-2621, 2002.
23. SANTOS, D.A.; BARROS, M.E.S.; HAMDAN, J.S. - Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Clin. Microbiol.**, **44**: 98-101, 2006.

24. SANTOS, D.A. & HAMDAN, J.S. – *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole.

**Mycoses**, 50: 286-289, 2007.

Table 1.

*In vitro* activities of five antifungal agents against 60 strains of dermatophytes isolates from patients from Goiania University Hospital from March to July 2006.

Species (n <sup>o</sup> of isolates)	Antifungal agents	MIC (µg/ml)			
		Range	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Geometric mean
<i>T. rubrum</i> (27)	Fluconazole	2-32	8	32	7.60
	Itraconazole	0.03-4	0.125	0.5	0.10
	Ketoconazole	0.03-4	0.06	4	0.13
	Terbinafine	0.03-0.5	0.125	0.25	0.11
	Griseofulvin	0.25-2	0.5	1	0.65
<i>T. mentagrophytes</i> (14)	Fluconazole	4-16	16	16	11.31
	Itraconazole	0.03-0.25	0.125	0.25	0.09
	Ketoconazole	0.03-1	0.125	0.25	0.12
	Terbinafine	0.03-0.5	0.06	0.25	0.08
	Griseofulvin	0.25-1	0.5	0.5	0.45
<i>M. canis</i> (19)	Fluconazole	2-32	8	16	9.96
	Itraconazole	0.03-0.25	0.125	0.25	0.08
	Ketoconazole	0.03-4	0.125	0.25	0.12
	Terbinafine	0.03-1	0.125	0.25	0.11
	Griseofulvin	0.06-8	0.25	0.5	0.31

MIC- minimal inhibitory concentration; MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> - MIC inhibiting 50% and 90% of the isolates.

**7. ARTIGO 2: Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes.**

**Artigo submetido à revista Medical Mycology**

## Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods for antifungal susceptibility testing of dermatophytes

### Comparison of susceptibility testing of dermatophytes

Crystiane Rodrigues de Araujo, Karla Carvalho Miranda, Janine de Aquino Lemos, Carolina Rodrigues Costa, Lúcia Kioko Hasimoto e Souza, Hildene Meneses e Silva, Xisto Sena Passos and Maria do Rosário Rodrigues Silva.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.  
Goiânia-GO - Brazil

#### Abstract

The purpose of this work was to compare the agar dilution and broth microdilution methods for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of fluconazole, itraconazole, ketoconazole, griseofulvin and terbinafine against 60 dermatophyte strains belonging to the species, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes* and *Microsporum canis*. The levels of agreement between two methods ( $\leq 2$  dilutions) were 91.6% with ketoconazole and griseofulvin, 88.3% with itraconazole, 81.6% with terbinafine and 73.3% with fluconazole for all the tested isolates. Excellent agreement (100%) was obtained with ketoconazole and griseofulvin for *T. mentagrophytes* isolates. Until a reference method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes is standardized, the similar results obtained in this work with those previously described by several researchers allow to suggest that the broth microdilution and the agar dilution methods can be useful for testing the susceptibility of these fungi.

**Keywords:** agar dilution method , broth microdilution method, dermatophytes

## **Introduction**

Infections caused by dermatophytes are probably the most common cutaneous fungal diseases in humans and animals [1]. An increasing number of antimycotics has become available for the treatment of dermatophytoses [2, 3], however not all species have the same susceptibility patterns and may occur relative or absolute microbial resistance of some dermatophytes [4, 5]. Research about the evaluation of the *in vitro* susceptibility has been hampered by the lack of reliable *in vitro* techniques for determining the MIC of antifungal agents on dermatophytes.

Various methods as broth macro and microdilutions, agar dilution, Etest<sup>®</sup>, sensititre colorimetric microdilution panel and disk diffusion have been used for determining the susceptibility of dermatophytes to antifungal agents [6-12]. However, there is no a reference method available for these filamentous fungi. The document M38-A, published in 2002 by CLSI [13] for determining the MIC of several antifungal agents against conidium-forming filamentous fungi, has not included the dermatophytes [14, 15].

By the way, advanced studies *in vitro* susceptibility testing to determine the antifungal activities of different drugs against dermatophytes are needed. In order to compare the results, we performed susceptibility testing using the agar dilution and broth microdilution methods with five antifungal agents against 60 dermatophyte strains belonging to three different species.

## **Materials and Methods**

### *Isolates*

A total of 60 strains of dermatophytes belonging to three species, were tested. They were *T. rubrum* (n = 27), *T. mentagrophytes* (n = 14) and *M. canis* (n = 19). All microorganisms were clinical isolates obtained of patients from a tertiary hospital in Goiânia city, Brazil. The fungi were maintained in sterile distilled water at – 20°C and prior to testing they were subcultured on potato dextrose agar (PDA) at 28°C for 7 to 15 days to ensure optimal growth characteristics.

#### *Antifungal agents*

Fluconazole (Pfizer International, New York, NY), ketoconazole, itraconazole (Jansen Pharmaceuticals, Beerse, Belgium), terbinafine (Novartis Research Institute, Vienna, Austria) and griseofulvin (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) were tested against all the strains of dermatophytes studied.

#### ***In vitro* susceptibility testing**

##### *Broth microdilution method*

The broth microdilution method was performed in accordance with the CLSI guidelines in the document M38-A [13] with some modifications. Briefly, the final inoculum suspension was of approximately  $0.4$  to  $5 \times 10^4$  cells/ml, and the drug final concentrations ranged from 0.125 to 64 µg/ml for fluconazole, of 0.03 to 16 µg/ml for ketoconazole, itraconazole and terbinafine, and of 0.03 to 8 µg/ml for griseofulvin. The plates were incubated at 28°C and the reading of the growth was observed every 24 h until the indication of growth in control well drug-free. The MIC endpoints were defined as the lowest concentration that produced prominent inhibition of growth, approximately 50% inhibition for fluconazole, itraconazole and ketoconazole, and 80% inhibition for terbinafine and griseofulvin [11].

### *Agar Dilution method*

The agar dilution method was performed as described by Souza *et al.* [16], and it was slightly modified. The antifungal agents were serially two-fold diluted in broth RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) agar medium to obtain final concentrations of 1.25 to 640 µg/ml for fluconazole, 0.3 to 160 µg/ml for ketoconazole, itraconazole and terbinafine, and 0.3 to 80 µg/ml for griseofulvin. These antifungals were diluted 1:10 in plates containing melted RPMI agar medium. In these plates were inserted steel perforators that allowed, after solidification of the medium, the formation of 37 holes of 3 mm diameter as showed in figure 1. The holes were filled with 10 µl of inoculum containing 0.4 to 5 X 10<sup>4</sup> cells/ml. The plates were incubated at 28°C and the reading of the growth was observed every 24 h until the indication of growth in control hole drug-free. For all the antifungal agents tested, the MIC was read as the lowest drug concentration that prevented any discernible growth.

### *Quality control.*

One CLSI quality control strain, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, was included on each day testing to check the accuracy of drugs dilutions (fluconazole, ketoconazole and itraconazole) and the reproductibility of the results.

### *Data analysis.*

All the tests were performed in duplicate. The agreement between the two methods for each isolate was considered as a difference in MICs no more than 2 dilutions as described in table 1.

## Results

The isolates tested produced a detectable growth between 72 and 120 h of incubation by using either broth microdilution or agar dilution methods. MICs were determined by broth microdilution method after 4 days of incubation for all the isolates of *T. mentagrophytes* and after 5 days of incubation for *T. rubrum* and *M. canis* isolates. By using agar dilution, a detectable growth was observed after 5 days of incubation for all the isolates (figure 2).

The percentage of agreement between two methods considering as a difference in MICs no more than 2 dilutions is summarized in Table 1. The highest levels of agreement were noted with ketoconazole (91.6%) and griseofulvin (91.6%) for all the isolates tested. Excellent agreement (100%) was obtained with ketoconazole and griseofulvin for *T. mentagrophytes* isolates.

A lowest concordance was observed for fluconazole. Considering all the dermatophytes, the agreement was of 73.3% while for *T. mentagrophytes* was only of 57.1%. Fluconazole MIC values in agar dilution method were higher than that broth microdilution method.

Fluconazole, ketoconazole and itraconazole MICs for *C. parapsilosis* (ATCC 22019) were inside the established ranges by using broth microdilution method [13]. The agar dilution method showed MICs for this strain slightly higher than broth microdilution (no more than two dilutions).

## Discussion

Although the CLSI has published a document for testing filamentous fungi [13], no reference method has been established to test drug susceptibility of dermatophytes. Some parameters as temperature, incubation time and endpoint determination are difficult to solve *in vitro* susceptibility testing for filamentous fungi [17, 18].

In despite of CLSI has established incubation temperature at 35°C for filamentous fungi, we used an incubation at 28°C. In preliminary experiment performed in our laboratory the dermatophyte strains had a growth better at 28°C than at 35°C (data not showed). According to Pujol *et al.* [10] at 28°C the MICs are more reproducible and the growth of dermatophytes is more characteristic.

In our work, the MIC endpoints were determined after five days in agar dilution and four to five days in broth microdilution. The reading of MIC values for each method performed every day allowed to define this time of incubation. Our results are similar to Ghannoun *et al.* [15] that incubated the dermatophytes for four days by using the broth microdilution method.

Comparing the results of MICs observed in both agar dilution and broth microdilution methods, we verified a good concordance (difference in MICs no more than 2 dilutions). For all the isolates we observed more than 73% concordance between the results by using the two methods for determination of MICs of dermatophytes strains tested to fluconazole, ketoconazole, itraconazole, terbinafine and griseofulvin. It is interesting to note that the agreement between the two methods varied according to the dermatophyte species and the drug tested. For *T. mentagrophytes* the agreement was of 57.1% with fluconazole and of 100% with ketoconazole and griseofulvin (table 1).

According to table 1, the highest disagreement verified in this work was with fluconazole. Fernández-Torres *et al.* [4] verified poor agreement with fluconazole between the broth microdilution and Etest (method based on the diffusion of the antifungal agent into an agar medium) methods. However there are no reasons for the disagreement found with fluconazole. A high number of strains may be needed to explain these results.

Corroborating to validate our results, we verified that MIC ranges of dermatophytes to different drugs found in our work were similar to those previously performed by several researchers using the broth microdilution method [7, 10, 14, 19]. Until a reference method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes is standardized, we can suggest that the broth microdilution and the agar dilution methods can be useful for testing the susceptibility of these fungi.

## References

1. Chinelli PAV, Sofiatti AA., Nunes RS, Martins JEC. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2003; **45**: 259-263.
2. Barchiesi F, Arzeni D, Camiletti V, Simonetti O, Cellini A, Offidani A, Scalise G. *In vitro* activity of posaconazole against clinical isolates of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 4208-4209.
3. Chadeganipor M, Nilipour S, Havaei A. *In vitro* evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. *Mycoses* 2004; **47**: 503-507.
4. Fernández-Torres B, Carrillo-Muñoz A, Ortopeda M, Pujol I, Pastor FJ, Guarro J. Interlaboratory evaluation of the Etest<sup>®</sup> for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *Med Mycol* 2003; **41**: 125-130.
5. Osborne CS, Leitner I, Hofbauer B, Fielding, Favre B, Ryder NS. Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolates resistant to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 2234-2236.

6. Niewerth M, Splanemann V, Korting HC, Ring J, Abeck D. Antimicrobial susceptibility testing of dermatophytes-comparison of the agar macrodilution and broth microdilution tests. *Chemotherapy* 1998; **44**: 31-35.
7. Fernández-Torres B, Carrillo AJ, Martín E, Del Palacio A, Moore MK, Valverde A, Serrano M, Guarro J. *In vitro* of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2524-2528.
8. Perea S, Fothergill AW., Sutton DA, Rinaldi MG. Comparison of *in vitro* activities of voriconazole and five established antifungal agents against different species of dermatophytes using a broth macrodilution method. *J Clin Microbiol* 2001; **39**: 385-388.
9. Santos JJ, Paula CR, Viani FC, Gambale W. Susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Microsporum canis* to three azoles by E-test. *J Mycol Med* 2001; **11**: 42-43.
10. Pujol I, Capilla J, Fernández-Torres B, Ortopeda M, Guarro J. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2618-2621.
11. Karaca N & Koç A. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. *Diag Microbiol Inf Dis* 2004; **48**: 259-264.
12. Perrins N, Howell SA, Moore M, Bond R. Inhibition of the growth *in vitro* of *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton erinacei* and *Microsporum persicolor* by miconazole and chlorhexidine. *Vet Dermatol* 2005; **16**: 330-333.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A, 2002.
14. Fernández-Torres B, Cabañes FJ, Carrillo-Munõz AJ, Esteban A, Inza I, Abarca L, Guarro J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing condition for dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 3999-4003.
15. Ghannoum MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Rinaldi MG, Lee-Yang W, Warnock W. Intra and interlaboratory study of a method for testing the antifungal susceptibilities of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 2977-2979.
16. Souza LKH, Oliveira CMA, Ferri PH, Santos SC, Oliveira Júnior JG, Miranda ATB, Lião LM, Silva MRR. Antifungal properties of brazilian cerrado plants. *Braz J Microbiol* 2002; **33**: 247-249.
17. Jessup CJ, Warner J, Isham N, Hasan I, Ghannoum A. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 341-344.
18. Alió AB, Mendoza SM, Zambrano EA, Díaz E, Cavallera E. Dermatophytes growth curve and *in vitro* susceptibility test: a broth micro-titration method. *Med Mycol* 2005; **43**: 319-325.

19. Santos DA & Hamdan JS. Evaluation of brío microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 1917-1920.



Figure 1. Formation of holes of 3 mm diameter in melted RPMI agar medium by using steel perforators in agar dilution method.

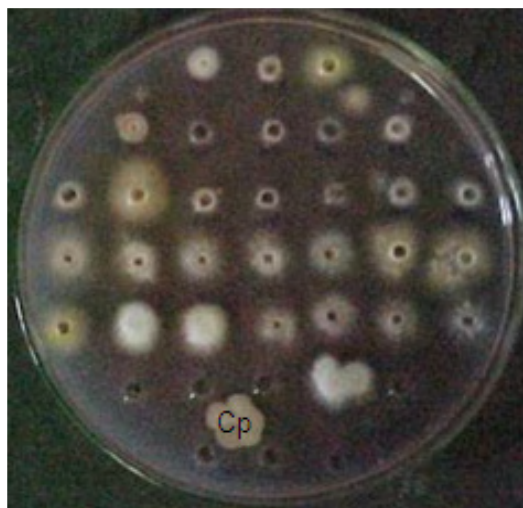


Figure 2. Detectable growth of dermatophytes (fluconazole MIC=2  $\mu\text{g/ml}$ ) by agar dilution method after 5 days incubation at 28°C. **Cp**: *Candida parapsilosis* ATCC 22019

Table 1. Agreement between MICs of five antifungal agents for 60 strains of dermatophytes obtained with broth microdilution and agar dilution methods

Species/ Antifungals	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) range		N <sup>o</sup> of isolates with differences in MICs by broth microdilution and agar dilution methods within the following dilution <sup>a</sup> :							% Agreement <sup>b</sup>
	Broth microdilution	Agar dilution	< -2	-2	-1	0	+1	+2	>+2	
<i>T. rubrum</i> (n=27)										
Fluconazole	2-32	1-64	3	1	7	1	6	6	3	77.7
Itraconazole	0.03-4	0.03-4	2	6	5	1	9	3	1	88.8
Ketoconazole	0.03-4	0.03-8	4	0	1	5	12	5	0	85.2
Terbinafine	0.03-0.5	0.03-0.5	3	12	8	3	0	0	1	85.2
Griseofulvin	0.25-2	0.06-4	3	6	5	7	6	0	0	88.8
<i>T. mentagrophytes</i> (n=14)										
Fluconazole	4-16	2-64	3	1	2	1	3	1	3	57.1
Itraconazole	0.03-0.25	0.03-0.125	2	1	5	2	0	4	0	85.7
Ketoconazole	0.03-1	0.06-4	0	0	0	1	4	9	0	100
Terbinafine	0.03-0.5	0.03-0.06	3	2	5	4	0	0	0	78.5
Griseofulvin	0.25-1	0.25-1	0	0	3	3	6	2	0	100
<i>M. canis</i> (n=19)										
Fluconazole	2-32	2-64	0	2	3	3	5	2	4	78.9
Itraconazole	0.03-0.25	0.03-4	1	1	2	2	8	4	1	89.5
Ketoconazole	0.03-4	0.125-8	0	1	0	2	4	11	1	94.7
Terbinafine	0.03-1	0.03-1	3	5	5	4	1	0	1	78.9
Griseofulvin	0.06-8	0.06-8	1	0	3	10	3	1	1	89.5
Overall (n=60)										
Fluconazole	2-32	1-64	6	4	12	5	14	9	10	73.3
Itraconazole	0.03-4	0.03-4	5	8	12	5	17	11	2	88.3
Ketoconazole	0.03-4	0.03-8	4	1	1	8	20	25	1	91.6
Terbinafine	0.03-1	0.03-1	9	19	18	11	1	0	2	81.6
Griseofulvin	0.06-8	0.06-8	4	6	11	19	16	3	1	91.6

<sup>a</sup>. The differences of dilutions between the two methods were determined considering as reference the broth microdilution method.

<sup>b</sup>. The agreement between the two methods for each isolate was considered as a difference in MICs no more than 2 dilutions.

## 8. Conclusões

1. A proposição do CLSI, documento M38-A, de temperatura de 35°C e incubação de 24 até 72 h para fungos filamentosos foram alteradas em nosso trabalho para 28°C e 5 dias, permitindo uma boa leitura e interpretação de concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados sugerem que estes parâmetros devem ser melhor avaliados, na tentativa de padronização destas condições, nos testes de suscetibilidade *in vitro* para dermatófitos
2. Os agentes antifúngicos: cetoconazol, itraconazol e terbinafina mostraram maior atividade *in vitro* do que griseofulvina e fluconazol para os isolados de dermatófitos estudados.
3. A concordância entre os resultados de CIM entre os dois métodos (microdiluição em caldo e diluição em ágar) utilizados em nosso trabalho sugere que o método de diluição em ágar pode ser utilizado para testar a suscetibilidade *in vitro* para dermatófitos.

## 9. Anexos

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa intitulada “Susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de dermatófitos frente à terbinafina, griseofulvina, miconazol, cetoconazol e fluconazol. Comparação entre dois métodos”. **Você será esclarecido(a) sobre as informações a seguir no momento em que chegar ao laboratório Margarida Dobler Komma, pelo profissional que irá fazer a coleta.** No caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado (a) de forma alguma. Se você tiver dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os participantes, e em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do HC/UFG pelo telefone: 3269-8338.

#### **Pesquisadores participantes:**

Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva - Investigadora responsável

Fone: (0XX62) 3209-6127.

Crystiane Rodrigues de Araujo - Biomédica / Pesquisadora

Fones: (0XX62) 3209-6127/ 3224-3758

#### **OBJETIVO DO ESTUDO**

Serão analisados os pacientes encaminhados ao serviço de diagnóstico do IPTSP: Laboratório Margarida Dobler Komma provenientes do serviço de ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, com suspeita de infecção fúngica superficial.

Provavelmente você já deve ter ouvido falar em micose. Esta doença é causada por fungos que produzem lesões na pele e seus anexos (pêlos e unhas). Através deste estudo o paciente ou o seu responsável terá acesso aos exames laboratoriais que auxiliarão no diagnóstico e no tratamento médico.

Neste estudo, o fungo causador da doença será identificado e será também realizado um teste para verificar qual o medicamento pode ser utilizado para o tratamento da doença.

#### **CONDUÇÃO DO ESTUDO**

Você será submetido inicialmente à colheita de escamas de pele, pêlos e unhas pelo profissional responsável. O material será coletado com o auxílio de um material cortante (sem machucar a pele), raspando sua pele, couro cabeludo e unhas vigorosamente no local das lesões, sem oferecer nenhum risco para você. Não há preocupações neste sentido, todo o material a ser utilizado para colheita será devidamente limpo, esterilizado. Você não terá dor na colheita e não haverá problemas futuros. Em seguida esse material será levado ao Laboratório de Micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, onde será submetido a exame micológico direto para verificar a presença de fungo no raspado coletado. Após o isolamento e identificação do fungo presente no material coletado, o mesmo será desprezado, não sendo armazenado para estudos futuros.

Você não receberá nenhum pagamento por participar deste trabalho, e também não pagará pelos exames realizados no laboratório.

### **PARTICIPAÇÃO AUTORIZADA**

Participar deste estudo será uma decisão autorizada pelo paciente (você) ou pelo seu responsável e este poderá se recusar a participar ou desistir deste estudo a qualquer momento, sem explicar o motivo.

### **PACIENTES PARTICIPANTES DO ESTUDO**

Neste estudo serão incluídos todos os pacientes (autorizados), que apresentarem lesões de pele, pêlo e unhas sugestivas de infecções causadas por fungos, que forem encaminhados ao laboratório Margarida Dobler Komma. Neste estudo não será aplicado nenhum critério de exclusão.

### **RISCOS E DESCONFORTOS**

Não há riscos para o paciente, que não sentirá dor na colheita. Nenhum tipo de medicamento será utilizado por nós, portanto não há o que temer.

Para colheita do material, você (o paciente) não será maltratado. Se houver algum problema decorrente de sua participação neste estudo você poderá ser indenizado pelos pesquisadores responsáveis (isto provavelmente será impossível).

### **BENEFÍCIOS**

Neste estudo você poderá colher o seu material sem pagamento. Faremos o seu devido diagnóstico e faremos ainda testes para verificar qual o medicamento é eficaz para o seu tratamento. Este último dado contribuirá enormemente para a escolha de uma terapêutica adequada e eficiente.

Além disto, deve ser lembrado que o diagnóstico e tratamentos adequados servirão para evitar que outros indivíduos adquiram esta micose, já que se sabe que esta doença pode ser transmitida de indivíduo para indivíduo.

### **CONFIDENCIALIDADE**

Se você concordar com a participação, as informações clínicas e laboratoriais serão confidencialmente mantidas em sigilo o tempo todo, nem o nome ou mesmo iniciais irão constar em qualquer registro nesta pesquisa. O Comitê de Ética poderá necessitar ter acesso aos seus registros médicos para verificação dos formulários de estudo, no entanto, sua identidade será mantida em sigilo absoluto.

Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Crystiane Rodrigues de Araujo

### **CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA**

Eu, \_\_\_\_\_, RG ( \_\_\_\_\_ ), CPF ( \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ ), número de prontuário ( \_\_\_\_\_ ), abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Susceptibilidade *in vitro* de isolados clínicos de dermatófitos frente à terbinafina, griseofulvina, miconazol, cetoconazol e fluconazol. Comparação entre dois métodos”, sendo devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora CRYSTIANE RODRIGUES DE ARAUJO sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de assistência / tratamento.

Declaro ter entendido as explicações recebidas e concordo livremente em participar do estudo, podendo desistir em qualquer momento.

Nome: \_\_\_\_\_

Data:

\_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável

\_\_\_\_\_

**Assinatura da testemunha**

Declaro ter explicado em detalhes os procedimentos acima descritos no texto “**Informação ao paciente**” e a este concedida à oportunidade de fazer perguntas.

Crystiane Rodrigues de Araujo  
(PESQUISADORA RESPONSÁVEL)