

FERNANDA SIMAS CORRÊA

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE DERMATÓFITOS DO
GÊNERO *Microsporum***

CAMPINAS

2007

FERNANDA SIMAS CORRÊA

**AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE DERMATÓFITOS DO
GÊNERO *Microsporum***

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas,
área de concentração Ciências Biomédicas*

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ANGÉLICA ZANINELLI SCHREIBER

CAMPINAS

2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

C817a Corrêa, Fernanda Simas
Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos de dermatófitos do gênero *Microsporum* / Fernanda Simas Corrêa. Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Angélica Zaninelli Screiber
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Dermatófitos. 2. Antifúngicos. 3. Teste de suscetibilidade.
I. Corrêa, Angélica Zaninelli. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Evaluation of antifungal susceptibility of dermatophytes of the genus
*Microsporum***

Keywords: • Dermatophytes

- Antifungal
- Susceptibility tests

Área de concentração: Patologia Clínica

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora: Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber

Prof Dr Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

Prof Dr Ana Beatriz Alkmin Teixeira Loyola

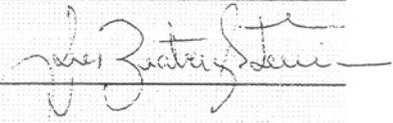
Data da defesa: 09-02-2007

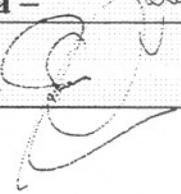
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber

Membros:

1. Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber – 

2. Profa. Dra. Ana Beatriz Alkimin Teixeira Loyola – 

3. Prof. Dr. Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho – 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/02/2007

200724946

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Angélica Zaninelli Schreiber

Membros:

1. Prof. (a). Dr. (o). Paulo Eduardo Neves Ferreira Velho

2. Prof. (a). Dr. (a). Maria Magali S. Rocha Soares

3. Prof. (a). Dr. (a). Plínio Trabasso

4. Prof (a). Dr. (a). Maria Cecília Barisson Villares

5. Prof(a). Dr. (a) Ana Beatriz Alkmin Teixeira Loyola

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09/02/2007

*... a minha família
que tanto me apoiou*

*...aos meus amigos
por estarem sempre ao meu lado,
mesmo estando longe*

AGRADECIMENTOS

À minha família que me apoiou em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber que acreditou no meu trabalho.

À Luzia Lyra e Edson Luz pela amizade, respeito e dedicação.

Aos meus colegas de Pós-graduação principalmente Paula, Rogério, Mônica, Dulce, Ângela, Adriana, Roberta, Luciana, Patrícia, Aline e Walquíria e aos docentes do DPC- FCM-UNICAMP.

À Ana Beatriz que me ajudou em todos os momentos de dificuldade, sempre paciente na tentativa de solucionar os problemas operacionais do BioCell-Tracer[®].

Às funcionárias Marcinha e Éri van do Laboratório de Epidemiologia Molecular em fungos da FCM-Unicamp, pela amizade e carinho.

Às secretárias Regina e Márcia, pela ajuda com toda a parte burocrática.

Aos meus amigos inseparáveis Wiliam, Júlio e Alessandra que me ajudaram a manter sempre o bom humor.

À CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao Adriano que compartilhou comigo todas as etapas deste trabalho sempre me apoiando de forma incondicional.

À todas as pessoas que deixo de citar, mas que indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu profundo agradecimento!

*"Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo,
qualquer um pode começar agora e
fazer um novo fim"*

(Chico Xavier)

	<i>Pág.</i>
RESUMO	<i>xvi</i>
ABSTRAT	<i>xviii</i>
1- INTRODUÇÃO	20
1.1- Características gerais dos fungos filamentosos	21
1.2- Dermatófitos	22
1.3- Dermatofitoses	24
1.3.1- Epidemiologia.....	25
1.3.2- Diagnóstico.....	26
1.3.3- Tratamento.....	26
1.4- Testes de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos ...	29
1.4.1- Técnica de microdiluição em caldo.....	29
1.4.2- Outros testes.....	30
1.4.3- Sistema automatizado “BioCell - Tracer®”.....	32
2- OBJETIVOS	37
3- MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1- Local de trabalho	40
3.2- Cepas selecionadas para o estudo	40
3.2.1- Identificação das cepas.....	40
3.3- Avaliação das condições ideais para realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo	41

3.3.1- Técnica de microdiluição em caldo.....	41
3.3.2- Crescimento dos microrganismos isolados.....	41
3.3.3- Inóculo.....	41
3.3.4- Meio de cultura.....	42
3.3.5- Antifúngicos.....	42
3.3.6- Preparação da placa de diluição.....	42
3.3.7- Execução do teste e leitura da CIM (Concentração Inibitória Mínima).....	43
3.4- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos das cepas de <i>Microsporum sp</i> pela técnica de microdiluição em caldo.....	43
3.4.1- Controle de qualidade.....	44
3.5- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos das cepas de <i>Microsporum sp</i> pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento.....	44
3.5.1- Placas de cultura.....	44
3.5.2- Inóculo.....	44
3.5.3- Antifúngicos.....	45
3.5.4- Execução do teste.....	45
3.5.5- Análise estatística dos dados.....	45
4- RESULTADOS.....	46
4.1- Condições ideais para a realização da técnica de microdiluição em caldo para <i>Microsporum spp</i>.....	47
4.2- Testes de suscetibilidade a antifúngicos – Técnica de microdiluição em caldo.....	48

4.3- Avaliação dinâmica de crescimento pelo sistema automatizado BioCell-Tracer®.....	48
4.3.1- Padronização do teste para cepas de <i>Microsporium</i> sp.....	48
4.3.2- Análise do controle de crescimento das cepas avaliadas.....	49
4.3.3- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico ciclopirox olamina no período de exposição e pós-exposição.....	52
4.3.4- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico terbinafina no período de exposição e pós-exposição.....	58
4.3.5- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico griseofulvina no período de exposição e pós-exposição.....	64
5- DISCUSSÃO.....	70
5.1- Avaliação de condições ideais para realização da técnica de microdiluição em caldo para cepas de <i>Microsporium</i> sp.....	71
5.1.1- Meio de cultura para estimulação da produção de conídios.....	71
5.1.2- Inóculo.....	71
5.1.3- Temperatura e período de incubação.....	72
5.1.4- Leitura final.....	73
5.1.5- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos.....	74
5.1.6- Cepa padrão.....	76
5.2- Avaliação dinâmica de crescimento – Sistema automatizado BioCell-Tracer®.....	76
5.2.1- Controle de crescimento.....	77
5.2.2- Padronização do inóculo.....	77

5.2.3- Preparação do teste.....	78
5.2.4- Medida de crescimento das hifas.....	79
5.2.5- Análise estatística dos dados.....	79
5.2.6- Determinação da taxa de inibição de crescimento das hifas.....	80
6- CONCLUSÃO.....	84
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
8- ANEXOS.....	94
Anexo 1- Avaliação da concentração de inóculo 1×10^4 na técnica de microdiluição em em caldo.....	95
Anexo 2- Controle de qualidade da técnica de microdiluição em caldo.....	96
Anexo 3- Informações sobre as cepas selecionadas para estudo.....	97

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Português	Inglês	
—	ATCC	American type Culture Collection
—	BCT[®]	BioCell-Tracer [®]
CIM	—	Concentração inibitória mínima
CFM	—	Concentração Fungicida Mínima
—	CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	—	dimetilsulfóxido
—	MOPS	ácido morfolinepropanesulfônico
UFC	—	Unidade formadora de colônia
ASD	—	ágar Sabouraud dextrose
ABD	—	ágar batata dextrose
LIF	—	Laboratório de Investigação em Fungos-DPC-FCM
—	PLL	Poli-L-Lisine
—	SAAMF	meio sintético de aminoácidos para fungos

		<i>Pág.</i>
Tabela 1	Dados relativos às cepas de <i>Microsporum</i> sp selecionadas para o estudo.....	40
Tabela 2	Análise das variáveis na realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos com dermatófitos do gênero <i>Microsporum</i> sp.....	47
Tabela 3	Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) obtidas para as cepas selecionadas de <i>Microsporum</i> sp (em µg/ml).....	48
Tabela 4	Padronização do teste no sistema automatizado BCT® para as cepas de <i>Microsporum</i> sp.....	48
Tabela 5	Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	52
Tabela 6	Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	53
Tabela 7	Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	54
Tabela 8	Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	55
Tabela 9	Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	56
Tabela 10	Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®.....	57
Tabela 11	Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	58

Tabela 12	Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	59
Tabela 13	Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	60
Tabela 14	Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	61
Tabela 15	Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	62
Tabela 16	Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT®.....	63
Tabela 17	Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	64
Tabela 18	Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	65
Tabela 19	Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	66
Tabela 20	Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	67
Tabela 21	Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	68
Tabela 22	Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT®.....	69

	Pág.
Figura 1 Cepa de <i>M.canis</i> : A) colônia em ágar Sabouraud: B) verso da colônia: C) observação microscópica dos macroconídios.....	24
Figura 2 Cepa de <i>M.gypseum</i> : A) colônia em ágar Sabouraud: B) verso da colônia: C) observação microscópica dos macroconídios.....	24
Figura 3 Fotografia do aparelho BioCell-tracer [®]	33
Figura 4 Monitorização de crescimento: período pré-exposição, período de exposição e período de pós-exposição.....	34
Figura 5 Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas.....	34
Figura 6 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF64.....	49
Figura 7 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF463.....	49
Figura 8 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF229.....	50
Figura 9 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF412.....	50
Figura 10 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF673.....	51
Figura 11 Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF463.....	51
Figura 12 Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,125 a 1,0 µg/ml pelo BCT [®]	52
Figura 13 Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/ml pelo BCT [®]	53
Figura 14 Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 2,0 a 16,0 µg/ml pelo BCT [®]	54
Figura 15 Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/ml pelo BCT [®]	55

Figura 16	Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,125 a 1,0 µg/ml pelo BCT [®]	56
Figura 17	Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/ml pelo BCT [®]	57
Figura 18	Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a terbinafina nas concentrações de 0,0025 a 0,02 µg/ml pelo BCT [®]	58
Figura 19	Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a terbinafina nas concentrações de 0,00125 a 0,01 µg/ml pelo BCT [®]	59
Figura 20	Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a terbinafina nas concentrações de 0,00063 a 0,005 µg/ml pelo BCT [®]	60
Figura 21	Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a terbinafina nas concentrações de 0,02 a 0,32 µg/ml pelo BCT [®]	61
Figura 22	Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a terbinafina nas concentrações de 0,0025 a 0,02 µg/ml pelo BCT [®]	62
Figura 23	Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a terbinafina nas concentrações de 0,005 a 0,04 µg/ml pelo BCT [®]	63
Figura 24	Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 20,0 µg/ml pelo BCT [®]	64
Figura 25	Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 20,0 µg/ml pelo BCT [®]	65
Figura 26	Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 20,0 µg/ml pelo BCT [®]	66
Figura 27	Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a griseofulvina nas concentrações de 1,25 a 20,0 µg/ml pelo BCT [®]	67
Figura 28	Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a griseofulvina nas concentrações de 2,5 a 32,0 µg/ml pelo BCT [®]	68
Figura 29	Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 10,0 µg/ml pelo BCT [®]	69

RESUMO

Dermatófitos do gênero *Microsporium* acometem preferencialmente pele e pêlos, sendo *M.canis* e *M.gypseum* as espécies mais isoladas em nosso meio. Antifúngicos tópicos e sistêmicos são indicados para o tratamento destas dermatofitoses, que é considerado mais difícil quando comparado ao de outros gêneros de fungos queratinofílicos. Deste modo, a determinação da suscetibilidade aos antifúngicos *in vitro* destes microrganismos é de interesse para embasamento da terapêutica empírica, avaliação de falhas terapêuticas, e testes de novos antifúngicos. No entanto, os dermatófitos não foram incluídos no documento relacionado do CLSI (M38-A, 2002). Os estudos disponíveis até o momento, utilizando conídios dos fungos, apresentam resultados muito divergentes, devido a falta de padronização e o grande número de variáveis pré-analíticas envolvidas. Em adição, uma vez que a forma de hifas predomina no tecido infectado, há controvérsias sobre o fato de se a forma conidial seria adequada para os testes. Há poucos relatos na literatura sobre avaliação dinâmica de crescimento de fungos e a taxa de inibição destes por drogas antifúngicas, mas nenhum destes realizados com dermatófitos. Este estudo se propôs a determinar condições para realização do teste de suscetibilidade pelo método de microdiluição em caldo e padronizar a avaliação de crescimento dinâmico pelo sistema BCT[®] para seis cepas do gênero *Microsporium*, determinando respectivamente CIM e CFM e taxas de inibição de crescimento frente a ciclopirox olamina, terbinafina e griseofulvina. Os resultados obtidos apontaram: ágar batata como o melhor meio de cultura para produção de conídios, inóculo de 1×10^3 células/ml, incubação de 7 dias a 28°C e leitura final considerando 100% de inibição do crescimento para o teste de microdiluição em caldo. Os resultados de CIM variaram de 1,0 a 16,0 µg/ml para ciclopirox olamina, de 0,005 a 0,004 µg/ml para terbinafina e de 2,5 a 20,0 µg/ml para griseofulvina. No Sistema Automatizado BioCell-Tracer[®] os testes foram realizados com: concentração de PLL de 0,05%; inóculo $\geq 1 \times 10^6$ conídios/ml em 5µl; incubação a 30°C por 72 a 96h; 30°C como temperatura de realização do teste e tempo total de experimento de 3 horas e 30 minutos. Todas as cepas apresentaram taxa de inibição de crescimento acima de 85% na fase de exposição à droga frente aos antifúngicos avaliados, na concentração equivalente ao resultado de CIM obtido pela técnica de microdiluição em caldo e, em pelo menos, uma diluição abaixo.

ABSTRACT

Dermatophytes of the genus *Microsporum* preferentially invade skin and hair, being *M.canis* and *M.gypseum* the most prevalent species in our routine. Topics and systemic antifungal agents are indicated for the treatment of these dermatophytoses, which is considered more difficult when compared to other genera of keratinophilic fungi. By the way, the determination of *in vitro* antifungal susceptibility of these organisms is interesting as a guide of empiric therapy, evaluation of therapeutic failures and to evaluate new antifungal agents. However, dermatophytes were not included in the CLSI document (M38-A, 2002). The studies available until now, using fungi conidia, present divergent results due to the lack of standardization and the large number of pre-analytical variables involved. In addition, once the hyphae forms predominate in infected tissues, there are controversies about if the conidial form would be adequate for the tests. There are few articles in the literature about dynamical evaluation of fungi growth and their growth inhibition rate in contact with antifungal agents, but none with dermatophytes. This study proposed the determination of conditions for broth microdilution susceptibility test and the standardization of dynamical growth evaluation by the BCT[®] system for six strains of *Microsporum* sp, determining respectively MIC and MFC and the inhibition rate after application of ciclopirox olamine, terbinafine and griseofulvin. The results pointed: potato dextrose agar as the best culture medium for conidium production, inoculum concentration of 1×10^3 conidia/ml, incubation for 7 days at 28°C and test endpoint at 100% of growth inhibition for broth microdilution test. The MIC results ranged from 1,0 to 16,0 µg/ml for ciclopirox olamine, 0,005 to 0,004 µg/ml for terbinafine and 2,5 to 20,0 µg/ml for griseofulvin. On the automatized system BioCell-Tracer[®], the tests were realized with: PLL concentration of 0,05%; inocula of $\geq 1 \times 10^6$ conidia/ml in 5µl; incubation at 30°C for 72 to 96h and also 30°C as the test temperature, 3 hours and 30 minutes as total time of experiment. All strains showed growth inhibition rate above 85% on drug exposure phase against the antifungal agents evaluated, in MIC obtained by both microdilution method and, at least, one dilution below.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Características gerais dos fungos

O termo “fungo” se refere a todos os membros do Reino *Fungi*. Embora fungos e algas tenham sido primeiramente considerados membros primitivos do reino *Vegetalia*, o aumento do conhecimento de seu ciclo de vida, fisiologia, bioquímica e genética, demonstraram que não poderiam ser classificados nem como plantas, nem como animais (KOWN-CHUNG e BENNETT, 1992). Em 1969, um pesquisador de nome Whittaker, vislumbrando o equívoco biológico que incluía os fungos no Reino *Vegetalia*, evidenciou três pontos-chaves os quais justificavam a inclusão dos fungos em um reino à parte, o Reino *Fungi*: ausência de pigmento fotossintético e celulose na parede dos fungos e a presença de glicogênio como fonte de reserva energética, em vez do amido que é observado nos vegetais superiores (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Os fungos se reproduzem através de esporos que germinam em substratos apropriados e produzem duas diferentes formas morfológicas: filamentos ou leveduras. Estas duas formas não são exclusivas – um fungo pode assumir uma ou as duas formas sob diferentes condições de crescimento, sendo classificados de fungos dimórficos (KOWN-CHUNG e BENNETT, 1992).

Fazem parte do grupo das leveduras os fungos cujas estruturas unicelulares possuem um único núcleo por célula. Estes organismos apresentam uma forma de divisão celular diferenciada, isso é, elas se dividem por brotamento simples ou brotamento-fissão, ou ainda, por divisão binária (SIDRIN E ROCHA, 2004).

Os bolores, ou fungos filamentosos, são multicelulares e constituídos de filamentos microscópicos ramificados denominados de hifas, cujo crescimento se dá de forma apical. Muitas hifas são capazes de crescerem, infinitamente, em condições favoráveis (KOWN-CHUNG e BENNETT, 1992). Qualquer fragmento hifálico pode dar origem a outra formação micelial quando destacado e colocado em meio apropriado (PUTZKE, 1998).

As hifas possuem células chamadas de estruturas de frutificação que têm a função de originar os conídios que são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada dos fungos filamentosos. Portanto, o conídio, após sua formação, fica livre para se destacar das hifas a dar origem a novo fungo (CARVALHAES, 1999).

1.2- Dermatófitos

Os dermatófitos caracterizam-se como sendo fungos hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou em extratos córneos de seres humanos e animais (SIDRN E MOREIRA, 2004). Esses fungos apresentam uma predileção ecológica no que diz respeito à sua adaptação ao meio ambiente. Dessa forma, podem ser divididos em três grandes grupos, em relação ao seu habitat, sendo classificados como geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2003).

O grupo dos dermatófitos geofílicos apresentam como característica primária a habilidade de manter sua viabilidade vital em solos geralmente ricos em resíduos de queratina humana e/ou animal. Os zoofílicos se adaptaram em relações de parasitismo em animais que mantêm um contato próximo com o solo e os dermatófitos antropofílicos parasitam apenas o homem (BRILHANTE *et al.*, 2005).

Os dermatófitos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Para sua identificação deve-se observar o aspecto macroscópico das colônias, bem como suas características microscópicas (GUPTA *et al.*, 2006; JESSUP *et al.*, 2000). Teste de perfuração do pêlo *in vitro* e prova da urease são úteis para diferenciação das espécies (LACAZ, 1998).

O gênero *Trichophyton* caracteriza-se pela presença de uma grande quantidade de microconídios, de forma arredondada ou claviforme, associada a poucos macroconídios de forma clavada, dividido por septos finos e transversais, com superfície externa lisa (PEREA *et al.*, 2001; FAVRE *et al.*, 2003). Macroscopicamente a colônia é pulverulenta, vilosa ou cerosa, com aspecto úmido, com uma variedade intensa de cores e dependendo da espécie, os pigmentos espalham-se sobre o meio de cultura (CARVALHAES, 1999).

O gênero *Epidermophyton* apresenta a característica ímpar de, quando observado em cultura, demonstrar somente a presença de macroconídios na forma clavada, com superfície lisa, divididos por finos septos e dispostos em cachos. A única espécie patogênica para seres humanos é o *Epidermophyton floccosum* (SIDRIN e MOREIRA, 2004).

O gênero *Microsporum* foi descrito pela primeira vez em 1843 por David Gruby, e caracteriza-se pela presença de estruturas de frutificação conhecidas como macroconídios: conídios grandes, geralmente de forma navicular, divididos por septos transversais de espessura variável, com uma grande quantidade de protuberâncias em sua superfície que lhes conferem um aspecto verrucoso; e microconídeos: observados em menor número, bem menores e claviformes (SIDRIN E ROCHA, 2004). Tanto os macroconídios quanto os microconídios ficam distribuídos ao longo das hifas. A maioria das espécies deste gênero são largamente distribuídas por todo o mundo, porém algumas possuem distribuição geográfica restrita (BRILHANTE *et al.*, 2005).

São numerosas as espécies de *Microsporum* envolvidas em processos infecciosos humanos e animais na dependência de características geográficas e do hospedeiro. Assim, encontramos: *M.canis*, *M.gypseum*, *M. audouinii*, *M. ferrugineum* e *M. nanum*, como as espécies mais frequentemente isoladas (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2005). Entretanto, no nosso meio, prevalecem *M.canis* e *M.gypseum* (CARVALHÃES, 1999; SIDRIN E ROCHA, 2004).

M. canis é considerada uma espécie zoofílica cosmopolita, sendo a mais comum em infecções humanas provocando tinea capitis e tinea corporis em crianças ou adultos que mantiveram contato com cães e gatos, ou com outras crianças infectadas. Em cultura, formam colônias planas, aveludadas ou cotonosas, brancas ou amareladas, com reverso amarelo-ouro ou marrom claro. Exame microscópio revela abundantes macroconídios fusiformes de parede grossa, verrucosa e extremidades afiladas. Microconídios unicelulares clavados e produzidos em número bem menor que os macroconídios (LACAZ, 1998).

O *M.gypseum* possui larga distribuição mundial, sendo abundante no solo. As colônias em ágar Sabouraud possuem superfície plana, pulverulenta e de coloração acamurçada ou marrom-canela com reverso de amarelo-clara a parda, e ocasionalmente vermelha, em algumas cepas. Possui numerosos macroconídios rugosos, de parede delgada, elipsóides, com três a nove células. Os microconídios são clavados e escassos (KRAKHECKE *et al.*, 2005).

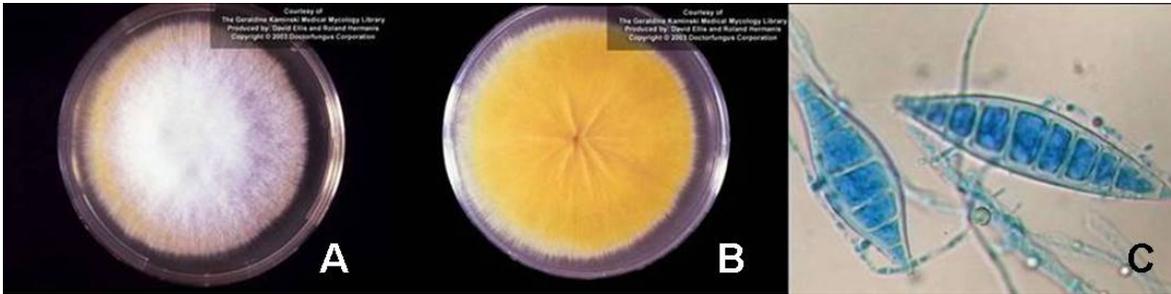


Figura 1- Cepa de *M.canis*: **A)** colônia em ágar Sabouraud: **B)** verso da colônia: **C)** observação microscópica dos macroconídios.



Figura 2- Cepa de *M.gypseum*: **A)** colônia em ágar Sabouraud: **B)** verso da colônia: **C)** observação microscópica dos macroconídios.

1.3- Dermatofitoses

A expressão dermatofitose é utilizada para designar infecções de natureza fúngica, localizadas na pele. Nos últimos anos, a literatura vem divulgando amplamente o aumento das infecções fúngicas, sendo as dermatofitoses uma das principais infecções responsáveis por esse aumento (CARVALHAES, 1999; GUPTA *et al.*, 2006).

Vários fatores são aventados no crescimento da incidência das dermatofitoses, dentre os quais podemos citar: o melhor diagnóstico laboratorial e clínico, o aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e o uso de medicações que, de uma forma ou de outra, exercem uma pressão seletiva e permitem a instalação de microrganismos convencionalmente saprófitos (SIDRIN e ROCHA, 2004).

A colonização se inicia na camada córnea da epiderme, crescendo dicotomicamente, de maneira circular e centrífuga, resultando, ao final de alguns dias, em uma lesão macroscópica denominada *tinea* ou *tinha*

(SIDRIN & MOREIRA, 1999). As *tineas* e outras micoses superficiais da pele, pêlo, unhas e mucosas são classificadas de acordo com a sua localização (LACAZ *et al.*, 1991). O contágio pode ser dar por contato direto com seres humanos, animais ou solo contaminado, ou indiretamente, por exposição a fômites contaminadas (ZAITZ *et al.* 1998).

Dermatofitoses causadas por dermatófitos do gênero *Microsporum* acometem principalmente pele e pêlo e tiveram um aumento considerável nos últimos anos, principalmente em pacientes imunodeficientes (KRAKHECKE *et al.*, 2005; GALHARDO *et al.*, 2004). Estas dermatofitoses possuem um maior número de relato de falhas terapêuticas e requerem um tempo mais longo de tratamento, quando comparada às causadas pelos outros gêneros de dermatófitos (CHAN *et al.*, 2004; ASTE *et al.*, 2004; LIPOZENIC *et al.*, 2002).

1.3.1- Epidemiologia

A distribuição das dermatofitoses varia por influência de fatores populacionais, como: sexo (mais comum no sexo masculino); idade, imunidade (maior incidência no imunocomprometido); hábitos (sociais, culturais, religiosos e econômicos); populações fechadas, migrações, fatores temporais (como sazonalidade, visto que dermatofitoses são mais comuns no verão e outono) e fatores geográficos (intensidade solar, índice pluviométrico, regime fluvial, constituição do solo, vegetação, densidade populacional humana e variedade de animais) (ZAITZ *et al.*, 1998).

Acredita-se, que uma parcela de 10-15% da população humana pode ser infectada no decorrer de sua vida (SIDRIN e ROCHA, 2004). A prevalência das espécies de dermatófitos pode variar de uma região para outra, assim como a frequência nas suas formas clínicas o que pode ser explicado por áreas onde condições geoclimáticas e sociais são extremamente diferenciadas. No Brasil, as constantes correntes migratórias proporcionam uma grande variabilidade da etiologia desta doença nas diferentes regiões (PASSOS *et al.*, 2002).

Estudos de incidência de dermatófitos no Brasil têm apontado *T. rubrum*, *M.canis* e *T. mentagrophytes*, respectivamente como as espécies mais prevalentes de dermatófitos isolados. *M.canis* contribui com uma percentagem que varia de

aproximadamente 25-30% na Região Sudeste e 5-10% na Região Nordeste (SIDRIN e ROCHA, 2004), sendo o agente mais freqüente de *tinea capitis* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. *M. gypseum* contribui com uma percentagem que varia de aproximadamente com 1-2% nas Regiões Sudeste e Nordeste (MORAES *et al.*, 2006).

Em todo o mundo, *Microsporum canis* é segundo patógeno mais freqüentemente implicado de *tinea corporis* e *tinea cruris*. Na Europa e na América do Norte, este dermatófito é o principal agente causal de *tinea capitis* (GUPTA *et al.*, 2006).

1.3.2- Diagnóstico

Para o diagnóstico das dermatofitoses, pode ser realizado o exame direto, a partir de pêlos de tinha do couro cabeludo ou escamas das outras variantes da tinha. Os pêlos devem ser colhidos com pinça, sendo os tonsurados os mais infectados. As escamas devem ser coletadas das bordas ativas das lesões e, em tinhas da unha, o material é coletado do limite entre a unha lesada e sadia, entre a lâmina e o leito ungueal (ZAITZ *et al.*, 1998; SIDRIN e MOREIRA, 1999).

Os dermatófitos mais comuns podem ser identificados por sua macromorfologia associada a micromorfologia, que é utilizada para evidenciar o arranjo das estruturas de frutificação e ornamentação, quando estas não são visíveis no processamento primário (ZAITZ *et al.*, 1998).

A cultura, embora bastante lenta, quando comparada aos outros fungos filamentosos, é necessária para isolamento e identificação dos fungos. Utiliza-se para isso o meio de Sabouraud com antibiótico (clorafenicol) e com uma substância para inibir o crescimento de fungos oportunistas (cicloheximida) (HAINER, 2003) ou o meio ágar batata dextrose que permite uma grande esporulação (JESSUP *et al.*, 2000).

1.3.3- Tratamento

A terapêutica das dermatofitoses pode ser: tópica, sistêmica ou combinada. Os antifúngicos administrados por via oral são, muitas vezes, tóxicos. Desta maneira recomenda-se o tratamento tópico, porém, em casos de lesões extensas ou que afetem unhas

ou couro cabeludo, é preferida a terapia sistêmica até que a cura total seja obtida (DEGREEF, 1994) (FAVRE, 2003) (KARAKA, 2004).

Os antifúngicos tópicos como os compostos azólicos, a terbinafina, e a ciclopirox olamina, são aplicados de 1 a 2 vezes ao dia, e o extrato córneo age como reservatório permitindo a penetração gradual da droga na pele por período prolongado. É importante ressaltar que a facilidade e o número de aplicações são fatores importantes para o sucesso do tratamento (SOARES, 1998).

A griseofulvina é um antifúngico sistêmico, administrado por via oral, e indicado exclusivamente para infecções causadas por dermatófitos. Este agente antimicótico foi descoberto a partir do *Penicillium griseofulvum* e o seu mecanismo de ação ocorre através da sua penetração na célula fúngica, e assim consegue interagir com os microtúbulos desfazendo o fuso mitótico, provocando uma inibição do processo de mitose e, por conseguinte na multiplicação do microrganismo (SIDRIN e ROCHA, 2004). Concentrações de aproximadamente 12-25 µg/ml são mantidas na pele durante administração a longo prazo, enquanto os níveis séricos permanecem em níveis de 1-2 µg/ml (GRISEOFULVINA- oral).

Os derivados azólicos compreendem o itraconazol, cetonazol, fluconazol, miconazol, entre outros, que fazem parte de um grupo de agentes sintéticos, com estrutura química semelhante. Alguns podem ser administrados via tópica e oral. São fungistáticos e sua ação se dá pela inibição da biossíntese do ergosterol com consequente alteração da permeabilidade da membrana, e inibição de enzimas relacionadas ao metabolismo oxidativo, provocando o acúmulo de peróxidos, que é tóxico para o fungo (KRAKHECKE *et al.*, 2005).

A terbinafina é uma alilamina sintética, utilizada por via tópica ou oral e seu mecanismo de ação está baseado na inibição da enzima esqualeno-epoxidase que, por conseguinte, bloqueia a biossíntese do ergosterol, atuando independente do citocromo P-450 (SIDRIN e ROCHA, 2004). Além da deficiência do ergosterol, resulta também no acúmulo de esqualeno, que interfere nas funções da membrana e na síntese da parede celular. A distribuição para pele em particular, se dá rápida e extensivamente: as altas concentrações encontradas no extrato córneo e nos tecidos adjacentes refletem

o alto índice de lipofilia da droga. Esta propriedade implica em que as concentrações da droga na pele permaneçam altas por até três semanas após o tratamento preconizado (FLEECE *et al.*, 2004; SOARES, 1998; LIPOZENIC *et al.*, 2002). Uma dose oral única de 250 mg de terbinafina proporciona uma média de concentrações plasmáticas máximas de 1,3 µg/ml, 1,5 horas após a administração (TERBINAFINA - oral).

A ciclopirox olamina: é uma hidroxipiridona cuja estrutura não está relacionada a qualquer outro antifúngico. Ao contrário de outros antifúngicos não interfere na biossíntese de ergosterol, possuindo vários mecanismos de ação. Em primeiro lugar interfere com o aumento e acúmulo de produtos necessários a síntese da membrana celular; em altas concentrações, altera a permeabilidade celular e pode ocorrer inibição da atividade respiratória. Também tem atividade antiinflamatória e inibe a síntese de prostaglandinas e leucotrienos. Penetra rapidamente através da epiderme até a derme, mas menos que 1,5% é absorvido na circulação sistêmica (SOARES, 1998).

Para o tratamento de *tinea capitis* causada por *Trichophyton* sp, a terbinafina é mais eficiente, porém, quando o agente causal é o *Microsporum* sp, o tratamento é mais difícil, sendo a griseofulvina o antifúngico recomendado (FLEECE *et al.*, 2004; GUPTA, *et al.* 2006). Para o tratamento de *tinea pedis* a terbinafina é mais eficaz que a griseofulvina, e requer um tempo menor de tratamento, além de ter um custo-benefício maior (GUPTA *et al.*, 2006; BELL-SYER *et al.*, 2002).

Quando tratadas com itraconazol, a maioria das dermatofitoses causadas por *Microsporum* sp requerem um período maior de tratamento (FAVRE *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2006), sendo este antifúngico o tratamento de escolha apenas para onicomicoses (GUPTA *et al.*, 2006).

A duração do tratamento depende do local da micose e do agente causal. As formas mais benignas de *tinea corporis* e de *tinea capitis* requerem de 3 a 5 semanas. As formas localizadas nas regiões intertriginosas: *tinea cruris* e principalmente *tinea pedis*, podem levar meses para responder ao tratamento e a *tinea unguium*, localizada nas unhas, pode levar mais de um ano. Nestes casos concorrem fatores extras como perturbações da irrigação sanguínea ungueal, que impedem a concentração do antifúngico em nível satisfatório (CARVALHARES,1999).

1.4- Testes de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos

Nas duas últimas décadas a incidência de infecções causadas por dermatófitos e outros fungos, tem aumentado consideravelmente, e um dos agravantes para esse quadro é a aids, uma vez que em pacientes imunodeficientes os dermatófitos podem ultrapassar a camada queratinizada da pele e anexos e causar infecções subcutâneas ou sistêmicas (MEZZARI, 1998). Com o aumento da variedade de drogas disponíveis para o tratamento das dermatofitoses, a necessidade de um método de referência para o teste de suscetibilidade aos agentes antifúngicos tem se tornado necessária e poderia permitir a determinação da terapia apropriada para cada infecção causada por dermatófitos (JESSUP *et al.*, 2000; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001; ALIÓ *et al.*, 2005).

Existem vários estudos que buscam estabelecer uma metodologia de referência para testes de suscetibilidade para dermatófitos (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002; JESSUP *et al.*, 2000; ALIÓ *et al.*, 2005), entretanto, dentre as espécies de dermatófitos avaliadas, o gênero *Microsporum* sempre está em menor número. Existem poucos estudos específicos de avaliação da suscetibilidade a antifúngicos de *Microsporum* spp. (KRAKHECKE *et al.*, 2005; BRILHANTE *et al.*, 2005).

Devido ao crescente número de dermatofitoses causadas pelo gênero *Microsporum*, que são mais difíceis de serem tratadas e possuem um maior número de relatos de falhas terapêuticas, quando comparadas às causadas por outros gêneros de dermatófitos (LIPOZENIC *et al.*, 2002; ASTE *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2006), se fazem necessários mais estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos para este gênero.

1.4.1- Técnica de Microdiluição em caldo

Recentemente, o CLSI (Clinical and Laboratorial Standard Institute) lançou o documento M38-A padronizando testes de suscetibilidade para fungos filamentosos que causam infecções invasivas, tais como espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* e da forma miceliana de *Sporothrix schenckii*, representando o primeiro passo para o estabelecimento de uma técnica confiável, padronizada e rotineiramente viável. Contudo, os dermatófitos não foram incluídos neste documento.

A técnica de microdiluição em caldo tem como princípio, expor um inóculo definido do microrganismo em estudo a conhecidas concentrações da droga a ser avaliada, em condições que suportem o crescimento do microrganismo e pouco, ou nada, interfiram com a atuação da droga. A leitura final dos testes permite definir a menor concentração da droga que inibe o crescimento visível (concentração inibitória mínima – CIM) ou que mata o microrganismo problema (concentração fungicida mínima – CFM) (SIDRIN e MOREIRA, 1999).

A determinação da CIM e da CFM seria importante para os pacientes com infecção por dermatófitos, tanto para orientação ao tratamento, geralmente difícil e freqüentemente sem sucesso, como para a avaliação de novos agentes antifúngicos (DRUTZ, 1987).

Existem vários estudos que buscam uma padronização do teste de suscetibilidade a antifúngicos para dermatófitos (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002; JESSUP *et al.*, 2000; ALIÓ *et al.*, 2005), contudo, os resultados dos testes são bastante discrepantes. Existem algumas variáveis pré-analíticas que podem interferir na reprodutibilidade dos testes como: meio de cultura para estimulação da produção de conídios, temperatura e período de incubação das placas, concentração e tipo de inóculo utilizados nos testes e critérios de leitura. Estas variáveis são fatores em potencial que poderiam explicar os diferentes resultados obtidos em testes de suscetibilidade pelos pesquisadores.

O gênero *Microsporum* produz dois tipos de conídios: macroconídios e microconídios, cujos tamanhos são consideravelmente diferentes (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002). Não existe registro na literatura sobre trabalhos que descrevem o uso de somente macroconídios ou microconídios, ou mesmo os dois tipos de conídios juntos em testes de suscetibilidade a antifúngicos.

1.4.2- Outros testes

Uma outra maneira de realizar testes de suscetibilidade a antifúngicos seria através da metodologia de difusão em disco. Este teste mostrou bons resultados com dermatófitos, mostrando uma ampla zona de inibição em 7 dias e teve resultados

concordantes com a CIM descrita na literatura em trabalhos realizados por ESTEBAN *et al.* 2005 (frente a clotrimazol, itraconazol e terbinafina), VENUGOPAL *et al.*, 1994 (frente a terbinafina) e MACURA *et al.*, 1993 (frente a griseofulvina, clotrimazol, miconazole cetoconazol).

Um outro método, o colorimétrico de placas antifúngicas para leveduras “Sensititre YeastOne”, foi avaliado para dermatófitos com resultados concordando com os valores obtidos utilizando a metodologia padronizada pelo CLSI em 81,6% para Anfotericina B, 87,7% para Itraconazol e 67,3% para Fluconazol, (PUJOL *et al.*, 2002).

A metodologia de bioluminescência em ATP foi avaliada para determinar a suscetibilidade de dermatófitos frente a Fluconazol e os resultados foram parecidos com os obtidos pela metodologia de microdiluição em caldo. Esta metodologia de bioluminescência também pode ser utilizada para o monitoramento do crescimento fúngico em meios de cultura líquidos (YOSHIDA *et al.*, 1997)

O teste de suscetibilidade utilizando ágar semi-sólido emprega tubos contendo 0,5% ágar semi-sólido de infusão de coração. Comparado com o CLSI M38-P, o método demonstrou excelente concordância entre os resultados. A limitação deste estudo foi em estabelecer qual o tipo ideal de inóculo a ser preparado, somente contendo conídios ou mistura de hifas com conídios. No entanto, não foram observadas variações dos resultados utilizando inóculos diferentes (KUZUCU *et al.*, 2004).

Os testes comerciais como E-Test, difusão em disco e “Sensititre YeastOne”, poderiam ser encarados como ferramentas para auxiliar na adaptação da metodologia do CLSI para uso em laboratório clínico. Sua relevância clínica deveria ser avaliada (ESPINHEL-INGROFF *et al.*, 2003).

Ainda há muitas controvérsias em torno da avaliação de suscetibilidade a antifúngicos, para fungos filamentosos. Devido às características morfológicas destes microrganismos, no ambiente e nos pacientes, há questionamentos sobre se a forma conidial, seria a mais adequada para esta avaliação. Os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos e as hifas são a forma predominante e, praticamente exclusiva em tecidos de indivíduos infectados, a relevância dos dados obtidos dos testes de crescimento conidial, em comparação com aqueles obtidos em testes de crescimento com hifas permanece uma pergunta sem resposta (GUARRO *et al.*, 1997).

1.4.3- Sistema automatizado “Biocell-Tracer®”

A determinação da CIM para fungos filamentosos poderia ser mais adequada com a utilização de um método que permitisse a quantificação do crescimento das hifas (GUARRO, 1997; BEZJAK, 1985; MATSUOKA, 1990; YAMADA, 1992). O sistema automatizado “BCT®”, para análise de crescimento de hifas *in vitro*, poderia ser uma alternativa para o estudo da atividade de drogas antifúngicas. Através do acompanhamento do crescimento de hifas, é possível mimetizar uma situação de crescimento bem semelhante à encontrada no organismo humano. O sistema automatizado BCT® propõe a análise do estágio de emergência da hifa, bem como os estágios subsequentes, para determinação da atividade antifúngica. O método propõe a intensificação do acompanhamento do crescimento, conjuntamente com registros e gráficos que são automaticamente gerados para melhor avaliação (OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995; ANSHENG *et al.*, 1999; IIDA *et al.*, 1999).

O sistema automatizado BCT® (Figura 3) é constituído por uma base para as placas plásticas estéreis de cultura 35 x 10 mm, um microscópio (Olympus; IMT2), uma câmara filmadora CCD (Charge Coupled Device) que capta a imagem das placas e as envia para um digitalizador de imagem (Flovel), um microcomputador que monitora todo o desenvolvimento do experimento e um televisor. A imagem da hifa, formada na placa de cultura, é visualizada ao microscópio e filmada pela câmara que envia a imagem para o televisor e o digitalizador de imagem que as envia para o microcomputador, onde é possível observar o crescimento da estrutura em detalhes. A resolução da imagem tem alta definição e precisão analítica de $0,01 \mu\text{m}/\text{min}^{-1}$ (OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995).



Figura 3- Fotografia do aparelho BioCell-Tracer[®]. O equipamento é constituído de um microscópio com base para as placas, uma câmara de vídeo, um televisor com aparelho de vídeo, um digitalizador de imagens e um microcomputador. No detalhe da foto, a imagem da placa que irá ser analisada dentro da câmara do equipamento.

O sistema possui ainda uma câmara de incubação onde a temperatura interna pode ser ajustada de 10°C a 50°C. A velocidade em que pode ser acompanhado o crescimento das extremidades das hifas no sistema BCT[®] varia de 0,5 a 20 $\mu\text{m}/\text{min}$.

Com o auxílio do computador é possível escolher as melhores hifas a serem analisadas, bem como monitorar seu crescimento através do contraste de cor. Ao microscópio, as hifas adquirem coloração azulada e a placa, com o meio de cultura, adquire coloração branca. O equipamento mede o deslocamento da coloração azul (hifa) sobre a coloração branca (placa).

Depois de observar o crescimento uniforme da hifa, é adicionada a concentração da droga a ser avaliada. O aparelho BCT[®] mede, automaticamente, o crescimento de cada uma das hifas selecionadas para o teste. No final, o aparelho gera os valores de crescimento das hifas avaliadas e constrói gráficos (MATSUOKA *et al.*, 1990; YAMADA *et al.*, 1992; OH *et al.*, 1993^{a, b}; OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995; IIDA *et al.*, 1999; ANSHENG *et al.*, 1999).

O cálculo da taxa de crescimento da hifa pelo modelo BCT[®] é automático e consiste na subtração dos tempos final (t_1) menos inicial (t_0), também a cada 10 min. [$L_1 = (t_1 - t_0)$, $L_2 = (t_2 - t_1)$,...] (Figura 4).

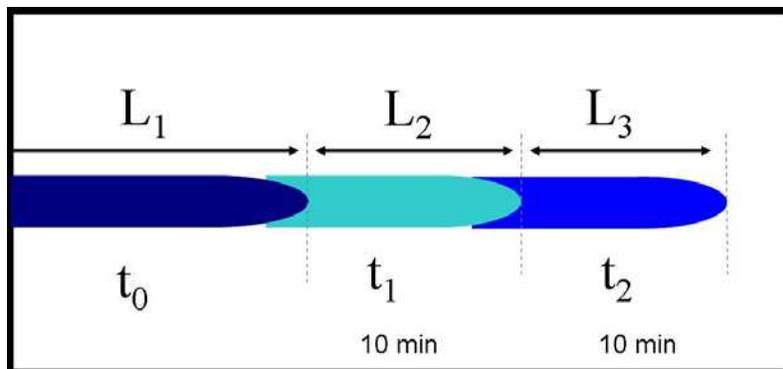


Figura 4- Elementos utilizados para o cálculo do crescimento de hifas (V): valor do crescimento da hifa a cada 10 minutos, L: valor do crescimento da hifa; t_0 : tempo inicial dos 10 minutos, t_1 : tempo final dos 10 minutos.

As informações obtidas geram gráficos, que podem ser analisados sozinhos ou em conjunto com outros gerados por análises posteriores (OH *et al.*, 1995; ANSHENG *et al.*, 1999). A figura 5 exemplifica o crescimento de uma única hifa:

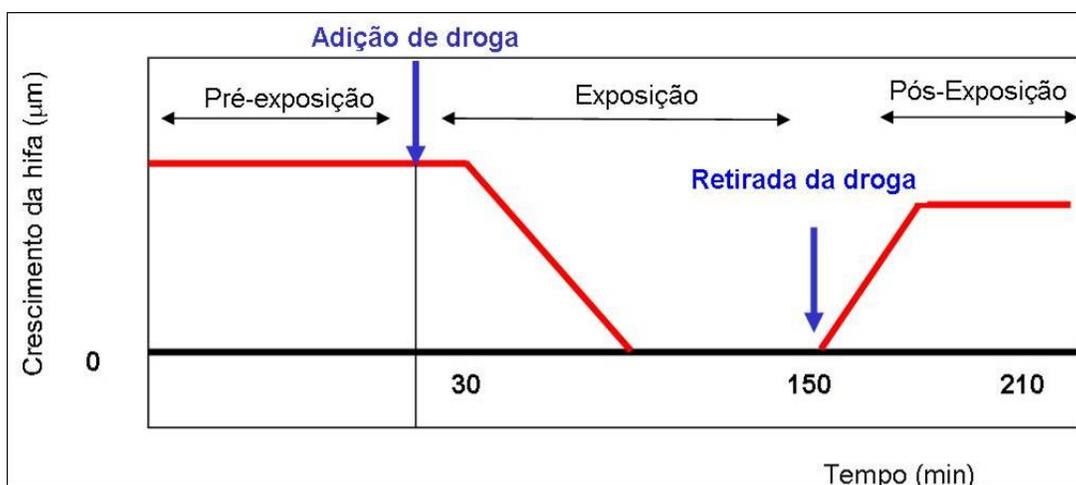


Figura 5- Monitorização de crescimento: período pré-exposição: crescimento da hifa sem a adição da droga a ser testada. Período de exposição: exposição da hifa à droga em determinada concentração. Período de pós-exposição: crescimento da hifa após a retirada da droga a ser avaliada.

A vantagem de utilizar o sistema BCT[®] está nas informações geradas pelas análises. Os testes podem ser realizados com produtos líquidos ou gasosos. Este sistema tem uma aplicação fundamental em pesquisa ao que se refere à determinação da CIM e determinação da atividade fungicida e fungistática ($V_{pós}/V_{pré} \times 100 < 0$ e $V_{pós}/V_{pré} \times 100 \geq 0$). Uma desvantagem do sistema é que somente uma concentração de antifúngico pode ser testada por cepa em cada teste (MATSUOKA *et al.*, 1990; OH *et al.*, 1993^a; YAMADA *et al.*, 1992).

Com o equipamento BCT[®], é possível realizar um experimento onde o antifúngico age diretamente sobre as hifas de *Microsporum* sp em tempo real, mimetizando o que acontece quando são aplicados antifúngicos tópicos diretamente sobre a lesão de dermatofitose.

Uma vez que a hifa é predominante e, praticamente, a forma exclusiva em tecidos de indivíduos infectados, a relevância dos dados obtidos dos testes com suspensão de inóculo contendo conídios, em comparação com aqueles obtidos em testes de crescimento com hifas, permanece como uma pergunta ainda sem resposta. Testes de suscetibilidade comparativos, entre inóculos de conídios e hifas, seriam de grande interesse, principalmente, se realizados para acompanhamento de tratamento.

Não há relatos na literatura sobre a padronização da utilização do sistema automático para monitoramento de crescimento BCT[®] para cepas de *Microsporum* sp. Existem poucos estudos publicados que utilizaram esta metodologia para cepas de *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp e *Candida* sp (OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995; ANSHENG *et al.*, 1999; IIDA *et al.*, 1999, MOREIRA, 2003, TEIXEIRA *et al.*, 2005, TEIXEIRA, 2006), visto que existem poucos equipamentos disponíveis no mundo.

Devido ao crescente número de dermatofitoses causadas pelo gênero *Microsporum*, que são mais difíceis de serem tratadas e possuem um maior número de relatos de falhas terapêuticas, quando comparadas às causadas por outros gêneros de dermatófitos (LIPOZENIC *et al.*, 2002; ASTE *et al.*, 2004; CHAN *et al.*, 2004; GUPTA *et al.*, 2006), se fazem necessários mais estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* a antifúngicos para este gênero.

São poucos os artigos publicados que buscam uma padronização para realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos especificamente para *Microsporum* sp (BRILHANTE *et al.*, 2005; KRAKHECKE *et al.*, 2005). Assim, seria de grande utilidade a escolha de uma metodologia que levasse em consideração as características deste gênero e que tivesse um alto grau de reprodutibilidade.

2- OBJETIVOS

- Determinar condições para realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo para as cepas de *Microsporum* sp, testando variáveis como: meio de cultura para estimulação da produção de conídios, tamanho e tipo de inóculo, temperatura e tempo de incubação e critérios de leitura.
- Avaliar a suscetibilidade das cepas de *Microsporum* sp selecionadas, frente aos antifúngicos: terbinafina, ciclopirox olamina e griseofulvina, utilizando o teste de microdiluição em caldo
- Padronizar a técnica de avaliação dinâmica de crescimento, de cepas de *Microsporum* sp pelo sistema automatizado BCT[®].
- Avaliar a suscetibilidade das cepas de *Microsporum* sp selecionadas, frente aos antifúngicos: terbinafina, ciclopirox olamina e griseofulvina, utilizando o Sistema Automatizado BCT[®].

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Local de trabalho

O trabalho experimental foi desenvolvido no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia da Divisão de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da Unicamp e no Laboratório de Epidemiologia Molecular e Fungos, da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.2- Cepas selecionadas para o estudo

Foram selecionadas 6 cepas de dermatófitos do gênero *Microsporum* (Tabela 1), pertencentes à micoteca do Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, previamente isoladas a partir dos exames de rotina encaminhados ao mesmo laboratório. As cepas foram conservadas em frasco tipo penicilina, com tampa de borracha e lacre, contendo água destilada estéril, à temperatura ambiente.

Tabela 1- Dados relativos às cepas de *Microsporum* sp selecionadas para o estudo.

Cepa	Identificação	Espécime clínico	Exame direto
LIF 343	<i>M. canis</i>	Raspado de couro cabeludo	Esporos ectotrix
LIF 673	<i>M. canis</i>	Raspado de pele	Filamentos
LIF 64	<i>M. gypseum</i>	Raspado de unha	Filamentos
LIF 229	<i>M. gypseum</i>	Raspado de pele	Filamentos
LIF 463	<i>M. gypseum</i>	Raspado de unha	Filamentos
LIF 412	<i>M. gypseum</i>	Raspado de couro cabeludo	Material insuficiente

3.2.1- Identificação das cepas

Todas as cepas foram identificadas, de acordo com metodologia clássica, desenvolvida no Setor de Micologia do Laboratório de Microbiologia do HC-UNICAMP, utilizando a combinação de características macroscópicas e micromorfológicas com realização de exame direto da cultura (LACAZ *et al.*, 1991), (TEIXEIRA, 2001).

3.3- Avaliação de condições ideais para realização do teste suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo

3.3.1- Técnica de microdiluição em caldo

Foi realizada de acordo com o documento M38-A 2002, do CLSI.

3.3.2- Crescimento dos microrganismos isolados

As cepas foram repicadas em tubos com ágar Sabouraud Dextrose (ASD), à temperatura ambiente. Todas as amostras foram repicadas novamente em meio impedinte de pleomorfismo, composto por 30g de peptona, 18g de ágar e 1000ml de água destilada estéril. Em seguida foram repicadas em dois diferentes meios de cultura: Ágar Sabouraud Dextrose e Ágar Batata Dextrose (ABD), para determinação da eficácia na estimulação da produção de conídios, necessários para a execução dos testes de suscetibilidade por microdiluição em caldo.

3.3.3- Inóculo

Após o crescimento de aproximadamente 15 dias à temperatura ambiente, em tubos contendo meio de cultura, o inóculo foi preparado adicionando-se 5ml de salina 0,85%, ou água destilada estéril, ao tubo até encobrir toda a colônia. Os esporos foram suavemente suspensos com a ajuda de uma alça em anel e foram transferidos para um tubo estéril onde ficaram por 5 minutos, com o objetivo de se obter a separação dos macroconídios, que por serem mais pesados tendem a sedimentar no fundo do tubo, dos microconídios que, por serem mais leves, ficam no sobrenadante. Três tipos de inóculos foram avaliados: apenas microconídios, apenas macroconídios e ambos.

A partir desta suspensão, foi preparada uma diluição de 1/50 em água destilada estéril e, em seguida, foi realizada a contagem dos esporos no retículo central da câmara de Thoma, com o objetivo de obter dois diferentes tamanhos de inóculo final: 1×10^3 UFC/ml e 1×10^4 UFC/ml.

3.3.4- Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI 1640 (R8755) Sigma Chemical Co., com L-glutamina e glicose sem bicarbonato de sódio tamponado com 0,165 M de MOPS (Sigma Chemical Co). O pH foi ajustado para 7.0 com NaOH 1N e a esterilização da solução foi por filtração a vácuo, em filtro 0,45 µm (RSLHV02515) Millex-HV, Millipore, França. O meio pronto foi mantido sob refrigeração por até 15 dias.

3.3.5- Antifúngicos

Foram avaliados os antifúngicos de uso corrente: terbinafina (DEG - Importadora de Produtos Químicos), ciclopirox olamina (Stiefel) e griseofulvina (Sigma).

3.3.6- Preparação da placa de diluição

Cada droga foi pesada e a concentração ajustada de acordo a presente concentração na formulação e com as concentrações que se desejou obter para a realização do teste. A solução estoque de cada uma das drogas foi utilizada para realizar a diluição prévia das drogas nas diferentes concentrações avaliadas. As concentrações utilizadas foram: 327,68 a 0,0006 µg/ml para terbinafina, 1000 a 0,002 µg/ml para ciclopirox olamina e 1280 a 0,04 µg/ml para griseofulvina.

Foram adicionados 200 µl da solução estoque de cada droga na 1ª fileira vertical da placa de diluição, seguidos de, 100 µl de DMSO da 2ª à 12ª fileira. Procedeu-se então à diluição ao dobro, transferindo-se 100 µl da 1ª fileira para a 2ª; da 2ª para a 3ª e assim por diante até a 10ª fileira. Na 11ª não foi adicionado o inóculo, por se tratar do controle negativo e na 12ª fileira, por se tratar do controle positivo de crescimento, não foi adicionada a droga. Finalmente, foram acrescentados 900 µl de água destilada estéril, em todas as fileiras. O volume final em cada tubo da placa de diluição foi de 1 ml.

3.3.7- Execução do teste e leitura da CIM

Foi realizado em placas de microtitulação, com fundo em “U” (estéril), para onde foram transferidos todos os componentes preparados anteriormente: 20 µl de inóculo, 20 µl de suspensão da droga nas diferentes concentrações e mais 160 µl do meio de RPMI 1640. O volume final na placa de microtitulação foi de 200 µl. As placas foram incubadas em 2 diferentes temperaturas: 28°C e 35°C.

A leitura foi realizada diariamente a partir do terceiro dia até o sétimo dia de incubação, comparando-se o crescimento de cada cavidade com a obtida no controle positivo (fileira 12) (CLSI, M38-A, 2002). Foram realizadas duas leituras finais, considerando 100% e 80% de inibição. Todos os testes foram realizados em duplicata, a fim de se garantir a confiabilidade dos dados obtidos na leitura da CIM.

Todas as cavidades da placa de microtitulação que não mostraram crescimento no teste de microdiluição em caldo tiveram uma alíquota de seu conteúdo semeada em placas de ASD. Após incubação em 28°C por 7 dias, e, tomando-se como base o crescimento do subcultivo do controle, foi realizada a leitura do teste. Foi considerada CFM a menor concentração da droga que impedir visível crescimento do subcultivo (SOARES, 1998).

3.4- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos das cepas de *Microsporium* sp pela técnica de microdiluição em caldo

Foi realizada de acordo com o CLSI M38-A, no entanto, as cepas foram repicadas em ABD, a concentração de inóculo utilizada foi de 1×10^3 UFC/ml, apenas de microconídios, as placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias e a leitura final foi realizada levando-se em consideração 100% de inibição de crescimento fúngico visível. Os demais procedimentos foram idênticos aos descritos nos itens 3.3.3 a 3.3.7.

3.4.1- Controle de Qualidade

Na tentativa de se estabelecer um padrão para validação dos testes, foram utilizadas as cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida krusei* ATCC 6852, *Candida albicans* ATCC 76615 e *Candida albicans* ATCC 90028.

3.5- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos das cepas de *Microsporium* sp pela técnica de avaliação dinâmica de crescimento

O Sistema Automatizado BCT[®] foi doado pela JICA - Japan International Cooperative Agency, durante o programa de cooperação entre o Brasil e o Japão na vigência do “Projeto de Pesquisa Clínica e Tratamento Médico” - Unicamp, desenvolvido em conjunto com a FCM-Unicamp, e o Research Center for Pathogenic Fungi, Chiba University, Japão e encontra-se alocado no Laboratório de Doenças Transmissíveis, da Disciplina de Moléstias Infecciosas da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.5.1- Placas de cultura

Foram utilizadas placas de cultura estéreis de 35 x 10 mm, onde foram distribuídos 2ml da solução de poli-L-Lisina (PLL) a 0,05%. Após 1 hora, a solução foi aspirada, e as placas permaneceram abertas por 15 minutos em luz ultravioleta para secagem (ANSHENG,1999).

3.5.2- Inóculo

O inóculo de conídios foi depositado no centro das placas que permaneceram fechadas por 60 minutos, sendo depois lavadas com 1ml de água destilada estéril. Em seguida foi adicionado 2ml de RPMI em cada placa e as mesmas foram incubadas a 30°C por 72 horas. Após este período, uma placa foi transferida para a câmara do equipamento, onde 10 a 20 hifas foram selecionadas para avaliação do crescimento (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

3.5.3- Antifúngicos

As concentrações de antifúngicos utilizadas tiveram como ponto de partida o resultado da CIM obtida no teste de microdiluição em caldo. A partir da CIM, as concentrações foram reduzidas até a obtenção de uma taxa de inibição de crescimento fúngico inferior a 50%.

3.5.4- Execução do teste

Primeiramente foi realizado um controle do crescimento fúngico com apenas o RPMI-1640 por 30 minutos (período de pré-exposição). Após este período (0-30 minutos), foi retirado o RPMI e adicionados 2ml do antifúngico, os quais foram retirados após 120 minutos (período de exposição) e substituídos por 2ml de RPMI 1640. O crescimento das hifas foi acompanhado por mais 60 min (período de pós-exposição). O tempo total de experimento foi de 210 minutos, sendo de 0 a 30 min de período de pré-exposição, de 30 a 150 minutos de período de exposição à droga e de 150 a 210 minutos de período de pós-exposição à droga.

3.5.5- Análise estatística dos dados

A avaliação matemática, ou estatística, dos dados fornecidos por este equipamento, também foram objeto de estudo e bastante trabalho. Os cálculos da média e mediana de todos dados gerados pelo BCT[®] foram realizados através do sistema de análise de dados do Microsoft Excel, seguindo a orientação dada pelo Serviço de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas.

4- RESULTADOS

4.1- Condições ideais para a realização da técnica de microdiluição em caldo para *Microsporum spp.*

Tabela 2- Análise das variáveis na realização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos pela Técnica de Microdiluição em Caldo com dermatófitos do gênero *Microsporum sp*

Cepas	Variáveis analisadas														
	Meio para estimulação de conídios		Tipo de inóculo			Tamanho do Inóculo		Temperatura de incubação (°C)		Tempo de incubação (dias)				Leitura final (%)	
	ABD	ASD	micro	macro	ambos	103	104	28°	35°	4	5	6	7	80	100
LIF 64	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	+	++	0	++
LIF 229	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	++	++	0	++
LIF 412	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	++	++	0	++
LIF 463	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	+	++	0	++
LIF 343	++	0	++	0	0	++	0	++	0	0	0	+	++	0	++
LIF 673	++	+	++	0	+	++	0	++	0	0	0	+	++	0	++

Legenda: 0: inadequado, +: aceitável, ++: adequado, ABD: ágar batata dextrose, ASD: ágar Sabouraud dextrose

4.2- Testes de suscetibilidade a antifúngicos – Técnica de microdiluição em caldo

Tabela 3- Resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) obtidas para as cepas de *Microsporium* (em µg/ml) pela Técnica de Microdiluição em Caldo.

Cepas	Antifúngicos					
	Ciclopirox olamina		Griseofulvina		Terbinafina	
	CIM 100 %	CFM	CIM 100 %	CFM	CIM 100 %	CFM
LIF 64 (<i>M. gypseum</i>)	1,0	1,0	20,0	20,0	0,02	0,02
LIF 229 (<i>M. gypseum</i>)	16,0	16,0	10,0	10,0	0,005	0,005
LIF 412 (<i>M. gypseum</i>)	2,0	2,0	20,0	20,0	0,08	0,32
LIF 463 (<i>M. gypseum</i>)	2,0	2,0	20,0	20,0	0,005	0,005
LIF 343 (<i>M. canis</i>)	2,0	2,0	10,0	10,0	0,04	0,04
LIF 673 (<i>M. canis</i>)	1,0	1,0	2,5	2,5	0,02	0,04

4.3- Avaliação dinâmica de crescimento pelo sistema automatizado BioCell-Tracer®

4.3.1- Padronização do teste para cepas de *Microsporium* sp

Tabela 4- Padronização do teste no sistema automatizado BCT® para as cepas de *Microsporium* sp

Parâmetros avaliados	Parâmetros obtidos para os microrganismos	
	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>
Concentração ideal de Poli-L-Lisina	0,05 %	0,05 %
Concentração do inóculo	≥106conídios	≥106 conídios
Quantidade de inóculo	5 µl	5 µl
Temperatura de incubação	30oC	30oC
Tempo de incubação prévia com RPMI	72 h a 96h	72 h a 96h
Temperatura de execução do teste	30oC	30 oC
Intervalos de leitura	10 min	10 min
Duração do teste	3h e 30 min	3h e 30 min
Medida para avaliação estatística dos resultados	mediana	mediana

4.3.2- Análise do controle de crescimento das cepas avaliadas

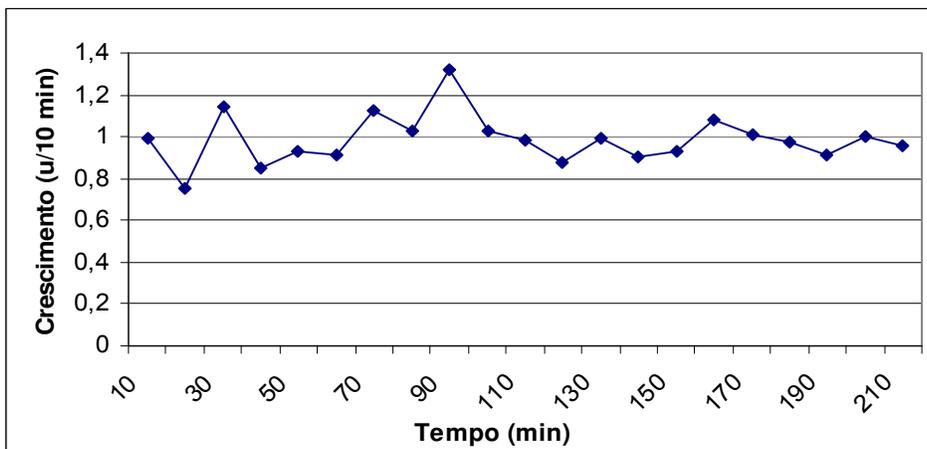


Figura 6- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF64

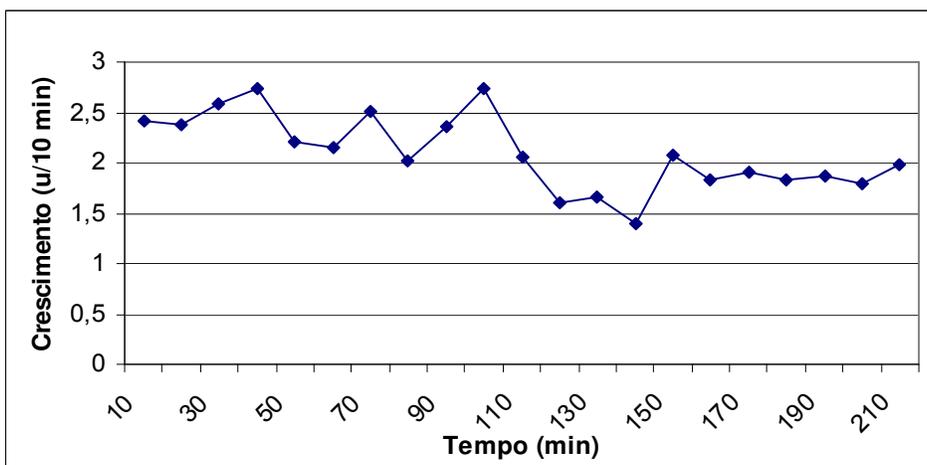


Figura 7- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF463

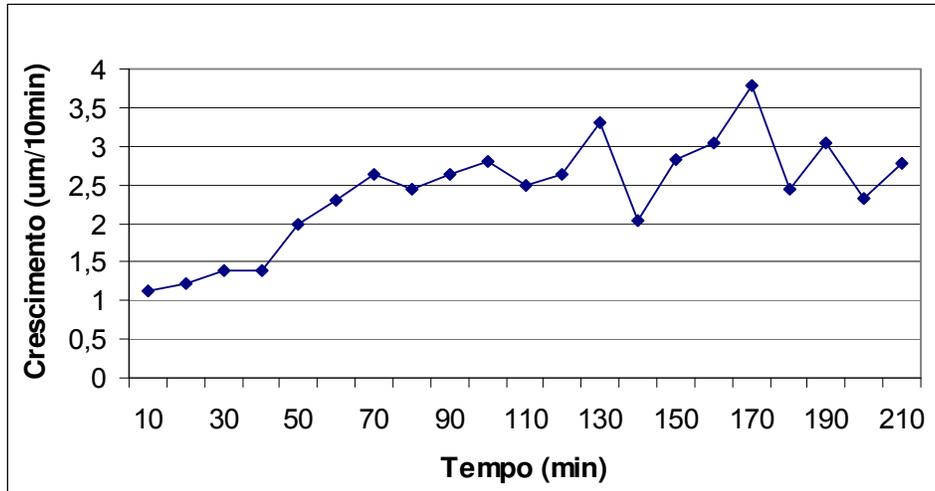


Figura 8- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF229

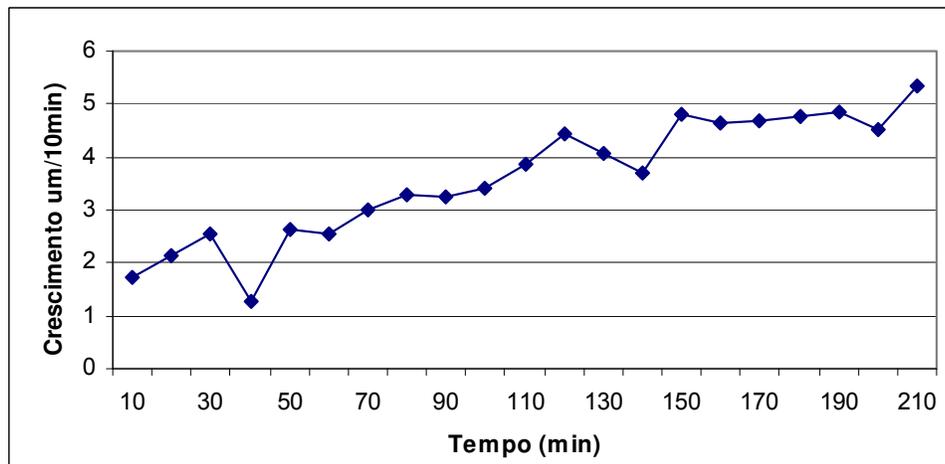


Figura 9- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF412

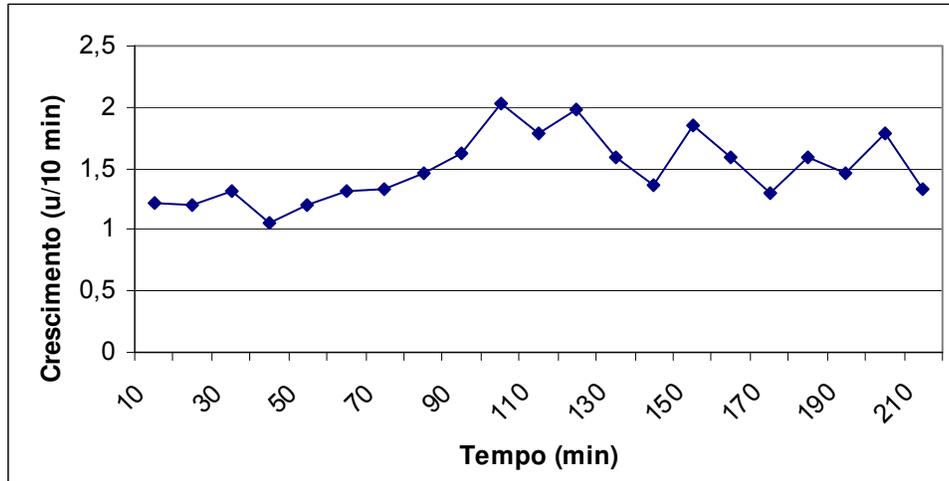


Figura 10- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF673

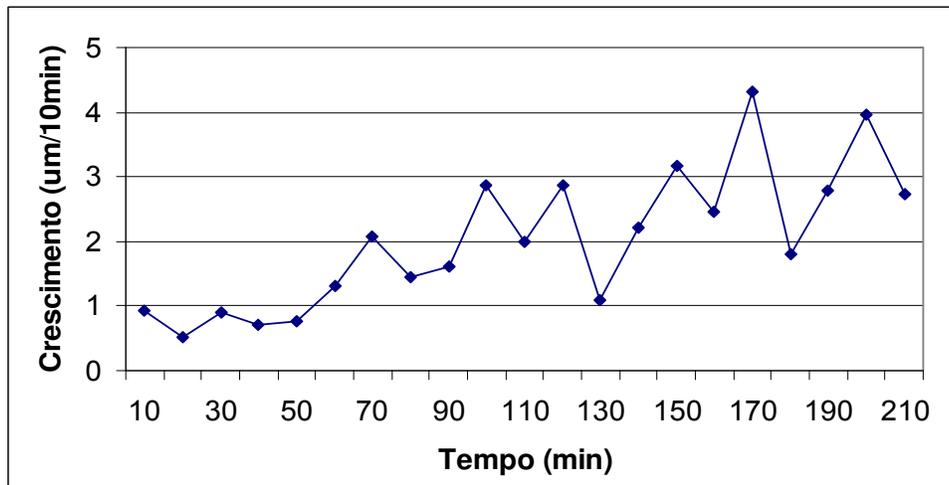


Figura 11- Gráfico de controle de crescimento da cepa LIF343

4.3.3- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico ciclopirox olamina no período de exposição e pós-exposição

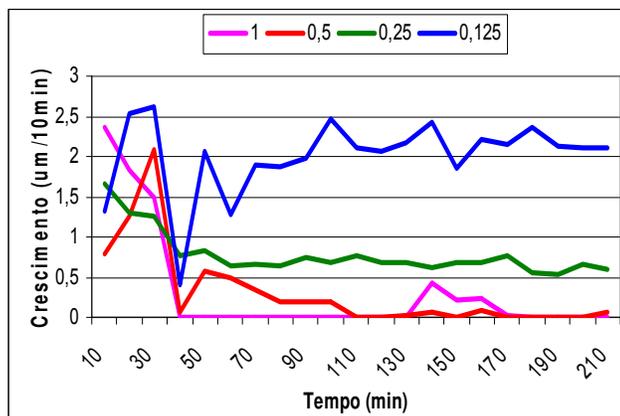


Figura 12- Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,125 a 1,0 µg/mL pelo BCT®

Tabela 5- Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT®

Período	Concentração (µg/mL)			
	1,0*	0,5	0,25	0,125
Exposição	100%	90%	47,2%	20,3%
Pós-exposição	100%	100%	51,5%	15,4%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

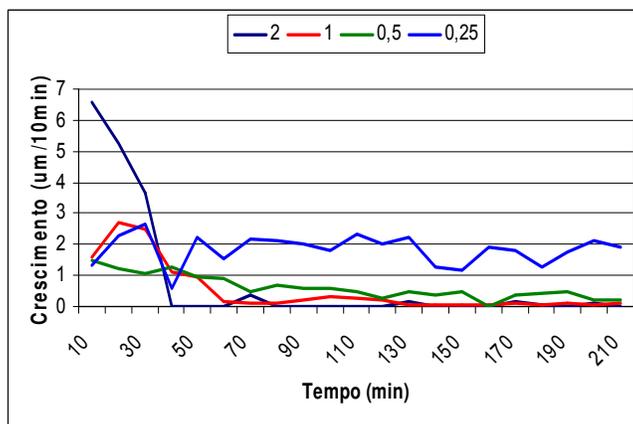


Figura 13- Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 6- Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	2,0*	1,0	0,5	0,25
Exposição	100%	93%	55,8%	11,4%
Pós-exposição	99,7%	96,7%	76,3%	17,2%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

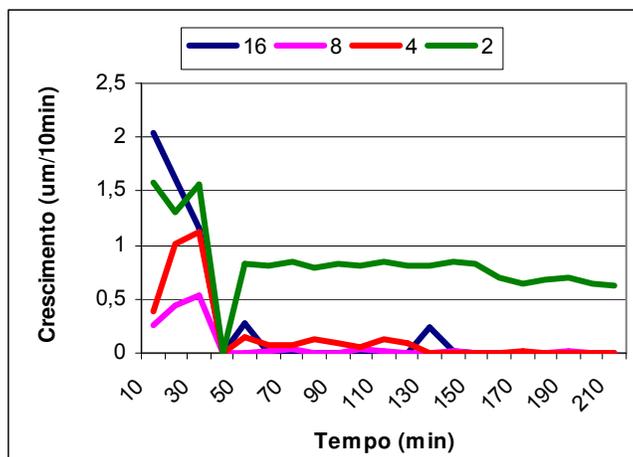


Figura 14- Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 2,0 a 16,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 7- Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	16,0*	8,0	4,0	2,0
Exposição	100%	99%	92,9%	47,8%
Pós-exposição	100%	100%	98,4%	29,6%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

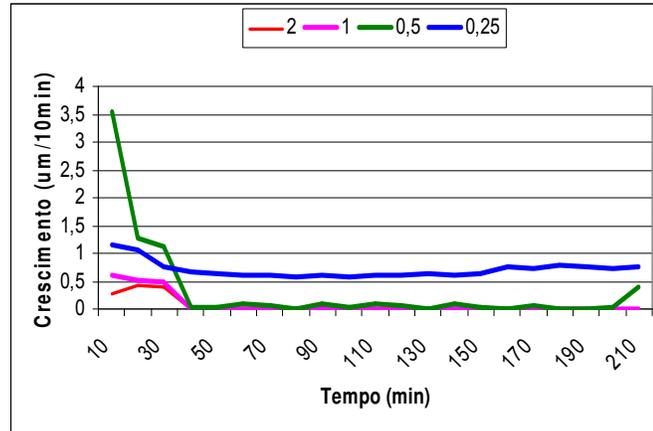


Figura 15- Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 8- Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	2,0*	1,0	0,5	0,25
Exposição	100%	100%	96,1%	43%
Pós-exposição	100%	100%	100%	57,7%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

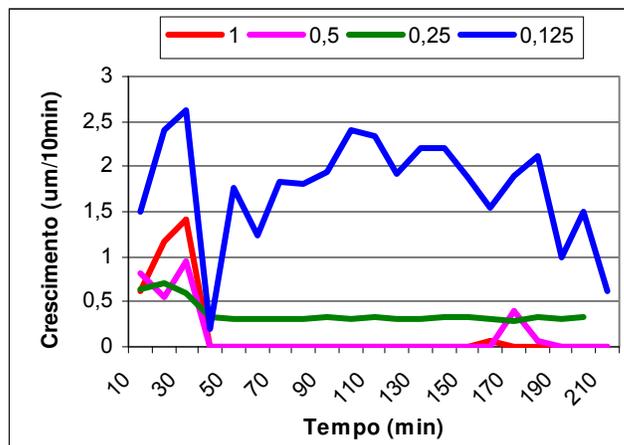


Figura 16- Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,125 a 1,0 $\mu\text{g/mL}$ pelo BCT[®]

Tabela 9- Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT[®]

Período	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)			
	1,0*	0,5	0,25	0,125
Exposição	100%	100%	51%	20,5%
Pós-exposição	100%	99,7%	53,6%	36,1%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

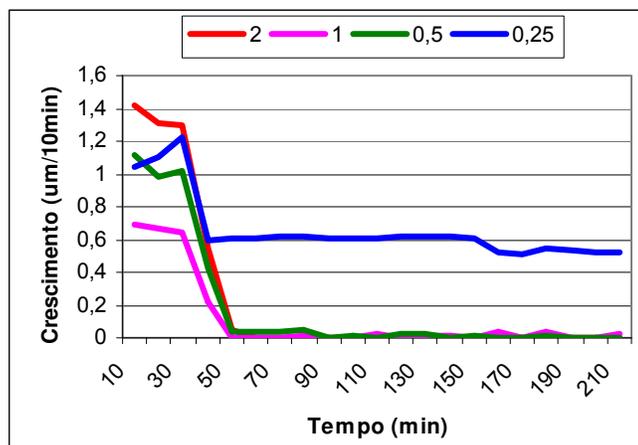


Figura 17- Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a ciclopirox olamina nas concentrações de 0,25 a 2,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 10- Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de ciclopirox olamina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)			
	2,0*	1,0	0,5	0,25
Período				
Exposição	100%	100%	97,7%	44,7%
Pós-exposição	100%	97,9%	100%	52,4%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

4.3.4- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico terbinafina no período de exposição e pós-exposição

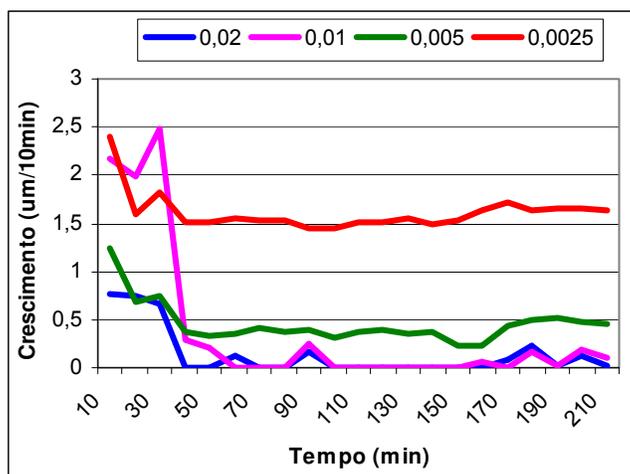


Figura 18- Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a terbinafina nas concentrações de 0,0025 a 0,02 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 11- Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	0,02*	0,01	0,005	0,0025
Exposição	100%	100%	50,1%	16,6%
Pós-exposição	93,4%	96%	37,7%	9,5%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

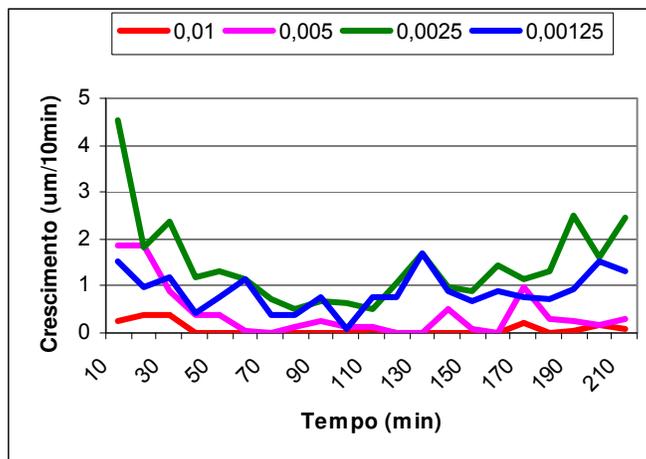


Figura 19- Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a terbinafina nas concentrações de 0,00125 a 0,01 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 12- Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	0,01*	0,005	0,0025	0,00125
Exposição	100%	94%	60,8%	35,6%
Pós-exposição	84,6%	85%	35,5%	25%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

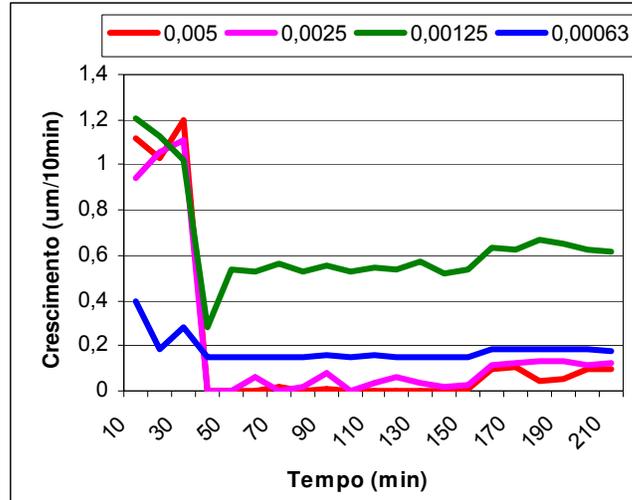


Figura 20- Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a terbinafina nas concentrações de 0,00063 a 0,005 $\mu\text{g/mL}$ pelo BCT[®]

Tabela 13- Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)			
	0,005*	0,0025	0,00125	0,00063
Período	100%	94%	60,8%	35,6%
Exposição	100%	94%	60,8%	35,6%
Pós-exposição	84,6%	85%	35,5%	25%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

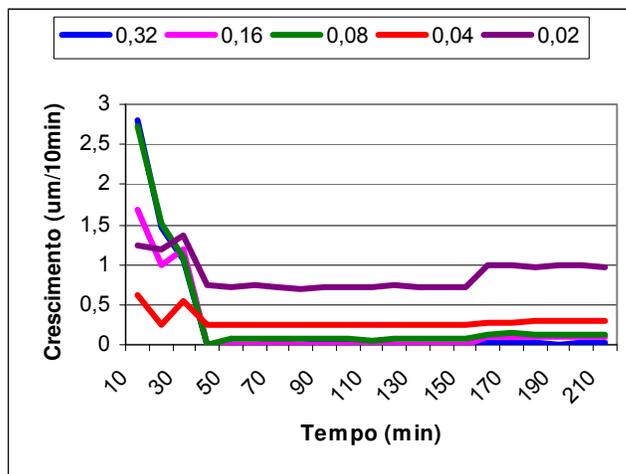


Figura 21- Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a terbinafina nas concentrações de 0,02 a 0,32 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 14- Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)				
	0,32*	0,16	0,08	0,04	0,02
Período	0,32*	0,16	0,08	0,04	0,02
Exposição	100%	100%	95,2%	53,2%	41,8%
Pós-exposição	98,4%	92%	91,4%	46,3%	20%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

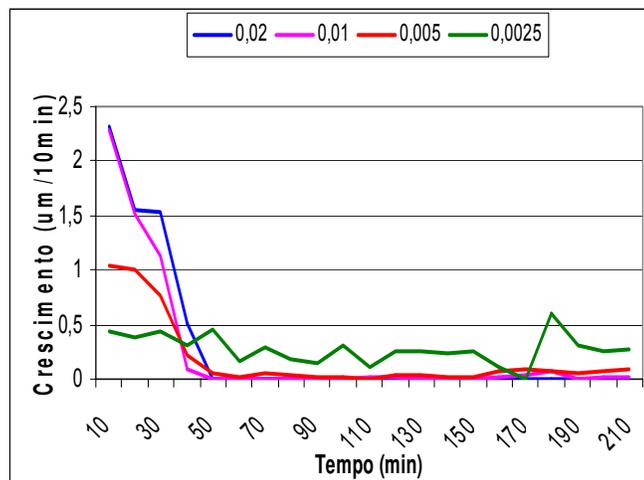


Figura 22- Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a terbinafina nas concentrações de 0,0025 a 0,02 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 15- Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	0,02*	0,01	0,005	0,0025
Exposição	100%	99,8%	97,2%	42,9%
Pós-exposição	99,7%	98,6%	92,5%	38,2%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

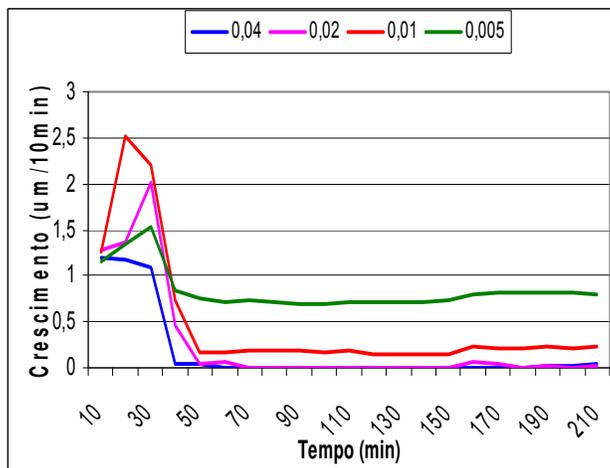


Figura 23- Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a terbinafina nas concentrações de 0,005 a 0,04 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 16- Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de terbinafina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	0,04*	0,02	0,01	0,005
Exposição	100%	100%	50,1%	16,6%
Pós-exposição	99%	98,4%	90%	

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

4.3.5- Taxa de inibição de crescimento das cepas avaliadas frente ao antifúngico griseofulvina no período de exposição e pós-exposição

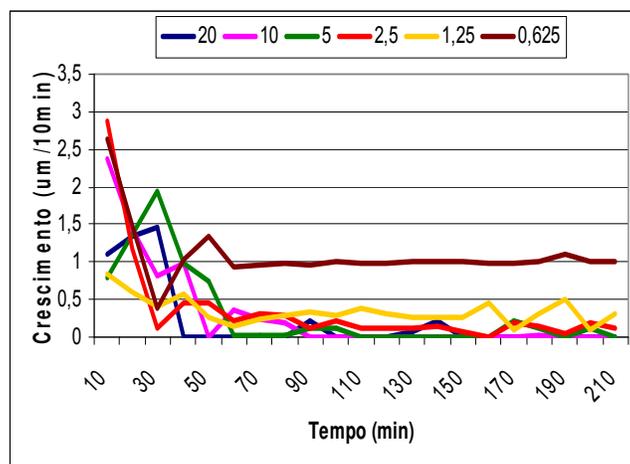


Figura 24- Inibição de crescimento da cepa LIF64 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 20,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 17- Taxa de inibição da cepa LIF64 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)					
	20,0*	10,0	5,0	2,5	1,25	0,625
Exposição	100%	100%	98,4%	85,1%	53,7%	33,2%
Pós-exp.	100%	100%	95,4%	85,1%	88,6%	46,3%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

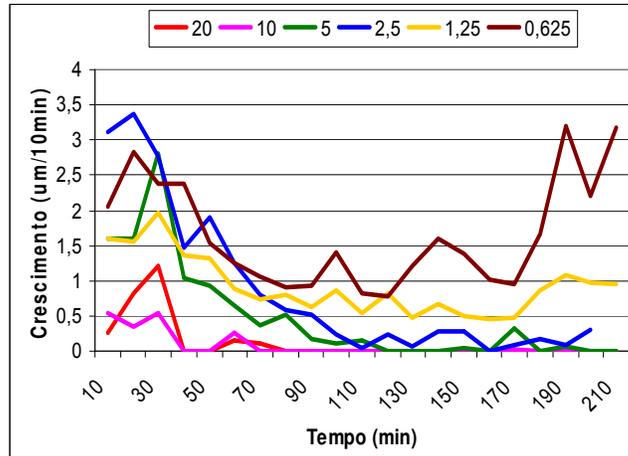


Figura 25- Inibição de crescimento da cepa LIF463 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 20,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 18- Taxa de inibição da cepa LIF463 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)					
Período	20,0*	10,0	5,0	2,5	1,25	0,625
Exposição	100%	100%	89,9%	87,3%	52,4%	48,3%
Pós-exp.	100%	100%	100%	95,8%	43,4%	17,7%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

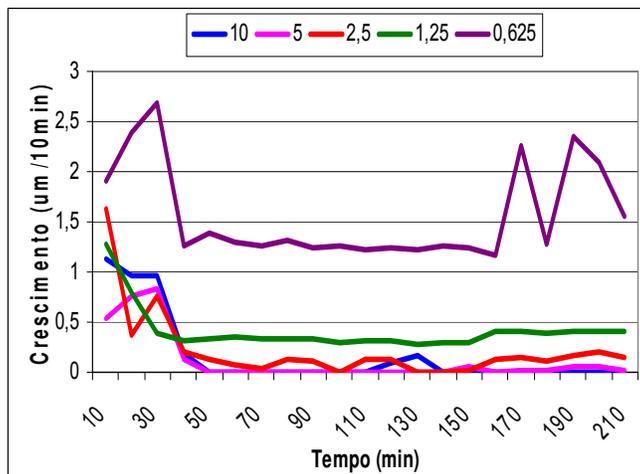


Figura 26- Inibição de crescimento da cepa LIF229 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 10,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 19- Taxa de inibição da cepa LIF229 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)				
	10,0*	5,0	2,5	1,25	0,625
Exposição	100%	100%	89,3%	60,1%	47,6%
Pós-exposição	100%	97%	80,9%	48,7%	24%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

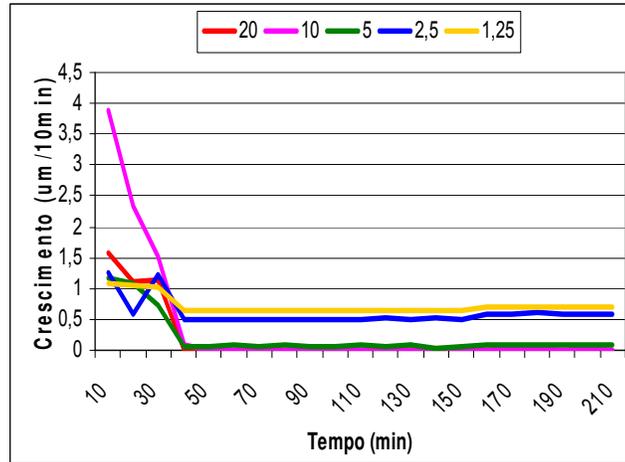


Figura 27- Inibição de crescimento da cepa LIF412 frente a griseofulvina nas concentrações de 1,25 a 20,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 20- Taxa de inibição da cepa LIF412 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)				
	20,0*	10,0	5,0	2,5	1,25
Período	20,0*	10,0	5,0	2,5	1,25
Exposição	100%	100%	93,3%	58,7%	38,8%
Pós-exposição	99,9%	99,3%	92,1%	51,4%	33%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

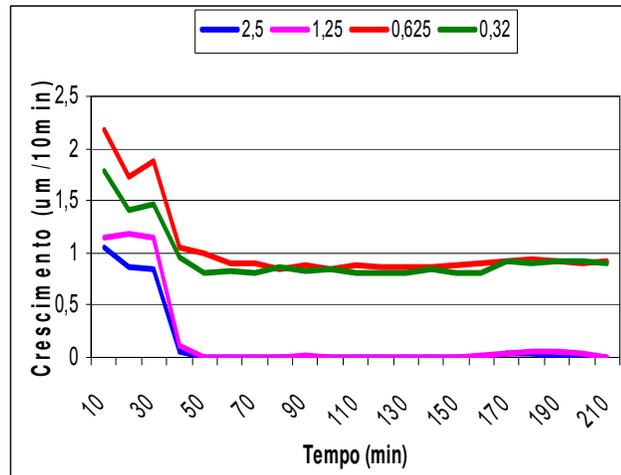


Figura 28- Inibição de crescimento da cepa LIF673 frente a griseofulvina nas concentrações de 2,5 a 0,32 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 21- Taxa de inibição da cepa LIF673 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

Período	Concentração (µg/mL)			
	2,5*	1,25	0,625	0,32
Exposição	100%	99,7%	56,4%	44,2%
Pós-exposição	98,7%	96,2%	51,3%	38%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

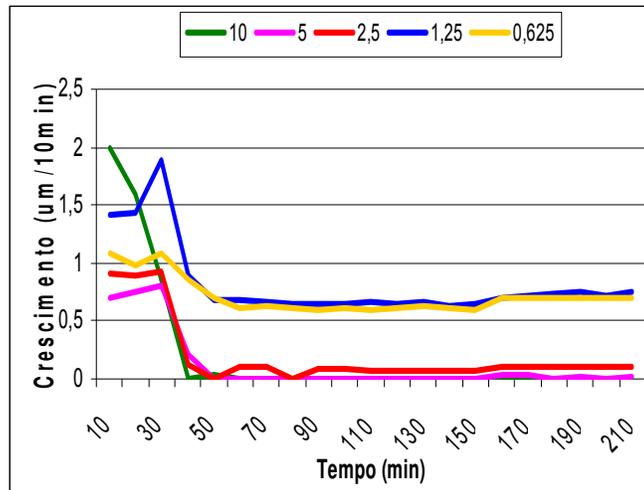


Figura 29- Inibição de crescimento da cepa LIF343 frente a griseofulvina nas concentrações de 0,625 a 10,0 µg/mL pelo BCT[®]

Tabela 22- Taxa de inibição da cepa LIF343 frente as concentrações avaliadas de griseofulvina pelo BCT[®]

	Concentração (µg/mL)				
	10,0*	5,0	2,5	1,25	0,625
Período	100%	100%	91,7%	54,2%	46,6%
Exposição	100%	100%	91,7%	54,2%	46,6%
Pós-exposição	100%	97%	88%	49,21%	35,3%

*CIM obtida pela técnica de microdiluição em caldo

5- DISCUSSÃO

5.1- Avaliação de condições ideais para realização da técnica de microdiluição em caldo para cepas de *Microsporum* sp (Tabela 2)

5.1.1- Meio de cultura para estimulação da produção de conídios

O uso de um meio de cultura adequado para produção de conídios é de grande importância devido ao fato da produção de esporos limitar a preparação de inóculo suficiente para ser usado na técnica de microdiluição em caldo (JESSUP *et al.*, 2000). Com o objetivo de induzir a estimulação de conídios, foram avaliados neste trabalho os meios de cultura: ABD e ASD. As cepas avaliadas produziram um grande número tanto de macroconídios como de microconídios com o meio ABD (Tabela 2), em concordância com Jessup *et al.* (2000), que descreveram este meio de cultura como sendo ideal para esporulação de dermatófitos.

Quando as cepas foram semeadas em ASD, obteve-se um número pequeno de conídios (Tabela 2). Brilhante *et al.* (2005), verificaram que dermatófitos do gênero *Microsporum* quando semeados em ASD, produzem hifas estéreis.

5.1.2- Inóculo

Dermatófitos do gênero *Microsporum* produzem dois tipos de conídios: macroconídios e microconídios, cujos tamanhos são consideravelmente diferentes (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002). Não existe registro na literatura sobre trabalhos que descrevem o uso de somente macroconídios ou microconídios, ou mesmo os dois tipos de conídios juntos. Devido a este fato, neste trabalho foi avaliado o uso destes três tipos de inóculo (Tabela 2).

Quando foram utilizados somente macroconídios, ou os dois tipos de conídios juntos, não foi possível obter um crescimento homogêneo na placa (Tabela 2). Em alguns testes, as cepas não apresentaram crescimento nem mesmo no controle positivo. Contudo, quando apenas microconídios foram utilizados para obtenção do inóculo, foram obtidos resultados claros e com crescimento uniforme na placa de microtitulação (Tabela 2).

A concentração de inóculo é considerada um dos fatores mais importantes na realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001). Neste trabalho foram comparadas duas concentrações de inóculo: uma recomendada pelo CLSI para fungos filamentosos (1×10^4 UFC/ml) e uma concentração menor (1×10^3 UFC/ml), de acordo com KRAKHECKE *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2003 e FAVRE *et al.*, 2003.

Os resultados dos testes de suscetibilidade demonstraram uma maior reprodutibilidade quando foi utilizado o inóculo de 1×10^3 UFC/ml, diferindo dos resultados dos testes em que foi avaliado o inóculo recomendado pelo CLSI, cujos valores foram discordantes (Tabela 2) (ANEXO 1). Norris *et al.*(1999), numa tentativa de padronizar condições ideais para realização de testes de suscetibilidade com dermatófitos, estabeleceram a concentração de inóculo de 1×10^3 UFC/ml como sendo a mais apropriada, assim como outros autores (KRAKHECKE *et al.*, 2005; GUPTA *et al.*, 2003; FAVRE *et al.*, 2003).

O método de microdiluição em caldo (CLSI, 2002) recomenda ajustar a turbidez do inóculo utilizando o espectrofotômetro. Entretanto, tem sido reportado que a contagem de conídios em câmara de células hematológicas permite um melhor ajuste de tamanho do inóculo para a realização do teste (TEIXEIRA, 2006).

5.1.3- Temperatura e período de incubação

A temperatura e o período de tempo de incubação das placas na realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos com dermatófitos ainda é uma questão em aberto (FAVRE *et al.*, 2003; NORRIS *et al.*, 1999). A literatura descreve que a maioria das espécies de dermatófitos tem um crescimento ideal entre quatro e quinze dias de incubação a uma temperatura que pode variar de 28°C a 30°C (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2002). Entretanto, vários autores têm proposto temperaturas mais altas (de 35°C a 37°C), e tempos diferentes de incubação, que variam de três a vinte dias (PEREA *et al.*, 2001; JESSUP *et al.*, 2000; NORRIS *et al.*, 1999; BUTTY *et al.*, 1995).

Neste estudo, as placas que foram incubadas a 35°C não apresentaram crescimento fúngico (Tabela 2). Em contraste, quando a temperatura de incubação foi de 28°C e as placas permaneceram incubadas por 7 dias, as cepas alcançaram um crescimento ideal (Tabela 2). Porém, antes do sétimo dia de incubação, não foi possível visualizar um crescimento claro e homogêneo nem mesmo no controle positivo (Tabela 2). Fernández-Torres *et al.* (2002) que buscaram em um estudo padronizar a realização de testes de suscetibilidade com dermatófitos também obtiveram este mesmo resultado para a temperatura e o período de incubação.

5.1.4- Leitura Final

Não existe consenso sobre a leitura final para os testes de suscetibilidade a antifúngicos para determinação da CIM para dermatófitos (GUPTA *et al.*, 2003; FAVRE *et al.*, 2003; FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2001; GUPTA *et al.*, 2005), assim como para muitos antifúngicos ainda não se sabe se são fungicidas ou fungistáticos. Neste trabalho duas leituras finais foram realizadas em cada teste: 80% e 100% de inibição de crescimento visível (Tabela 2). Em alguns dos testes de suscetibilidades realizados, não foi possível visualizar 80% de inibição para algumas concentrações de antifúngicos avaliados, sendo possível somente determinar a CIM de 100% de inibição (Tabela 2).

Devido a estes resultados, a CIM foi considerada neste trabalho como sendo a menor concentração de antifúngico que consegue inibir 100% de crescimento fúngico visível. Gupta *et al.* (2003) também definiram a CIM para ciclopirox olamina e terbinafina desta mesma forma, assim como Fernández-Torres *et al.* (2001), que ao avaliarem a atividade *in vitro* de 10 antifúngicos para 137 dermatófitos do gênero *Microsporum* consideraram a leitura da CIM como sendo 100% de inibição de crescimento. Krakhecke *et al.* (2005), avaliando a suscetibilidade *in vitro* de *M. gypseum*, definiram a CIM como a menor concentração de antifúngico onde não houve turbidez na cavidade da placa de microtitulação.

Outros autores definiram diferentes leituras de CIM, variando de 50% a 90% de inibição de crescimento (PEREA *et al.*, 2001; FAVRE *et al.*, 2003; ALIÓ *et al.*, 2005; FERNÁNDES-TORRES *et al.*, 2000). Esta grande variabilidade de interpretações de

leitura de CIM tem relação direta com as diferentes concentrações e tipos de inóculo utilizados por estes autores.

5.1.5- Avaliação da suscetibilidade a antifúngicos

Vários estudos têm sido publicados sobre avaliação da suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos do gênero *Microsporum* frente a estas três drogas avaliadas neste trabalho, porém, seria muito difícil realizar uma comparação de resultados devido a grande variabilidade de metodologias e variáveis utilizadas por estes autores em seus trabalhos (GUPTA *et al.*, 2003; FERNÁNDES-TORRES *et al.*, 2001; CHADEGANIPOUR *et al.*, 2004). O manual do CLSI não relata valores de CIM para estes antifúngicos (CLSI, 2002).

Frente ao antifúngico ciclopirox olamina, os valores de CIM da maioria das cepas avaliadas variou de 1,0 a 2,0 µg/ml (Tabela 3). Somente a cepa LIF229 apresentou um resultado diferente, ou seja, um valor alto de CIM (16,0 µg/ml). Estes resultados estão concordantes com Favre *et al.*, (2003) que avaliaram cepas de *Microsporum* sp frente a ciclopirox olamina e obtiveram valores de CIM que variaram de 0,5 a 1,0 µg/ml.

Os valores de CIM frente ao antifúngico terbinafina variaram de 0,005 a 0,08 µg/ml (Tabela 3), de acordo com estudo publicado por Favre *et al.*, que obtiveram CIM de 0,008 a 0,016 µg/ml para terbinafina. Estes resultados discordam de alguns trabalhos que avaliaram cepas de *Microsporum* sp frente a terbinafina como o de Fernandez-Torres *et al.* (2001), que em seu obtiveram valores de CIM que variavam de 0,04 a 1,0 µg/ml, e como o trabalho de Perea *et al.* (2001), que obtiveram valores de CIM que variaram de 0,004 a 2,0 µg/ml.

Perea *et al.* (2001), que avaliaram em seu trabalho a suscetibilidade de cepas de *Microsporum* sp frente a griseofulvina, obtiveram valores de CIM que variaram de 0,125 a 8,0 µg/ml. Chadeganipour *et al.* (2004), avaliando a suscetibilidade *in vitro* de dermatófitos frente a griseofulvina obtiveram valores de CIM que variaram de 0,25 a 16,0 µg/ml para cepas de *Microsporum* sp. Favre *et al.* obtiveram valores de CIM que variaram de 0,025 a 0,05 µg/ml para griseofulvina. Neste trabalho, os valores de CIM frente a griseofulvina foram mais altos que os valores encontrados por estes autores,

variando de 10,0 a 20,0 µg/ml para a maioria das cepas, exceto para a cepa LIF673, para a qual foi obtido um valor de CIM mais baixo (2,5 µg/ml) (Tabela 3).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho (Tabela 3), a terbinafina teve uma atividade maior, com concentrações de CIM mais baixas, quando comparada a griseofulvina e a ciclopirox olamina, sendo considerada o mais potente dos três antifúngicos avaliados para *Microsporum* sp. Este resultado está de acordo com outros trabalhos, que demonstraram a atividade desta alilamina contra dermatófitos do gênero *Microsporum* (KRAKHECKE *et al.*, 2005; CHAN *et al.*, 2004; FAVRE *et al.*, 2003; FERNÁNDES-TORRES *et al.*, 2002).

A metodologia padronizada pelo CLSI M38-A não descreve as condições de teste para determinar a CFM. De acordo com GUARRO *et al.*, (1997) a CFM foi determinada transferindo-se 10 µl de todas as cavidades da placa de microtitulação em caldo que não apresentaram crescimento fúngico, para uma placa de ABD. Após a incubação da placa a 30°C por 48h verificou-se a presença, ou não, de crescimento do inóculo.

Os valores de CFM encontrados neste trabalho, para ciclopirox olamina e griseofulvina são concordantes com o valor de CIM, o que fala a favor de uma atividade fungicida destas drogas frente às cepas de *Microsporum* sp avaliadas (Tabela 3). Frente ao antifúngico terbinafina, os valores de CFM obtidos tanto foram iguais aos valores da CIM, quanto maiores, não sendo possível inferir se esta droga possui características fungicidas ou fungistáticas para as cepas avaliadas (Tabela 3).

Favre *et al.* (2003) avaliando a suscetibilidade *in vitro* de cepas de dermatófitos frente a 17 antifúngicos, obtiveram resultados de CIM e CFM concordantes para terbinafina e valores discordantes para griseofulvina e ciclopirox olamina.

Pujol *et al.* (1997) em seu trabalho determinaram que os valores de CIM poderiam se relacionar melhor com a evolução clínica e os valores de CFM seriam valiosos em infecções severas em pacientes imunocomprometidos. Buty *et al.* (1995) sugeriram que os valores de CFM seriam mais importantes que os valores de CIM na possibilidade de prever resistência *in vivo*. Em tratamentos longos, acredita-se que são obtidos melhores resultados quando utilizados antifúngicos com baixos valores de CIM e CFM.

5.1.6- Cepa padrão

Neste estudo, não foi possível utilizar cepas padrão de fungos filamentosos, para acompanhamento dos resultados. Nos testes de microdiluição os controles foram avaliados com cepas padrão de leveduras (ANEXO 2).

KOKJOHN *et al.* (2003), avaliando cepas de *Candida* sp frente a ciclopirox olamina obteve valores de CIM que variaram de 0,001 a 0,25 µg/ml, e GUPTA *et al.* (2003), obtiveram valores de CIM para cinco cepas de *Candida* sp, que variaram de 0,06 a >2,0 µg/ml. Neste trabalho, os resultados de CIM para as cepas de *Candida* sp frente a ciclopirox olamina variaram de 2,0 a 8,0 µg/ml, discordando com os apresentados por estes autores (ANEXO 2).

Os resultados de CIM obtidos neste trabalho para terbinafina foram >0,128 µg/ml (ANEXO 2). Gupta *et al.* (2005), avaliaram em seu estudo 25 cepas de *Candida* sp (incluindo a cepa padrão avaliada neste trabalho ATCC22019) obtiveram como resultado CIM >2,0 µg/ml.

Não foi possível correlacionar os valores de CIM para das cepas padrão frente a griseofulvina com a literatura devido ao fato deste antifúngico não possuir eficácia para leveduras.

5.2- Avaliação dinâmica de crescimento – Sistema Automatizado BioCell-Tracer®

Não há registro na literatura de experimentos com o Sistema Automatizado BCT®, utilizando hifas de dermatófitos. Por sua vez, os experimentos realizados que avaliam fungos filamentosos são bastante restritos. Há somente relatos de avaliação de *Aspergillus* sp (MATSUOKA *et al.*, 1990; YAMADA *et al.*, 1992; OH *et al.*, 1993^{a,b}; TAGUCHI *et al.*, 1995; ANSHENG *et al.*, 1999; TEIXEIRA, 2006) *Fusarium* sp (TEIXEIRA *et al.*, 2005; TEIXEIRA, 2006) e *Candida* sp (OH *et al.*, 1995; MOREIRA, 2004).

Com o uso do equipamento foi possível observar o crescimento das hifas de *Microsporum* sp em tempo real bem como o seu comportamento frente aos antifúngicos. WEI-YUN ZHU e GOODAY (1992) têm demonstrado que existem diferenças na

característica física de hifas jovens em comparação com as hifas maduras. Essas diferenças podem causar variações de sensibilidade ou resistência no uso de antifúngicos. Foi reportado que hifas jovens de *Botrytis cinerea* e *Mucor rouxii* crescem devagar e apresentam menor suscetibilidade aos agentes antifúngicos do que as hifas maduras (WEI-YUN ZHU *et al.*, 1992; ANSHENG, *et al.*, 1999). TEIXEIRA, (2006), em seu trabalho demonstrou que hifas jovens de *Fusarium* spp. cresceram mais rápido e foram menos susceptíveis aos agentes antifúngicos do que as hifas maduras.

Neste trabalho, não foi possível observar diferenças, no decorrer do experimento, entre hifas jovens e maduras, pois ambas responderam da mesma forma aos agentes antifúngicos, porém, quando o antifúngico foi adicionado observou-se que as hifas começaram a se ramificar e a se tornarem mais finas. A princípio, esta diferença poderia estar influenciando nos valores de CIM avaliados, sendo minimizada pela análise estatística com a mediana.

5.2.1- Controle de Crescimento

Devido ao crescimento mais lento dos dermatófitos em relação a cepas de outros fungos filamentosos como *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp, os intervalos de leitura foram de 10 minutos ao invés de 5 minutos como os resultados até o momento, na literatura (ANSHENG *et al.*, 1999; OH *et al.*, 1993; OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995; TEIXEIRA, 2006) (Figuras 6 a 11) (Tabela 4). Para os testes no BCT[®] ainda não foram estabelecidos valores para cepas padrão.

A grande variação entre os valores registrados a cada 10 min se deve às características individuais de crescimento de cada cepa de cada espécie avaliada.

5.2.2- Padronização do inóculo

O inóculo para os testes no BCT[®] não é quantitativo como na metodologia de microdiluição em caldo, CLSI M38-A. Seu tamanho não interfere no crescimento das hifas e tão pouco na determinação da CIM, pois o crescimento das hifas é avaliado individualmente pela mediana do crescimento em $\mu\text{m}/10$ min. A padronização só é

realizada para determinar o tamanho de inóculo e o tempo necessário de incubação do mesmo para um adequado crescimento inicial das hifas (TEIXEIRA, 2006)

Cepas de *Microsporum* sp apresentaram crescimento inicial ideal após 72h de incubação de 5µl do inóculo com concentração em torno de 1 x10⁶ células/ml a uma temperatura de 30°C (Tabela 4). ANSHENG *et al.* (1999), avaliando cepas de *Aspergillus fumigatus* utilizaram a concentração de 1x10⁴ conídios/ml. Observou-se que a temperatura ambiente interfere no crescimento do inóculo de *Microsporum* spp. para, posteriormente, ser avaliado no sistema BCT[®]. Em dias frios, as cepas de *Microsporum* sp cresceram em 72 horas (Tabela 4). Em dias mais quentes, foram necessárias até 96 horas (Tabela 4). TEIXEIRA (2006) avaliando cepas de *Fusarium* sp no equipamento BCT[®], observou que a umidade do ar também pode interferir no crescimento do inóculo.

5.2.3- Preparação do Teste

O crescimento das hifas no sistema BCT[®] é longitudinal e para realizar a sua medição foi necessário que as hifas permanecessem fixadas à placa plástica. O seu descolamento da placa impossibilita a realização do teste que mede o crescimento da hifa por contraste de cores. Ao microscópio, as hifas adquirem coloração azul e a placa plástica com o meio RPMI adquire coloração branca. O aparelho mede o deslocamento da coloração azul (hifa) sobre a coloração branca (placa) (TEIXEIRA, 2006). Para a fixação das hifas na placa foi necessária a impregnação do material plástico com poli-l-lisina (PLL), um polímero químico que facilita a adesão de células em substratos sólidos com >70.000 mol (SIGMA, PRODUCT INFORMATION). ANSHENG *et al.* (1999), avaliando espécies de *Aspergillus*, utilizaram uma concentração de PLL a 0,01%, para fixação dos esporos. Nas condições deste estudo, houve melhor fixação das hifas na placa, com 0,05% de PLL (Tabela 4).

Diferentemente da literatura onde TAGUCHI *et al.* (1995) e ANSHENG *et al.* (1999) utilizam meio SAAMF, neste trabalho o meio utilizado para teste, foi RPMI 1640 (Tabela 4), assim como no trabalho de TEIXEIRA, (2006). A temperatura de incubação prévia para inóculos das cepas de *Microsporum* sp foi de 30°C, numa tentativa de mimetizar a temperatura na pele do indivíduo (tabela 4).

As concentrações de antifúngicos avaliadas nos testes realizados no BCT[®] tiveram como ponto de partida os resultados de CIMs obtidos nos testes de microdiluição em caldo. A partir da CIM, as concentrações foram reduzidas até a obtenção de uma taxa de inibição de crescimento fúngico menor que 50%.

5.2.4- Medida de crescimento das hifas

O tempo de experimento para as cepas de *Microsporum* sp no BCT[®] foi padronizado em 3h30m (Tabela 4). Sendo os 30m iniciais considerados como controle (Pré), 2h com adição do antifúngico (Exp) e 1h final após a retirada da droga e com adição do meio RPMI 1640 (Pós). Não havendo alteração dos resultados em um tempo de experimento mais prolongado. TEIXEIRA (2006), avaliando cepas de *Aspergillus* sp e *Fusarium* sp, também utilizou esta mesma padronização. ANSHENG *et al.* (1999) utilizaram para *A. fumigatus* frente ao fluconazol Pré: 0-12 min, Exp: 12-130 e Pós: 130-180 (ANSHENG *et al.*,1999). YAMADA *et al.* (1992) e OH *et al.* (1993) utilizaram para *A. niger* frente a vários antifúngicos Pré: 0-30 min, Exp: 30-90 e Pós: 90-150.

No BCT[®] foi possível calcular quantos micrômetros uma hifa de *Microsporum* sp poderia crescer em 10 minutos. Foi possível também encontrar diferentes velocidades de crescimento de diferentes cepas da mesma espécie e de espécies diferentes. Não há nenhum relato na literatura sobre a avaliação dinâmica de crescimento de hifas deste fungo e sua inibição na presença de antifúngicos.

5.2.5- Análise estatística dos dados

OH *et al.* (1993) indicaram que a metodologia do BCT[®] apresenta um problema estatístico questionando se uma única hifa poderia representar o comportamento de toda a colônia. Para solucionar este problema, foram avaliadas, no mínimo, dez hifas em cada experimento e calculados os valores da média e mediana dos dados obtidos pelo BCT[®], valorizando assim, o padrão de crescimento demonstrado pela maioria das hifas.

5.2.6- Determinação da taxa de inibição de crescimento das hifas

Utilizando as medianas das taxas de inibição, foi possível observar maior concordância da inibição de crescimento com o aumento da concentração da droga, do que quando foram avaliados apenas o resultado das médias. Nas publicações de MATSUOKA *et al.*, 1990; YAMADA *et al.*, 1992; OH *et al.*, 1993^{a,b}; OH *et al.*, 1995; TAGUCHI *et al.*, 1995; IIDA *et al.*, 1999; ANSHENG *et al.*, 1999, foram relatados valores de média. E no trabalho de TEIXERA (2006) foram utilizados tanto os valores de média como os de mediana.

Para a primeira concentração dos antifúngicos avaliados, equivalente ao resultado de CIM, todas as cepas apresentaram uma taxa de inibição de crescimento de 100% no período de exposição ao antifúngico (Tabelas 5 a 22).

Na fase de exposição a droga, todas as cepas apresentaram taxa de inibição de crescimento acima de 90% frente ao antifúngico ciclopirox olamina, na concentração equivalente ao resultado de CIM obtido pela técnica de microdiluição em caldo e em uma diluição abaixo (Figuras 12 a 17) (Tabelas 5 a 10). Na segunda concentração abaixo do valor correspondente ao resultado de CIM, as cepas LIF229, LIF412 e LIF343 continuaram apresentando taxa de inibição acima de 90% (Tabelas 7, 8 e 10) e as demais cepas apresentaram uma redução da taxa de inibição (Tabelas 5, 6 e 9). No período de pós-exposição, a taxa de inibição foi maior que a no período de exposição ao antifúngico, demonstrando um efeito fungicida para as hifas de *Microsporium* sp frente a este antifúngico (Tabelas 5 a 10).

Frente a terbinafina, no período de exposição ao antifúngico, todas as cepas apresentaram taxa de inibição de crescimento acima de 94% na concentração equivalente ao resultado de CIM obtido pela técnica de microdiluição em caldo e em uma diluição abaixo (Tabelas 11 a 16). Na segunda diluição abaixo do resultado de CIM, as cepas LIF412, LIF673 e LIF343 ainda apresentaram taxa de inibição acima de 92% (Tabelas 14 a 16), ao contrário das outras cepas avaliadas, que apresentaram uma grande redução na taxa de inibição de crescimento (Tabelas 11 a 13). Todas as cepas apresentaram uma taxa de inibição de crescimento maior no período de exposição ao antifúngico que no

período de pós-exposição caracterizando assim um efeito fungistático para este antifúngico (Tabelas 11 a 16).

Frente a griseofulvina, no período de exposição ao antifúngico, as cepas LIF64 e LIF463 apresentaram taxa de inibição de crescimento acima de 85%, na concentração equivalente ao resultado de CIM obtido pela técnica de microdiluição em caldo e nas três diluições abaixo (Tabelas 17 e 18). As cepas LIF229, LIF412 e LIF343 apresentaram taxa de inibição acima de 80% na concentração equivalente ao resultado de CIM e nas duas diluições abaixo (Tabelas 19, 20 e 22). A cepa LIF673 apresentou taxa de inibição de crescimento acima de 96% apenas na concentração equivalente a CIM e em uma abaixo (Tabela 21). Nas demais concentrações avaliadas para a cepa LIF673, o valor da taxa de inibição foi bem menor (Tabela 21). Este resultado se deve ao fato da primeira concentração avaliada ser bem pequena. As hifas avaliadas apresentaram, em geral, valores maiores de taxa de inibição de crescimento no período de exposição ao antifúngico que no período de pós-exposição, caracterizando um efeito fungistático para griseofulvina.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica de microdiluição em caldo, a griseofulvina demonstrou um efeito fungicida (Tabela 3), ao contrário dos resultados obtidos pelo BCT[®] que evidenciou um efeito fungistático para este antifúngico (Tabelas 17 a 22). Os estudos publicados na literatura concordam com os dados obtidos pelo Sistema Automatizado BCT[®], demonstrando um efeito fungistático para este antifúngico (KASSEM *et al.*, 2006; FAVRE *et al.*, 2003).

Neste trabalho observou-se que, mesmo em concentrações mais baixas de antifúngicos para as quais, o teste com conídios revelou valores de CIM altos, as taxas de inibição de crescimento de hifas, apresentaram valores altos (Tabelas 5 a 22).

Existem poucos relatos na literatura sobre a comparação do uso de conídios ou hifas em testes de suscetibilidade a antifúngicos (MANAVATHU *et al.*, 1999; BEJAK *et al.*, 1985; GUARRO *et al.*, 1997; WETTER *et al.*, 2005; TEIXEIRA, 2006), e em nenhum deles foram utilizadas hifas de dermatófitos.

MANAVATHU *et al.* (1999) demonstraram que os conídios germinados e não germinados de *A. fumigatus* apresentaram a mesma suscetibilidade inibitória e fungicida frente aos compostos poliênicos e azólicos. Os resultados de suscetibilidade para

anfotericina B apresentados por BEJAK *et al.* (1985) indicaram que não houve nenhuma diferença nos valores das CIMs entre conídios e hifas de *Aspergillus spp.*

GUARRO *et al.* (1997) obtiveram considerável discrepância nos valores da CIM e CFM quando diferentes tipos de inóculos foram utilizados para espécies de *Cladosporium*, *Paecilomyces*, *Scopulariopsis* e *Cladophialophora*. WETTER *et al.*, (2005), compararam inóculos de conídios e hifas de quatro cepas de *Aspergillus fumigatus* frente a anfotericina B, itraconazol e voriconazol e não obtiveram diferença significativa nos resultados obtidos com os dois inóculos.

TEIXEIRA (2006), em seu trabalho avaliou a suscetibilidade de conídios e hifas de cepas de *Aspergillus sp* e *Fusarium sp* utilizando a técnica de microdiluição em caldo e o Sistema Automatizado BCT[®], e demonstrou que a forma de hifas é mais suscetível à anfotericina B, e mais resistente ao itraconazol do que os conídios para espécies de *Aspergillus spp.* e que as hifas são praticamente iguais aos conídios frente ao itraconazol ou são levemente mais suscetíveis a anfotericina B do que os conídios para espécies de *Fusarium spp.*

As discrepâncias encontradas entre os resultados obtidos com os dois tipos de inóculo para as cepas de *Microsporium sp*, são atribuídas ao fato dos conídios serem forma de resistência destes fungos e possuírem parede celular mais espessa e resistente do que as hifas, o que dificultaria a penetração do antifúngico no interior da célula fúngica. Ao contrário de fungos filamentosos como o *Aspergillus spp.* que possuem a espessura da parede dos conídios similar a das hifas (FERNÁNDEZ-TORRES *et al.*, 2003).

O pequeno número de relatos de uso do sistema automatizado de avaliação dinâmica de crescimento, aliado à falta de padronização de testes de suscetibilidade para dermatófitos e determinação de pontos de corte de leitura para as drogas com finalidade terapêutica para os microrganismos estudados neste trabalho, torna o pioneiro e de difícil correlação com trabalhos anteriores.

Frente a griseofulvina, os resultados obtidos com o BCT[®] são mais próximos do nível sérico que este antifúngico atinge no organismo (de 1,0 a 2,0 µg/ml), do que a concentração que chega na pele do paciente (12,0 a 25,0 µg/ml) (GRISEOFULVINA oral), que está mais parecida com os valores de CIM obtidos pela técnica de microdiluição em

caldo (Tabela 3). A concentração sérica atingida pela formulação oral da terbinafina é de 1,3 µg/ml (TERBINAFINA oral). Os resultados obtidos pelas duas metodologias ficaram bem abaixo desta concentração.

No entanto, para que esta correlação possa ser estabelecida, será necessário um trabalho prospectivo, de longo acompanhamento do paciente, inclusive para avaliação de recidivas.

Devido ao número de cepas avaliadas neste trabalho, novos estudos utilizando inóculos de hifas seriam de grande interesse para avaliar se as hifas são mais apropriadas para realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos com dermatófitos do gênero *Microsporum*. Não foi possível realizar uma correlação clínico-laboratorial devido ao fato dos pacientes medicados não terem retornado ao Ambulatório de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Unicamp após o término do tratamento (ANEXO 3).

Enfim, os fungos filamentosos do gênero *Microsporum* sp apresentaram características individuais de crescimento e suscetibilidade, sendo praticamente inviável a sua correlação até mesmo, entre cepas da mesma espécie. Independente da metodologia utilizada para realização do teste de suscetibilidade ou da forma fúngica avaliada para inóculo nos testes de suscetibilidade, as cepas devem ser avaliadas separadamente, caso a caso, se possível, ao longo do tratamento clínico, uma vez que cada cepa deve ser considerada única.

6- CONCLUSÕES

- As condições propostas para realização do teste de suscetibilidade a antifúngicos pela técnica de microdiluição em caldo para *Microsporium* spp. são: ágar batata dextrose como meio para indução da produção de conídios, uma concentração de inóculo de 1×10^3 UFC/ml, contendo apenas microconídios, um período de incubação de 7 dias a 28°C e uma leitura final de 100% de inibição de crescimento.
- Pela técnica de microdiluição em caldo, os resultados de CIM para as cepas avaliadas variaram de 1,0 a 2,0 µg/ml para ciclopirox olamina, exceto a cepa LIF229, que obteve um resultado diferente, apresentando um valor alto de CIM (16,0 µg/ml); frente a terbinafina os valores variaram de 0,005 a 0,08 µg/ml; frente a griseofulvina, os valores variaram de 10,0 a 20,0 µg/ml para a maioria das cepas, exceto para a cepa LIF673, que obteve um valor de CIM mais baixo (2,5 µg/ml).
- Como padronização para avaliação da suscetibilidade de cepas de *Microsporium* spp. através do Sistema Automatizado BCT[®] são propostas: concentração de PLL de 0,05%; concentração de inóculo maior ou igual a 1×10^6 conídios/ml em 5µl; temperatura de incubação das placas de 30°C de 72 a 96h; 30°C como temperatura de realização do teste; tempo total de experimento de 3 horas e 30 minutos, com intervalos de leitura a cada 10min; uso da mediana como medida para avaliação estatística dos dados.
- Utilizando o Sistema Automatizado BCT[®], todas as cepas apresentaram taxa de inibição de crescimento acima de 85% frente aos antifúngicos ciclopirox olamina, terbinafina e griseofulvina, na concentração equivalente ao resultado de CIM obtido pela técnica de microdiluição em caldo e, em pelo menos, uma diluição abaixo na fase de exposição a droga.
- No período de pós-exposição, a taxa de inibição foi maior que a no período de exposição frente ao antifúngico ciclopirox olamina, revelando um efeito fungicida para as hifas de *Microsporium* sp frente a este antifúngico. E para os antifúngicos griseofulvina e terbinafina, a taxa de inibição de crescimento foi menor no período de pós-exposição do que no período de exposição ao antifúngico, caracterizando um efeito fungistático para as hifas de *Microsporium* sp frente a estes antifúngicos.
- Os dados deste trabalho sugerem que a forma de hifas é mais suscetível que a de conídios frente aos antifúngicos avaliados, considerando-se as medianas dos resultados obtidos, para as espécies de *Microsporium* avaliadas.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIÓ A.B., MENDONZA M., ZAMBRANO E.A., DÍAZ E. and CABALLERA E. Dermatophytes growth curve and *in vitro* susceptibility test: a broth micro-titration method. **Med Mycol**, 43: 319-325, 2005.

ANSHENG L., TAGUCHI H., MIYAJI M. *et al.* Study on the hyphal responses of *Aspergillus fumigatus* to the antifungal agent by Biocell-Tracer. **Mycopathologia**, 148: 17-23, 1999.

ASTE N. e PAUL M. *Tinea capitis* caused by *Microsporum canis* treated with terbinafine. **Mycoses**, 47:428-430, 2004.

BEZJAK V. Standardization of a hyphal inoculum of *Aspergillus* for amphotericin B susceptibility testing. **J. Clin. Microbiol**, 21(4): 509-512, 1985.

BELL-SYER S.E., HART R., CRAWFORD F. *et al.* Oral treatments for fungal infections of the skin of the foot. **Cochrane Database Syst Rev**, 2: CD003584, 2002.

BRILHANTE R.S.N., ROCHA M.F.G., CORDEIRO R. A. *et al.* Phenotypical and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in north-east Brazil. **J Applied Microbiol**, 99:776-782, 2005.

BUTTY P., LEBECQ J.C., MALLIÉ M. and BATISDE J.M. Evaluation of the susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. **J Med Vet Mycol**, 33:403-409, 1995.

CARVALHAES J. **Micologia Médica**, 1.ed., Rio de Janeiro (R.J), Control lab, 1999.

CHADEGANIPOUR M., NILIPOUR S. and HAVAEI A. *In vitro* evaluation of griseofulvin against clinical isolates of dermatophytes from Isfahan. **Mycoses**, 47:503-507, 2004.

CHAN Y. C. and FRIEDLANDER S. F. New treatments for tinea capitis. **Curr Opin Infect Dis**, 17: 97-103, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi; approved standard, NCCLS document M38-A. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pa.

DEGREEF H.J. and DEDONCKER P.R.G. Current therapy of dermatophytosis. **J Am Academy of Dermatology**, 31 (3 pt2): 25-27,1994.

DRUTZ, D.J. *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. **Rev. Infect. Dis.**, 9(2): 392-397, 1987.

ESPINEL-INGROFF, A. Utility of mould susceptibility testing. **Curr Opin Infect Dis**, 16: 527-532, 2003.

ESTEBAN A., ABARCA M.L. e CABANES F.J. Comparison of disk diffusion method and broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **Med Mycol** 43(1):61-6, 2005.

FAVRE B., HOFBAUER B., HILDERING K.S. and RYDER N.S. Comparison of *In Vitro* activities of 17 antifungal drugs against a panel of 20 dermatophytes by using a microdilution assay. **J.Clin.Microbiol**, 41(10): 4817-4819, 2003.

FLEECE D., GAUGHAN J.P. and ARONOFF S.C. Griseofulvin versus terbinafine in the treatment of tinea capitis: a meta-analysis of randomized, clinical trials. **Pediatrics**, 114(5):1312-1315, 2004.

FERNÁNDEZ-TORRES B., CARRILLO A.J., MARTÍN E. *et al.* *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. **Antimicrob. Agents Chemother**, 45:2524-2528, 2001.

FERNÁNDEZ-TORRES B., CABANES F.J., CARRILLO-MUNOZ A.J., ESTEBAN A., INZA I., ALBARCA L. and GUARRO J. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. **J Clin Microbiol**, 40:3999-4003, 2002.

FERNÁNDEZ-TORRES B., INZA I. and GUARRO J. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibility of conidia and hyphae. **Antimicrob. Agents Chemother**, 47:3371-3372, 2003

GALHARDO M.C.G., WANKE B., REIS L.A. *et al.* Disseminated dermatophytoses caused by *Microsporum gypseum* in an AIDS patient: response to terbinafine and amorolfine. **Mycoses**, 47:238-241, 2004.

GRISEOFULVINA (oral). Farmacêutico responsável: Dra. Daniela M. Castanho. Cotia, SP: AstraZeneca do Brasil Ltda. Disponível em <http://www.astrazeneca.com.br/azws006/upload/home/bulas/fulcin.doc>. Acesso em: 13 set. 2006.

GUARRO J., LLOP C., AGUILAR, C. and PUJOL I. Comparison of *in vitro* antifungal susceptibilities of conidia and hyphae of filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother**, 41(12): 2760-2762, 1997.

GUPTA AK and KOHLI Y. *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(2): 296-305, 2003.

GUPTA A.K., KOHLI Y. and BATRA R. *In vitro* activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. **Med Mycol**, 43:179-185, 2005.

GUPTA A.K., and TU L.Q. Dermatophytes: Diagnosis and treatment. **J Am Acad of Dermatology**, 54:1050-1055, 2006.

HAINER, B.L. Dermatophyte infections. **Am.Fam. Physician**, 67(1): 101-8, 2003.

IIDA Y., OH K., SAITO M. *et al.* Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sensitive BCT method and isolation of its active compound. **J. Agric. Food Chem**, 47: 584-587, 1999.

JESSUP C.J., WARNER J., ISHAM N., HASAN I. and GHANNOUM M.A. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **J.Clin. Microbiol.**, 38(1): 341-4, 2000.

KARACA N. *In vitro* susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. **Mycology** 48: 259-264, 2004.

KASSEM M.A.A., ESMAT S., BENDAS E.R. and EL-KOMY M.H.M. Efficacy of topical griseofulvin in treatment of *tinea corporis*. **Mycoses**, 49: 232-235, 2006.

KOKJOHN K., BRADLEY M., GRIFFITHS B. e GHANNOUM M. Evaluation of *in vitro* activity of ciclopirox olamine, butenafine HCl and econazole nitrate against dermatophytes, yeasts and bacteria. **Int J Dermatol**, 42(1): 11-17, 2003.

KRAKHECKE A.G., AFONSO E., FERREIRA J. C. and CANDIDO R.C. *In vitro* susceptibility testing of *Microsporium gypseum* isolates from health cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluconazole and topical veterinarian drugs. **Mycopathologia**, 159: 377-380, 2005.

KWON-CHUNG K.J. and BENNETT J.E. **Medical Mycology**. Philadelphia, London, Lea & Febiger, 1992.

KUZUCU C., RAPINO B., McDERMOTT L. and HADLEY S. Comparison of the semisolid agar antifungal susceptibility test with the NCCLS M38-P Broth Microdilution Test for screening of filamentous fungi. **J. Clin. Microbiol**, 42(3): 1224-1227, 2004.

LACAZ C.S., PORTO E. e MARTINS J.E.C. **Micologia Médica: Fungos, Actinomicetos e Algas de Interesse Médico**. 3.ed., São Paulo, Sarvier, 1991.p 31-58.

LACAZ C.S., PORTO E., HEINS-VACCARI E.M. e MELO N. T. **Guia para identificação de fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Ed. única, São Paulo, Sarvier, 1998. p 55-73.

LIPOZENCIC J., SKERLEV M., OROFINO-COSTA R. *et al.* A randomized, double-blind, parallel-group, duration-finding study of oral terbinafine and open-label, high-dose griseofulvin in children with tinea capitis due to *Microsporum* species. **Br J Dermatol**, 146: 816-823, 2002.

MACURA A.B. *In vitro* susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a comparison of two methods. **Int J Dermatol**, 32(7):533-6, 1993.

MANAVATHU, E. K., CUTRIGHT, J., PRANATHARTHI, H., CHANDRASEKAR. Comparative study of susceptibilities of germinated and ungerminated conidia of *Aspergillus fumigatus* to various antifungal agents. **J Clin Microbiol**, 37 (3):858-861, 1999

MATSUOKA H., YOSHIKAZU I.I., TAKEKAWA Y. and TERAOKA T. Evaluation of antifungal volatile compounds on the basis of the elongation rate of a single hypha. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(12): 3779-3784, 1990.

MEZZARI A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. Mar-Apr; 40(2):71-6. 1998.

MORAIS M.S., GODOY-MARTINEZ P., ALCHORNE M.M.A. *et al.* Incidence of tinea capitis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, 162:91-95, 2006.

MOREIRA L.S. **Estudo da atividade de drogas antifúngicas através de curvas de crescimento de *Candida albicans* utilizando sistema automatizado Biocell-Tracer**. Campinas, 2003. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).

NORRIS H.A., ELEWSKI B.E., and GHANNOUM M.A. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. **J Am Acad Dermatol**, 40:S9-S13, 1999.

OH K., MATSUOKA H., SUMITA O., TAKATORI K. and KURATA H. Automatic evaluation of antifungal volatile compound on the basis of the dynamic growth process of a single hypha. **Appl Microbiol Biotechnol** 38(6):790-794, 1993^a.

OH K., MATSUOKA H., NEMOTO Y., SUMITA O., TAKATORI K. and KURATA H. Determination of anti-*Aspergillus* activity of antifungal agents based on the dynamic growth rate of a single hypha. **Appl Microbiol Biotechnol**, 39: 363-367, 1993^b.

OH K., YANG H.C., MATSUOKA A. and KURATA, H. Combined effect of amphotericin B and flucytosine on hypha growth of *Candida albicans* estimated at a single hypha level. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, 33: (3) 01-04, 1995.

PASSOS X.S., COSTA M. HASIMOTO K.L.S. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Rev Soc Br Med Tropical**, 35:19-22, 2002.

PEREA S., FOTHERGILL A. W., SUTTON D. A. e RINALDI M.G. 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, 2001.

PUJOL I., GUARRO J., GENÉ J. and SALA J. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental *Fusarium* spp. strains. **J. Antimicrob. Chemother**, 39: 163-167, 1997.

PUJOL I., CAPILLA, B., TORRES, B.F. and GUARRO J. Use of the sensitive colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J.Clin.Microbiol**, 40(1) 2618-2621, 2002.

PUTZKE J. e PUTZKE M. **Os reinos dos fungos**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 1998

SIDRIM J.J.C. and MOREIRA J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan AS, 1999.

SIDRIN J.J.C., MOREIRA J.L.B. e ROCHA M.F.B. Entendendo os ramos de interesse da micologia médica. **In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos** editors. Sidrin J.J.C. and Rocha M.F.G. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004,135-161

SIDRIN J.J.C., MEIRELES T.E.F., OLIVEIRA L.M.P. and DIÓGENES M.J.N. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. **In: Micologia Médica à luz de autores contemporâneos** editors. Sidrin J.J.C. and Rocha M.F.G. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004,135-161

SIGMA, PRODUCT INFORMATION: banco de dados. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p1274pis.pdf>

SOARES M.M.S.R. **Incidência de dermatomicose podal em diferentes classes de indivíduos e antibiograma dos fungos isolados.** São Paulo, 1993. (Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

SOARES M.M.S.R. **Tinea pedis e agentes etiológicos: avaliação terapêutica e antibiograma dos dermatófitos isolados.** São Paulo, 1998 (Dissertação de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

TAGUCHI H., MIYAJI M., NISHIMURA K. and XU, M. Studies on the synergistic effect of amphotericin B and 5-fluorocytosine on the growth rate of single hyphae of *Aspergillus fumigatus* by a biocell-tracer system. **Mycoscience**, 36: 341-344, 1995.

TEIXEIRA, A.B.A. **Identificação e avaliação de suscetibilidade a antifúngicos de fungos filamentosos isolados a partir de espécimes clínicos de pacientes com malignidades hematológicas e transplantados de medula óssea e sua correlação com isolados ambientais.** Campinas, 2001. (Tese de Mestrado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).

TEIXEIRA, A.B.A. **Avaliação de suscetibilidade a antifúngicos pelo Sistema BioCell-Tracer[®] de monitorização de crescimento de hifas de espécies de *Aspergillus* e *Fusarium*.**, 2006. (Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas).

TEIXEIRA A.B.A., MORETTI M.L., TRABASSO P., VON NOWAKONSHI A *et al.* Evaluation of *Fusarium solani* hyphae and conidia susceptibility to amphotericin B and itraconazole: study of a clinical case. **Mycopathologia**, 116 (4):291-296, 2005.

TERBINAFINA (oral). Farmacêutico responsável Marco A. J. Siqueira. Taboão da Serra, SP: Novartis Biociências S.A. Bula de remédio. Disponível em: http://pdamed.com.br/bulanv/pdamed_0001_0425.php. Acesso em: 13 set. 2006.

VENUGOPAL P.V. e VENUGOPAL T.V. Disk diffusion susceptibility testing of dermatophytes with allylamines. **Int J Dermatol**, 33(10):730-2, 1994.

WETTER T.J., HAZEN K.C. and CUTLER J.E. Comparison between *Aspergillus fumigatus* conidia and hiphae susceptibilities to amphotericin B, itraconazole and voriconazole by use of the mold rapid susceptibility assay. **Medical Mycology**, 43: 525-532, 2005.

WEI-YUN Z., GOODAY G.W. Effects of nikkomycin and echinocandin on differentiated and undifferentiated mycelia of *Botrytis cinerea* and *Mucor rouxii*. **Mycol. Res**, 96(5): 371-377, 1992.

YAMADA S., CAO J., SUMITA O. *et al.* Automatic antifungal activity analyzing system on the basis of dynamic growth process of a single hypha. **Mycopathologia**, 118: 65-69, 1992.

YOSHIDA T., UCHIDA K. e YAMAGUCHI H. An ATP bioluminescence assay applicable to rapid fluconazole susceptibility testing of dermatophytes. **Microbiol Immunol**, 41(5):377-386, 1997.

ZAITZ C., CAMPBELL I., MARQUES S., RUIZ L.R.B. and SOUZA V.M. **Compendio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro, Medsi, 1998. p.81-98.

* ABNT/NBR 6023 (AGO 2002)

8- ANEXOS

Resultados de CIM e CFM (em µg/ml) com utilização da concentração de inóculo 1×10^4 na técnica de microdiluição em caldo.

Cepas	Antifúngicos					
	Ciclopirox olamina		Griseofulvina		Terbinafina	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
LIF 64	32,0 a 64,0	128,0	16,0 a 64,0	64,0	0,04	0,01
LIF 229	1,0	4,0	1,0	1,0	0,16	0,16
LIF 412	4,0	16,0	ND	0,5	327,68	>327,68
LIF 463	4,0	4,0	ND	32,0	ND	ND
LIF 343	4,0	4,0	32,0 a 0,25	64,0	>327,68	>327,68
LIF 673	0,032 a 0,25	16,0	8,0	8,0	ND	ND

Legenda: ND: não definido.

Resultado de CIM (em µg/ml) das cepas padrão de *Candida sp* pela técnica de microdiluição em caldo.

Cepas	Antifúngicos		
	Ciclopirox olamina	Griseofulvina	Terbinafina
	CIM	CIM	CIM
ATCC 22019 (<i>Candida parapsilosis</i>)	8,0	> 640,0	> 0,128
ATCC 6852 (<i>Candida krusei</i>)	8,0	> 640,0	> 0,128
ATCC 76615 (<i>Candida albicans</i>)	4,0	> 640,0	> 0,128
ATCC 90028 (<i>Candida albicans</i>)	2,0	> 640,0	> 0,128

Informações sobre as cepas selecionadas para estudo

Cepa	Paciente	Sexo	Idade	Doença	Tratamento	Evolução
LIF64 (<i>M. gypseum</i>)	LF	Feminino	31 anos	Tinea unguium	ND	Abandono
LIF463 (<i>M. gypseum</i>)	VBL	Masculino	17 anos	Tinea unguium Tinea corporis Tinea cruris	Cetoconazol Fluconazol	Óbito
LIF229 (<i>M. gypseum</i>)	NSP	Masculino	37 anos	Tinea corporis	Terbinafina	Abandono
LIF412 (<i>M. gypseum</i>)	RFS	Masculino	10 anos	Tinea capitis	Griseofulvina	Abandono
LIF673 (<i>M. canis</i>)	ICS	Feminino	26 anos	Tinea corporis	Terbinafina	Abandono
LIF343 (<i>M. canis</i>)	MBS	Masculino	7 anos	Tinea capitis	Griseofulvina	Abandono

ND: Tratamento não descrito na pasta do paciente.