



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

LUIZ HENRIQUE DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS

DE *Trichophyton rubrum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia e Parasitologia Aplicada da Universidade
Federal Fluminense, para obtenção do Título de Mestre em
Microbiologia e Parasitologia Aplicadas.

Área de Concentração: Micologia Médica Laboratorial

Orientador: Prof. Dr. Jeferson Carvalhaes de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Murilo Neufeld

Nitéroi

2011

LUIZ HENRIQUE DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS
DE *Trichophyton rubrum* AS DROGAS ANTIFÚNGICAS PELO MÉTODO DE
DISCO DIFUSÃO**

ORIENTADOR: PROF. DR. JEFERSON CARVALHAES DE OLIVEIRA

UFF

2011



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E PARASITOLOGIA
APLICADAS

LUIZ HENRIQUE DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE AMOSTRAS

DE *Trichophyton rubrum*

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jeferson Carvalhaes de Oliveira
UFF

Prof. Dr. Otilio Machado Pereira Bastos
UFF

Prof. Dr. Paulo MurilloNeufeld
UFRJ

Nitéroi

2011

Dedicatória,

A você Dona Vera Henrique dos Santos, que contribuiu mais do que podia, para que eu me tornasse o cidadão brasileiro responsável e com alguns princípios de hombridade que enraizados me tornam um homem poderoso de espírito, e cheio de esperança para o futuro;

A vocês, Guilherme Maestrello dos Santos e Luiz Fernando Corrêia de Carvalho que são e sempre serão meus motivos de tanta luta e reflexão sobre o padrão de comportamento que devo apresentar perante a sociedade, para que possam futuramente compreender que na vida as coisas não acontecem por acaso e sim, devido a determinação que cada um apresenta perante o objetivo estabelecido.

Agradecimentos,

Primeiramente a DEUS, que felizmente permitiu a conclusão desta fase, que sem dúvida, foi muito difícil, pelos acontecimentos vividos e suportados neste período.

A Senhora Vera Henrique dos Santos, que sempre depositou total confiança em todos os meus atos e que em muitas das vezes ofereceu o seu colo para me acalantar.

Ao meu orientador, professor Jeferson Carvalhaes de Oliveira, pela paciência e por todos os conselhos dados ao longo do projeto.

Ao meu co-orientador, professor Paulo Murillo Neufeld, que me levou a conclusão do projeto, no qual angariei muita experiência observando todo o seu traquejo, nos projetos científicos realizados dentro do Laboratório

As amigas, Tiyomi Akiti e Maria da Glória, excelentes profissionais do Laboratório de Micologia Médica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF/UFRJ), que cederam algumas amostras para realização do projeto.

As excelentes profissionais do Laboratório de Micologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), que contribuíram gentilmente com algumas amostras para conclusão efetiva do projeto. São elas: Prof^a. Dr^a. Rosane Orofino Costa (Chefe do Laboratório de Micologia Médica), e as Analistas, Andrea Reis Bernardes Engemann, Ione Carlos da Silva, Claudia Maria Penna Dias e Andréa PussentVerossi.

Lista de Abreviaturas e siglas

ABD – Ágar Batata Dextrose

ANF – Anfotericina B

ATCC – American Type Culture Collection

CECON – Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico Ltda.

CET – Cetoconazol

CLOT – Clotrimazol

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

Conc. – Concentração

DMSO – Dimetilsulfóxido

FLU – Fluconazol

GPYA – Glucose Peptone Yeast- Extract Agar

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

“*in door*” – Produzido dentro do Laboratório de Micologia

ITRA – Itraconazol

KOH – Hidróxido de Potássio

mcg – Micrograma

µg – Micrograma

mL – Mililitro

mm – Milímetro

nm - Nanômetro

NCCLS – National Committee of Clinical Laboratory Standards

R - Resistente

TERB – Terbinafina

UERJ – Universidade Estadual do Rio de Janeiro

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

Vol. – Volume

RESUMO

As dermatofitoses são infecções da pele e anexos causadas por fungos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. A doença, que também é uma zoonose, está amplamente difundida na população humana, freqüentemente, causada pela espécie *Trichophyton rubrum*. Essa espécie apresenta processos crônicos de difícil erradicação, devido a sua adaptação a queratina do hospedeiro, os sítios anatômicos que esse microrganismo pode se instalar e os longos esquemas terapêuticos instituídos para retirada do agente etiológico que na maioria das vezes são abandonados pelos pacientes aumentando o surgimento de cepas resistentes. A avaliação da susceptibilidade dos dermatófitos frente às drogas antifúngicas tem sido de grande importância, tendo em vista a grande incidência de resistência nos isolados clínicos. O presente trabalho foi realizado com o intuito de se padronizar um inóculo de fungo filamentoso (dermatófito) para metodologia de difusão em ágar, que pudesse utilizar discos confeccionados no Laboratório (*in door*) e comparar a atividade desses com discos produzidos comercialmente (CECON/RJ). Foram utilizadas para este fim, 30 amostras de *Trichophyton rubrum* isoladas de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica de dois Hospitais Universitários do Estado do Rio de Janeiro. A metodologia de difusão em ágar (M51-A) foi adaptada para utilização com amostras de dermatófito. O ágar Müeller Hinton foi escolhido para realização do estudo, pois, demonstrou um excelente desempenho no desenvolvimento do inóculo preparado neste trabalho. Os discos preparados dentro do Laboratório (fluconazol 25mcg, anfotericina 100mcg, itraconazol 10mcg, cetoconazol 50mcg e clotrimazol 50mcg) apresentaram resultados compatíveis aos discos produzidos comercialmente pela CECOM/RJ. Outras concentrações dos mesmos antifúngicos foram utilizadas para confeccionar outros discos e avaliar as respostas apresentadas por estes: terbinafina 1mcg, terbinafina 30mcg e anfotericina 10mcg. Esses discos com concentrações não elaboradas comercialmente apresentaram uma resposta pertinente, compatível com as outras concentrações testadas anteriormente.

Palavras-chave: *Trichophyton rubrum*, dermatófito, teste de sensibilidade, método de difusão em ágar e antifúngicos.

AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Trichophyton rubrum* FRENTE A ANTIFÚNGICOS PELA TÉCNICA DA DIFUSÃO EM ÁGAR

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO GERAL DOS DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são um grupo de fungos altamente especializados que, através de um longo processo evolutivo, tornaram-se capazes de invadir e colonizar os tecidos queratinizados do organismo animal (AJELLO, 1974).

O processo patológico desencadeado por esses microrganismos é genericamente denominado de dermatofitose (ROBERTS *et al.*, 1984). A infecção está normalmente restrita às estruturas cornificadas superficiais como o estrato córneo da epiderme, os pêlos e as unhas (MATSUMOTO & AJELLO, 1987). Ocasionalmente, a derme e o tecido subcutâneo podem estar envolvidos (WEST & KWONG-CHUNG, 1980).

O termo dermatófito não corresponde a uma classificação taxonômica mas, sim a uma designação sob a qual estão agrupados os fungos cujas características morfológicas, fisiológicas, antigênicas e moleculares os relacionam entre si (ESTEVES *et al.*, 1977).

De acordo com Emmons (1934), três gêneros principais (*Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*), diferenciados através de seus aspectos morfológicos, compõem o grupo dos dermatófitos. Em 1957, Georg e Camp redefiniram, a partir dos estudos bioquímicos e nutricionais, as espécies aceitas na classificação de Emmons e, em 1987, Matsumoto & Ajello qualificaram e listaram as espécies de dermatófitos e fungos associados válidos atualmente.

Segundo Ajello (1962), até 1960, a taxonomia desse grupo era feita exclusivamente com base em seu estado assexuado (imperfeito ou anamórfico). Contudo, um esquema taxonômico apoiado na forma perfeita ou teleomórfica desses organismos tornou-se possível, a partir da descrição do ciclo sexuado do *Trichophyton ajelloi*, por Dawson e Gentles (1959).

Originalmente, a maioria dos dermatófitos foi descrita como Hyphomycetes (MATSUMOTO & AJELLO, 1987). Porém, com a descoberta de seu estado sexuado (perfeito ou teleomórfico), esses fungos passaram a ser classificados na família Arthrodermataceae (Ordem Onyngnales), que acomoda o gênero *Arthroderma* cujos correspondentes assexuados ou anamórficos são, os gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* (CURRAH, 1985; LECLERC *et al.*, 1994).

Takashio (1979) e McGinnis *et al.* (1980), através de estudos morfológicos e moleculares, têm demonstrado a artificialidade da distinção entre *Arthroderma* e *Nannizzia*. A idéia que esses dois teleomorfos formam um único gênero é sustentada por Weitzman *et al.* (1986) e Kawasaki *et al.* (1992) que propõe a união de ambos os taxons em torno do gênero *Arthroderma*. Apesar do relacionamento filogenético do *Epidermophyton* ser ainda desconhecido, devido a não descrição do seu estado perfeito, Kawasaki *et al.* (1992) afirmam que estudos futuros poderão demonstrar a proximidade desse com o gênero *Arthroderma*.

Segundo Matsumoto e Ajello (1987), todos os teleomorfos conhecidos das espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* são heterotáticos, ou seja, apresentam características de sexualidade masculina e feminina separadas nos indivíduos. A exceção fica por conta do *Trichophytonn geogiae* cujo teleomorfo (*Arthroderma cifferii*) é homotático, isto é, “hermafrodita”. Assim, para que ocorra cruzamento, há necessidade de dois tipos conjugantes complementares (mating types), convencionalmente designados como “+” e “-“ ou “A” e “a”(TAKASHIO, 1979).

A distribuição geográfica dos dermatófitos não ocorre de maneira uniforme (AJELLO, 1974; BLANK *et al.*, 1974). De modo geral, esses fungos são cosmopolitas (GEORG, 1960; OTCENASEK, 1978). Entretanto

determinadas espécies são regionalmente limitadas ou endêmicas (PHILPOT, 1978).

De acordo com o habitat natural, esses organismos podem ser divididos em antropofílicos, quando adaptados à queratina dos seres humanos; zoofílicos, quando adaptados à queratina dos animais; e geofílicos, quando se desenvolvem às expensas de restos de queratina presentes no solo (DVORAK & OTCENASEK, 1964; GONZÁLEZ-CABO & BÁRCENA-ASENSIO, 1996). Membros dos grupos antropofílicos e zoofílicos podem, sob certas condições, infectar outros hospedeiros além daqueles para os quais estão adaptados (KAPLAN *et al.*, 1958; GEORG, 1960). Porém, estes têm dificuldades em sobreviver e proliferar como sapróbios de solo (GRIN & OZEGOVIĆ, 1963). Alguns indivíduos do grupo geofílico não são capazes de invadir os tecidos queratinizados do homem e dos animais. As espécies geofílicas que não tem a habilidade de parasitar os organismos vivos não são patogênicas e, portanto, conceitualmente não são consideradas dermatófitos. Essas espécies devem ser simplesmente reconhecidas como membros geofílicos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (MATSUMOTO & AJELLO, 1987). Os fatores que controlam a diferenciação dos dermatófitos em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos ainda não estão bem estabelecidos (AJELLO, 1974).

As formas perfeitas de quase todos os dermatófitos são descritas, todavia, a maioria dos teleomorfos das espécies antropofílicas e zoofílicas são ainda, desconhecidas (MATSUMOTO E AJELLO, 1987). As espécies antropofílicas demonstram uma tendência a perder a sua capacidade de se reproduzir sexuadamente (TANAKA *et al.*, 1992). Provavelmente, este fato tem condicionado a inexistência de fase sexuada entre esses fungos (TAKASHIO, 1979).

O habitat dos dermatófitos tem papel significativo na epidemiologia das infecções humana e animal (GEORG, 1960). A distinção das espécies em antropofílico, zoofílico e geofílico é importante para determinação da fonte de infecção (AJELLO, 1960). Com poucas exceções, a exposição ao solo contaminado e o contato direto ou indireto com indivíduos infectados são os modos de transmissão das dermatofitoses (KAPLAN *et al.*, 1958; AJELLO,

1962). Dessa maneira, fômites que contenham resíduos infectados de pele, pêlos e unhas funcionam como importantes fontes de infecção (LOPEZ-MARTINEZ, 1986).

A transmissão da enfermidade é mediada por esporos ou propágulos cuja formação depende da fonte de infecção (EMYANITOFF & HASHIMOTO, 1979). Assim sendo, a partir de fontes sapróbias, tais como solo, a doença é transmitida aos indivíduos através dos macro e microconídios e, a partir de fontes humana e animal, através dos artrosporos (WRIGHT *et al.*, 1984; FUJITA & MATSUYAMA, 1987).

É importante reconhecer que nenhum conídio sapróbio é formado sob condições de parasitismo. Macro e microconídios podem ser produzidos em pêlos desprendidos, mas não, em pêlos vivos. Aparentemente, o mecanismo que controla a conidiogênese sapróbia é suprimido quando o dermatófito infecta os tecidos. O fungo parece ativar um mecanismo alternativo de produção de conídios que lhe permite sobreviver e se reproduzir sob as condições adversas do parasitismo. Neste estado, somente artrosporos são formados. Por sua vez, quando o microrganismo se encontra em vida livre, artrosporos dificilmente são produzidos (BARRERA, 1986; HASHIMOTO *et al.*, 1984).

Apesar dos macro e microconídios estarem relacionados à sobrevivência e propagação dos dermatófitos na natureza, os elementos patogênicos mais importantes na transmissão da infecção são os artrosporos, freqüentemente associados a situação de expoliação (FUJITA & MATSUYAMA, 1987).

Dos muitos fungos produtores de micose, somente os dermatófitos mostram uma evolução no sentido de uma existência parasitária. As espécies antropofílicas e zoofílicas provavelmente evoluíram a partir de amostras geofílicas que se associaram aos tecidos queratinizados dos organismos vivos (DVORAK & OTCENASEK, 1964). Segundo Rippon (1982), a história filogenética desses fungos, respeitadas as diversas fontes, inclui: evolução de fungos especializados do solo com habilidade queratinolítica, associação com fâneros animais e capacidade de transmitir infecções transitórias; adaptação ao crescimento em zonas queratinizadas vivas; acomodação e equilíbrio ao

hospedeiro; desenvolvimento de métodos especializados de reprodução e disseminação de um hospedeiro para o outro; e adaptação a um hospedeiro animal específico, aumentando a capacidade de sobrevivência, disseminação e a cronicidade da infecção.

O estrato córneo é estéril ao nascimento, todavia, logo é colonizado pelos microrganismos de sua microbiota natural. Os dermatófitos não fazem parte da microbiota humana, mas, podem invadir e colonizar a pele (CLAYTON & MIDGLEY, 1989; TSUBOI *et al.*, 1994). Os tecidos queratinizados podem funcionar como um ambiente favorável ao desenvolvimento desses fungos. De acordo com Tsuboi *et al.* (1994), diversos fatores estão envolvidos nesse processo: as células do estrato córneo estão mortas e distantes dos possíveis mecanismos de defesa; o estrato córneo é bem hidratado pelas glândulas sudoríparas e pela perda transepidermal de água; a temperatura da pele é mais baixa que a temperatura corporal; o pH da pele está em torno de 5,5 a 6,7; a pele é um órgão diretamente exposto ao ar atmosférico; e certos sítios anatômicos como o couro cabeludo, o espaço interdigital, a região crural e a porção distal das unhas aumentam a colonização e o crescimento dos dermatófitos. Contudo, são fatores impedientes a sobrevivência desses fungos sobre o organismo: a presença das células de Langerhans; a fagocitose dos queratinócitos; as propriedades inibitórias do suor e dos lipídios e dióxido de carbono da superfície da pele; e a característica proliferativa da epiderme.

Considerável progresso tem sido feito no estudo dos fatores que contribuem para a patogenicidade dos fungos (OGAWA *et al.*, 1992). A patogenicidade é genericamente definida como a capacidade de um microrganismo em causar doença, que poderá ou não ocorrer, dependendo do resultado da interação entre o agente etiológico e o hospedeiro (SMITH, 1977; GHANNOUM & ABU-ELTEEN, 1990). Dentre os vários fatores envolvidos na patogenicidade e virulência microbiana, a aderência aos tecidos vivos; a variabilidade fenotípica; e a produção de toxinas e enzimas estão entre os mais freqüentemente listados (KWONG-CHUNG *et al.*, 1992; GARETH-JONES, 1994).

A infectividade e a patogenicidade dos dermatófitos é caracterizada pela produção de artrosporos (RASHID *et al.*, 1993). A adereência aos queratinócitos da pele e a germinação artroconidial parecem ser cruciais para o estabelecimento da infecção. Quando ocorrem falhas no processo de aderência, a germinação não é observada e o propágulo infectante é liberado junto com o material de descamação normal da epiderme. A germinação dos artrosporos deve ser considerada como um fator de importância patogênica na dermatofitose (TSUBOI *et al.*, 1994).

Aljabre *et al.* (1992) afirmam que os artrosporos requerem alta umidade e substâncias indutoras para a germinação. A camada superficial da pele contém uma variedade de agentes químicos derivados do suor, das glândulas sebáceas e do próprio processo de queratinização. Existem ainda muitos metabólitos produzidos por bactérias a partir de lipídios e proteínas cutâneas que também são estimulantes da germinação.

Para o desenvolvimento de uma infecção ativa na pele intacta, o conídio germinante deve penetrar na camada de queratina, estabelecendo o sítio de parasitismo. Usualmente, a hifa emergente (tubo germinativo ou pró-micélio) é capaz de uma penetração tanto mecânica como enzimática (HAY *et al.*, 1988). Alguns dermatófitos produzem estruturas especializadas para favorecer a invasão (ENGLISH, 1968; KANBE & TANAKA, 1982). Várias enzimas extracelulares como proteases, lipases, fosfatases, nucleases e glicosidases são também produzidas com esse fim (CALVO *et al.*, 1986).

As enzimas proteolíticas, notadamente queratinases, colagenases e elastases, são as mais comumente implicadas na patogenia das dermatofitoses (APODACA & MCKERROW, 1989; TSUBOI *et al.*, 1989). Algumas dessas enzimas estão envolvidas na facilitação da penetração do tubo germinativo ou das hifas no tecido queratinizado; na tomada de nutrientes para o crescimento fúngico; e na produção de uma resposta imune local (CALVO *et al.*, 1985; SKOREPOVA & HAUCK, 1987). A habilidade dos dermatófitos em elaborar essas enzimas hidrolíticas *in vivo* é também um importante fator de virulência (ISENBERG, 1988).

Tsuboi *et al.* (1994) propõem os seguintes eventos na invasão e colonização do estrato córneo: aderência dos artrosporos aos queratinócitos; germinação dos artrosporos; penetração do tubo germinativo no estrato córneo; e finalmente formação de novos artrosporos. Na penetração do estrato córneo, o tubo germinativo cresce transversalmente e longitudinalmente, se ramificando em todos os sentidos. De acordo com Aljabre (1993), seis horas após a adesão, inicia-se a germinação, e sete dias depois de começado o processo, há produção dos artrosporos, completando o ciclo parasitário. A erosão superficial e a penetração radial representam a expressão morfológica da queratinólise (FILIPELLO-MARCHISIO *et al.*, 1994).

Segundo Kunert (1992), a completa hidrólise da queratina somente é conseguida após a clivagem das ligações dissulfeto que representam a principal fonte de resistência dessa escleroproteína. As queratinases são incapazes de dissolver a queratina por si só, para tanto, há necessidade de haver uma sulfólise prévia das pontes de enxofre que desnaturam a queratina e estimulam a atividade queratinolítica do fungo (KUNERT, 1972).

A hidrólise da queratina por enzimas proteolíticas é um aspecto conspícuo na patogenia das dermatofitoses. Entretanto, de acordo com os estudos de Tanaka *et al* (1992), algumas proteinases extracelulares purificadas de espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* são ativas apenas em pH neutro ou alcalino. Tendo a pele um pH fracamente ácido em sua superfície, há dúvidas se as queratinases trabalham como fatores de virulência.

As variações individuais e locais dos ambientes cutâneos podem modular a patogenicidade dos elementos fúngicos depositados sobre a epiderme (BAUDRAZ-ROSSELT & FRENK, 1990). A produção de enzimas extracelulares é dependente dos substratos acessíveis *in vivo* para o crescimento do dermatófito (BRASCH, MARTINS & CHRISTPHERS, 1991); conseqüentemente, a agressividade do fungo sobre as estruturas queratinizadas poderá ser maior ou menor, conforme o suprimento nutricional encontrado (BAUDRAZ-ROSSELT & FRENK, 1990; BRASCH, MARTINS & CHRISTPHERS, 1991).

A formação de enzimas e a habilidade de causar inflamação cutânea contribuem para espalhamento do fungo (BRASCH & ZALDUA, 1994). Como o dermatófito, em geral, não é capaz de sobreviver a uma reação inflamatória, tende constantemente a se afastar da região inflamada, fixando-se no tecido normal adjacente (JUNGERMAN & SCHWARTZERMAN, 1977).

Os dermatófitos não invadem as estruturas subepidermais, porém, produzem respostas inflamatórias definidas e reações imunes mediadas por células em todos os indivíduos normais (TANAKA *et al.*, 1992). A doença é desencadeada a partir da elaboração e secreção de substâncias tóxicas ou alergênicas que se difundem pela epiderme, atingindo a derme vascularizada que é potencialmente capaz de responder a agressão dos materiais irritantes, por meio de uma resposta inflamatória (JUNGERMAN & SCHWARTZERMAN, 1977). A resposta a infecção é extremamente variável e irá depender da interação de diversos fatores envolvidos (TANAKA *et al.*, 1992). Os processos inflamatórios e imunológicos produzidos nas áreas vivas próximas ao sítio infeccioso são incidentais e refletem a perda ou o baixo grau de adaptação entre o hospedeiro e o fungo (RIPPON, 1982).

Diferentes tipos de defesa orgânica estão implicados nas dermatofitoses. Durante a doença aguda, infiltrados neutrofilicos se desenvolvem na epiderme. Nos processos crônicos, infiltrados dérmicos de células mononucleares e algumas células linfóides epidérmicas são comuns e estão relacionadas à resposta imune celular (TANAKA *et al.*, 1992). Apesar de controverso, anticorpos circulantes e outros elementos humorais têm sido detectados no soro de animais e homens infectados (GRAPPEL *et al.*, 1974; CALDERON, HAY & SHENNAN, 1987).

Em resumo, a história natural das dermatofitoses é inicialmente a mesma, não importando a espécie envolvida. A colonização começa na camada queratinizada da pele e o resultado final da infecção irá depender do hospedeiro, da espécie fúngica e do sítio anatômico (BLANK & MANN, 1975). Entretanto, a severidade da doença está basicamente relacionada à capacidade enzimática dos dermatófitos (KASHKIN & VOEVODIN, 1976; DAS & BANERJEE, 1977).

2. DERMATOFITOSSES

2.1. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Dentro da micologia médica as dermatofitoses são classificadas de acordo com o sítio anatômico envolvido. Usa-se a palavra *tinea* com o acréscimo do termo em latim que significa o sítio anatômico no corpo do hospedeiro. Mediante esta proposta temos as seguintes manifestações clínicas: *tinea barbae* (micose da barba e bigode), *tinea capitis* (couro cabeludo, sobrancelhas e cílios), *tinea corporis* (micose na pele glabra), *tinea cruris* (virilha), *tinea favosa* (micose causada por *T. schoenleinii*), *tinea imbricata* (micose causada por *T. concentricum*), *tinea manuum* (mão), *tinea pedis* (pé), e *tinea unguium* (unhas). Vários locais anatômicos podem ser infectados por uma única espécie de dermatófito, e inúmeras espécies podem produzir lesões que através da visualização macroscópicas apresentam características idênticas. Alguns agentes apresentam uma distribuição global, tais como *T. rubrum*, enquanto que a distribuição de outros podem variar de acordo com a região analisada, como exemplo, temos o *T. concentricum* (KWON-CHUNG AND BENNETT, 1992).

A *tinea* da barba é principalmente causada por dermatófitos zoofílicos como *Trichophyton verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. mentagrophytes* var. *erinacei*. Pode levar a uma infecção leve e superficial ou até mesmo a uma foliculite pustular inflamatória (KWON-CHUNG AND BENNETT, 1992).

Tinea capitis acomete o couro cabeludo, é na maioria das vezes causada por espécies dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. A infecção pode variar de leve, quase subclínica, até formas mais agressivas com uma reação inflamatória muito intensa conhecida como *kerion*. A infecção do cabelo pode ser ectotrix (bainha de artroconídios formada do lado de fora do cabelo) ou endotrix (artroconídios formado dentro do cabelo). As duas espécies mais isoladas com um predomínio na América do Norte, Central e América do Sul são *T. tonsurans* (endotrix) substituindo *M. audouinii* (ectotrix) (RIPPON, 1988).

Tinea corporis conhecida como micose do corpo, acometendo geralmente o tronco, ombros, ou membros, e, ocasionalmente, o rosto (excluindo a região da barba), pode ser causada por qualquer fungo considerado dermatófito. A infecção pode variar de leve a grave, geralmente aparecendo como lesões anelares, avermelhadas, pruriginosas, alopecicas e com bordas elevadas (NEUFELD, 1999).

Tinea cruris é uma infecção na região da virilha, perianal, e ocasionalmente na parte superior das coxas, muito comum em homens adultos. As lesões são secas, bilaterais, com uma marginação bem visível delimitando o tecido saudável do tecido acometido. As principais espécies envolvidas são *T. rubrum* e *E. Flocosum* (LACAZ *et al.*, 2002).

Tinea favosa é um processo infeccioso causado por *Trichophyton schoenleinii*, pode acometer o couro cabeludo e a pele glabra com formação de crostas amareladas denominadas de escútuas, formada por restos epiteliais da região acometida e do micélio encontrado nos tecidos afetados. A doença é mais comum na Eurásia e na África (SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Tinea imbricata, uma infecção crônica, que pode ser classificada como uma tinea corporis, é caracterizada por anéis concêntricos de escamas sobrepostas espalhados por todo o corpo do hospedeiro. É geograficamente restrita a algumas ilhas do Pacífico, Sudeste Asiático, México, América Central e do Sul América (RIPPON, 1988). *T. concentricum*, fungo antropofílico é o único agente desta doença.

Tinea manuum, geralmente apresenta o acometimento da região palmar e interdigital. As lesões são hiperqueratóticas, difusas e unilaterais. A esmagadora maioria das infecções é causada pela espécie *T. rubrum* (LACAZ, 2002).

Na tinea pedis as solas dos pés são freqüentemente envolvidas. Na apresentação clínica observamos uma predominância na forma intertriginosa, com maceração, descamação e fissuras, principalmente nos espaços entre o quarto e o quinto dedo. Outra apresentação comum é a crônica, com lesões escamosas hiperqueratóticas que podem atingir as partes laterais dos pés (lesão tipo mocassin). Uma condição inflamatória aguda, caracterizada pela formação de vesículas, pústulas e, às vezes bolhas, é mais freqüentemente

causada por *T. mentagrophytes*. Os agentes das tinea pedis crônicas são *T. rubrum*, *T. mentagrophytes var. interdigitale* e *E. Floccosum* (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Invasão da lâmina ungueal por um dermatófito é denominada como tinea ungueal. As infecções das unhas por fungos não-dermatófitos são chamadas de onicomicoses. A última palavra é muitas vezes usada como um termo geral para uma infecção das unhas. Existem dois tipos principais de acometimento das unhas por dermatófitos: invasivo subungueal (distal e proximal) e infecção micótica superficial branca (leuconíquia tricofítica). *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, respectivamente, são os mais comuns nesta infecção (SIDRIM & ROCHA, 2004).

2.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Os dermatófitos são fungos queratinolíticos responsáveis por uma grande variedade de doenças que podem afetar a pele glabra, unhas e cabelos. Em muitos casos, o diagnóstico não é clinicamente evidente, e a análise micológica laboratorial é necessária. Isso inclui, exame microscópico direto e cultura. As amostras clínicas devem ser colhidas de acordo com a localização e características das lesões. O exame microscópico direto geralmente é realizada utilizando reagentes clarificante (KOH ou NaOH), mas sua sensibilidade pode ser bastante reforçada pelo uso de corantes como fluorocromo, vermelho de Congo ou branco de calcofluor (ABDELRAHMAN *et al.*, 2006). As Culturas são necessárias para identificação do agente, e meios de cultura específicos podem ser utilizados para separar o crescimento rápido de fungos contaminantes que podem dificultar a recuperação dos dermatófitos. A identificação em nível de espécie que pode ser útil para iniciar um tratamento adequado ou para a criação de medidas profiláticas, depende das características macroscópicas e microscópicas observadas nas culturas. Subculturas em meios que estimulam conidiação e, para algumas espécies, a produção de pigmentos, são muitas vezes necessárias. Além disso, em caso de isolados atípicos, alguns testes bioquímicos ou fisiológicos podem ser realizados, como a busca para a atividade da urease ou a perfuração do fio de

cabelo em vitro (DE KOCK *et al.*, 1995). No entanto, a sua contribuição para a identificação das espécies é bastante limitada, e o progresso é ainda necessário para o desenvolvimento de testes bioquímicos ou imunológicos permitindo uma identificação precisa a nível de espécie, enquanto se aguarda pela disponibilidade de ferramentas baseadas na biologia molecular.

Os dermatófitos são fungos queratinofílicos e queratinolíticos. Sua elevada afinidade para os tecidos queratinizados torna-os responsáveis por dermatofitoses que são micoses superficiais que afetam a pele humana (tinea facei tinea, tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis ...), unhas (onicomicose ou tinea unguium) cabelo, (tinha capitis) ou barba (tinea da barba) (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). Estas infecções são muito comuns, mas geralmente não são doenças potencialmente fatais. Dermatófitos parecem ser incapazes de provocar infecção sistêmica em pacientes imunodeprimidos, tais como pacientes neutropênicos (SINGH *et al.*, 2003). No entanto, devido a dificuldade para diferenciar clinicamente dermatofitose de outros processos micóticos semelhantes, particularmente nas unhas distróficas, é importante estabelecer biologicamente um diagnóstico preciso. Um diagnóstico definitivo de infecção por dermatófitos precisa ser feito antes do início da terapia antifúngica por causa da longa duração do tratamento e seu alto custo, e dos efeitos colaterais das drogas (ELEWSKI, 1998). Em conhecimento disso, a origem do dermatófito pode permitir a criação de medidas profiláticas, como o tratamento de animais de estimação cujos proprietários desenvolvem doenças de pele. A dificuldade no diagnóstico de dermatofitose conta principalmente com a ausência de padronização de coleta e de técnicas apuradas para obtenção dos espécimens clínicos (ROBERT & PIHET, 2008).

O diagnóstico da dermatofitose requer amostras que são coletadas corretamente. De fato, os espécimes devem ser colhidas em quantidade suficiente e tomadas a partir da borda da zona infectada. Os materiais devem ser coletados por pessoas experientes sem que haja antes um tratamento antifúngico no sítio acometido (MORIELLO, 2001). Resultados micológicos podem variar de acordo com a qualidade e quantidade de material enviado, mas algumas informações sobre o paciente também podem ser essenciais. Como nome, sexo, idade e origem étnica são requisitos normais. No entanto,

uma estadia recente ou viagens ao exterior, um contato com animais ou a prática de alguns desportos em particular também podem ser relevantes (ROBERT & PIHET, 2008). Os seguintes materiais podem ser usados para o isolamento de dermatófitos: unha, pele e pêlo. Alguns autores recomendam limpar a área da lesão com álcool antes da amostragem para remover os contaminantes, como bactérias (ELEWSKI, 1998). Devido à atração eletrostática, materiais plásticos, como placas de Petri são inadequados e amostras devem ser coletadas e enviadas em recipientes de vidro estéril. Para uma boa visualização de escamas da pele, unhas e cabelos escuros ou claros, os materiais podem ser colocados sobre um fundo com papel colorido.

Lesões da pele glabra (ringworms e lesões intertriginosas) que apresentam uma inflamação ativa serão raspadas na borda, caso contrário, elas serão inteiramente raspadas. Lâminas de bisturi e lâminas de vidro podem ser usadas, recomenda-se coletar a amostra usando uma cureta dérmica. Quando as lesões são muito inflamadas faz-se antes uma antissepsia do local, para favorecer o isolamento do agente. Em caso de foliculite, pêlos acometidos serão coletados com uma pinça estéril, por arrancamento (NEUFELD, 1999).

A importância da coleta da amostra na produtividade/positividade da cultura em onicomicose é muito importante (ELEWSKI, 1998). Métodos para a coleta de unhas infectadas diferem de acordo com o tipo de onicomicose. Em caso de onicomicose subungueal distal, amostras são normalmente obtidas, após o corte das unhas, por raspagem com uma cureta pequena ou uma lâmina de bisturi, particularmente na borda da lesão. De fato, as hifas fúngicas viáveis podem ser encontrados somente perto do leito ungueal quando onicomicose subungueal proximal é suspeita (SUAREZ, 1991). Nesse material clínico deve-se efetuar raspagens sucessivas, desprezar os primeiros raspados e coletar o material da zona de limite entre o tecido acometido e o tecido saudável (NEUFELD, 1999).

Todo o couro cabeludo é primeiramente examinado com a luz ultravioleta (lâmpada de Wood). A fluorescência de luz verde irá atestar á uma tineia microspórica, enquanto um verde escuro aparecerá na tineia favíca. A

ausência de fluorescência geralmente é observado nos processos megaspórico ou tinea com um processo infeccioso pilar endotrix. As raízes do cabelo e crostas serão arrancados da área infectada ou das grandes lesões, principalmente quando esses elementos estão brilhando com luz UV. Das lesões supuradas serão coletadas todas secreções provenientes (ROBERT & PIHET, 2008). Esse material clínico é preferencialmente coletado com uma pinça estéril (NEUFELD, 1999).

O exame direto é essencial, pois permite que o médico inicie o tratamento, enquanto se aguarda a cultura. Embora, alguns resultados falso-negativos tenham sido relatados em 5-15% dos casos na prática. De acordo com a habilidade do observador e da qualidade da amostragem, esta é uma técnica altamente eficiente para triagem (PANASITI *et al.*, 2006). O exame microscópico requer escamas muito finas ou pequenos fragmentos, que podem ser obtidos por raspagem. Alguns autores recomendam o uso de instrumentos que possam facilitar a retirada de pequenos fragmentos. Utilizando amostras finas dificulta a presença de bolhas de ar que possam interferir no exame e, portanto, facilita a investigação (WEINBERG *et al.*, 2003).

A correta visualização dos elementos fúngicos requer a clarificação do material coletado. Para tanto, os espécimes são submetidos à limpeza por reagentes que permitem a digestão da queratina. Entre estes reagentes, hidróxido de potássio 10-20% (KOH) com ou sem dimetilsulfóxido (DMSO) é o mais utilizado (LILLY *et al.*, 2006). Esse método, que é um dos mais simples e mais barato, permite uma observação imediata e é particularmente adequado para as unhas. No entanto, como a queratina é rapidamente digerida pelo KOH, um exame imediato pode ser realizado. Essa análise permitiu visualizar estruturas teciduais características encontradas nas dermatofitoses independente da espécie envolvida. Outros agentes também têm sido propostos, incluindo hidróxido de sódio 10% (NaOH) e alguns reagentes que podem ser acrescentados ao KOH para facilitar a detecção das estruturas teciduais pela microscopia (MONOD *et al.*, 1989).

A visualização dos elementos fúngicos no exame direto às vezes é difícil, principalmente em amostras com estruturas fúngicas insuficientes e para

os profissionais inexperientes. A coloração pode aumentar a sensibilidade do exame direto, facilitando a visualização de estruturas fúngicas. Vários corantes podem ser usados associados a agentes clarificantes. Por exemplo, Chlorazol preto E (CBE)(Sigma-Aldrich) cora apenas as estruturas dos fungos e exclui muitos artefatos. Parece, no entanto, que é mais útil para leveduras do que para os fungos filamentosos (LILLY *et al.*, 2006). Da mesma forma, Tinta Blue permanente (Parker Quink) Cora os elementos fúngicos em azul. Mas estas colorações não são específicos e alguns artefatos (Mosaico fúngico) podem se comportar como elementos fúngicos. A coloração PAS, pode ser adaptado para digerir escamas epidérmicas no exame direto e ao mesmo tempo apresentar uma coloração que aumente a sensibilidade do exame direto. O vermelho de Congo é um corante que pode ser usado no exame direto para aumentar sua eficácia. Esse corante se liga a polissacarídeos da parede celular de fungos, principalmente β D-glucanas, e, portanto, facilita a detecção de elementos fúngicos (SLIFKIN & CUMBIE, 1988). Da mesma forma, a detecção de fungos, hifas e esporos é facilitada pelo uso de fluorocromos como branco calcofluor. Branco de Calcofluor permite um rápido e preciso diagnóstico de dermatomicose. Elementos fúngicos na coloração com branco de calcofluor aparecem em azul/esverdeado quando se utiliza um microscópio de fluorescência equipado com um filtro de excitação de 330-380nm. No entanto, a fluorescência verde pode ser observada com fluoresceína pelo sistema de filtragem. Os elementos fúngicos corados com branco de calcofluor são facilmente identificados, mesmo para os profissionais que não apresentam tanta experiência, particularmente em espécimens de espessura considerável, tais como amostras de unhas (ABDELRAHMAN *et al.*, 2006).

A histologia pode ser útil para onicomicose e micoses profundas. O exame histológico de unha através de biópsias coradas com PAS parece ser o método mais sensível para o diagnóstico da onicomicose. Hifas aparecem de cor vermelha dentro do tecido do hospedeiro. No entanto, os resultados dependem da apresentação clínica da onicomicose e da quantidade de amostra. Resultados falso-negativos são observados principalmente em infecções das unhas antes que a infecção fúngica ocorra na lâmina ungueal. A histopatologia apresenta uma boa sensibilidade mas, a utilização da cultura é

indispensável para identificação do agente etiológico em questão (WEINBERG *et al.*, 2003).

A cultura é um complemento valioso e muitas das vezes obrigatório para direcionar os agentes dentro do Laboratório de Micologia. O isolamento do patógeno pela cultura e sua identificação a nível de espécie, não pode ser alcançada pelo exame direto ou histopatologia, essa identificação é importante uma vez que a profilaxia e terapia podem variar dependendo da espécie. Além disso, em caso de onicomicose ou tinea capitis, a confirmação do diagnóstico pode também ser útil para motivar o paciente para realização da longa terapia antifúngica (DE KOCK *et al.*, 1995). Como a pele, unhas e o cabelo podem conter muitas bactérias ou conídios de fungos saprófitas, o uso de um meio seletivo é essencial. Ágar Sabouraud contendo (cloranfenicol ou gentamicina) e cicloheximida (actidione) é comumente utilizado como meio de isolamento primário. Os antibióticos que inibem o crescimento de muitas espécies de bactérias e a incorporação de cicloheximida no meio de cultura vai impedir o crescimento dos fungos filamentosos contaminantes, mas também de algumas leveduras que possam dificultar a recuperação dos dermatófitos (NEULFELD, 1999). Culturas podem ser feitas em placas de agar ou tubos inclinados, de acordo com as práticas do laboratório. Agar em tubos inclinados será preferido para o transporte ou prolongamento da incubação. É aconselhável não fechar a rosca do tubo com muita força, já que os dermatófitos são organismos aeróbios. A semeadura será realizada usando a alça em “L”, e o material será depositado em vários pontos da placa ou do tubo. Quando poucas escamas estão disponíveis, uma semeadura diretamente no agar com uma alça é aconselhável pois, a cultura é mais sensível que o exame direto. Culturas são geralmente incubadas entre 20-30° C. As culturas precisam ser examinadas pelo menos duas vezes por semana, uma vez que algumas características morfológicas podem aparecer transitoriamente, tais como a presença de pigmento vermelho em *Trichophyton rubrum*. O atraso para o crescimento ou desenvolvimento dos dermatófitos varia de acordo com a espécie. As colônias de *Epidermophyton floccosum* ou *Microsporum gypseum* são identificadas em 5-7 dias, enquanto uma incubação mais longa (1 ou 2 semanas) será necessária para outras espécies de dermatófitos. As colônias

típicas são observadas em 3-4 semanas. O meio de teste para dermatófito (DTM) representa uma alternativa para o isolamento (TAPLIN *et al.*, 1969). Devido a mudança de coloração do meio pelos produtos alcalinos que são gerados no desenvolvimento dos dermatófitos. No entanto, alguns fungos não-patogênicos apresentam resultados falso-positivos e falso-negativos para algumas espécies, tais como *Microsporum persicolor* no caso de contaminação por bactérias. Além disso, o indicador de cor pode alterar o crescimento da colônia e o aspecto microscópico do fungo. Em vez de agar Sabouraud, alguns laboratórios usam também ágar batata ou agar batata com cicloheximida e cloranfenicol para isolamento primário, estes meios induzem uma pigmentação rápida de *T. rubrum* (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). Em paralelo ao meio seletivo, ágar Sabouraud tem que ser usado para isolar fungos sensíveis a cicloheximida, incluindo fungos como *Scytalidium dimidiatum* e algumas leveduras patogênicas, principalmente nas unhas das mãos que apresentam uma alta incidência de acometimento por leveduras devido a microbiota (ELEWSKI, 1998). Culturas podem permanecer negativas, apesar da positividade do exame direto. Estes resultados falso-negativos podem estar relacionados a uma quantidade insuficiente de material ou um espécimen pobre em elementos fúngicos, mas também para um tempo de incubação que pode ser muito curto, ou uma não-adequada temperatura ou a presença de contaminantes que pode impedir o desenvolvimento do patógeno. Resultados falso-negativos em ágar Sabouraud pode também resultar de um tratamento antifúngico iniciado antes da amostragem. Muitas drogas antifúngicas atualmente utilizado para o tratamento das dermatofitoses são retidas por muito tempo dentro da camada córnea da epiderme, e resíduos da droga na amostra pode inibir a crescimento do patógeno. Um novo meio contendo lecitina e polissorbato 80 foi desenvolvido, o que minimiza o efeito dos antifúngicos encontrados ainda no espécimens clínicos (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Este meio chamado CDSAM (Desativadores combinados suplementados em ágar) é empregado ultimamente para recuperação de dermatófitos em amostras clínicas de pacientes, que tenham recebido tratamento prévio sem o isolamento do agente infeccioso fúngico (ADACHI & WATANABE, 2007).

A recuperação de fungos de culturas associadas a um exame direto positivo não permite determinar o diagnóstico de micose, com pequenos

fragmentos da pele podem conter material de dermatófitos mortos e sua superfície pode estar colonizada por fungos contaminantes. De fato, até 20% de amostras clínicas de pacientes com unha ungueal contém fungos contaminantes associados a um dermatófito, o que torna difícil o seu isolamento. No entanto, embora incomum, infecções mistas podem ocorrer, e a presença de alguns fungos de crescimento rápido podem dificultar a recuperação de dermatófitos que muitas vezes são menos suscetíveis aos antifúngicos (SUMMERBELL, 1997). Portanto, um dos grandes problemas na dermatomicose causada por fungos contaminantes, como *Scopulariopsis*, *Aspergillus* ou *Acremonium* é estabelecer a patogenicidade do fungo isolado. Assim, o diagnóstico tem que ser confirmado pelo isolamento da mesma espécie a partir de amostras sucessivas do sítio acometido (SUMMERBELL *et al.*, 2005). Existem poucas chances de recuperar novamente o "mesmo contaminante" quando a amostragem é repetida, mas muitos não conseguem compreender esta técnica (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Cepas típicas de dermatófitos podem ser identificadas diretamente de culturas primárias, mas subculturas em meios específicos são necessárias. Apesar do agar de Sabouraud ser a referência para o isolamento de dermatófitos, a maioria destes fungos não esporulam neste meio, o que torna necessário o uso de meios de cultura específicos para identificação. Vários meios específicos são utilizados para estimulação da conidiação e às vezes produção de pigmentos (ROBERT & PIHET, 2008). O agar lactrimel borelli (BLA) e agar batata dextrose (PDA) são os mais amplamente utilizados. O BLA aumenta a esporulação para a maioria dos dermatófitos, mas também favorece a produção de pigmentos para *T. rubrum* e *Microsporum canis* (KAMINSKI, 1985). O PDA também é útil para a detecção de pigmento. Em PDA, *M. canis* desenvolve seu pigmento amarelo e, portanto, pode ser facilmente distinguido de *Microsporum audouinii*. A conidiação também pode ser estimulada em meio de cultura pobre como meio de Baxter, meio de Takashio (Sabouraud diluído), ágar malte ou ágar-água. Ágar peptona extrato de levedura (PYE) suplementado com antibióticos para inibir o crescimento de bactérias é um meio nutricionalmente enriquecido que favorece o crescimento da maioria dos fungos. A diferenciação entre *M. Persicolor* e *T. mentagrophytes* pode ser

facilitada pela subcultura do isolado em 3% de peptona no meio ("Sabouraud conservação"). Após a incubação por uma semana, as colônias de *M. persicolor* apresentam uma coloração rosa salmão, enquanto que culturas de *T. mentagrophytes* permanecem brancas (NEUFELD, 1999). Púrpura de bromocresol (BCP) é usado em alguns laboratórios. Este meio apresenta uma coloração azulada dentro de 4-7 dias na presença de *T. mentagrophytes*, o que permite de maneira mais facilitada a diferenciação com *T. rubrum* e *M. persicolor* (SUMMERBELL *et al.*, 1988). Crescimento em solo autoclavado com grãos de arroz pode ser utilizado para a diferenciação entre *M. Audouinii* e cepas atípicas de *M. canis*. Enquanto que um crescimento limitado e a produção de um pigmento marrom é observado para *M. audouinii* sobre este substrato, *M. canis* cresce bem e produz um pigmento amarelo difusível (PIPKIN, 1952). Em alguns casos a morfologia por si só não apresenta fundamentação necessária para a identificação de algumas espécies de dermatófitos, sendo assim, faz-se necessário a realização de provas complementares/fisiológicas que possam concretizar o reconhecimento da espécie em questão (SHADOMY & PHILPOT, 1980).

Alguns dermatófitos são capazes de hidrolisar altas concentrações de uréia. A atividade da enzima urease em agar uréia é útil para diferenciar *T. rubrum* (urease -) de *T. mentagrophytes var. interdigitale* (urease +) (KANE & FISCHER, 1971; PHILPOT, 1965). Da mesma forma, a maioria das cepas de *T. soudanense* são urease negativa, enquanto que os resultados são variáveis para o lento crescimento das espécies como *T. verrucosum* ou *T. violaceum* (WEITZMAN & ROSENTHAL, 1984).

Fora do hospedeiro, alguns dermatófitos são capazes de penetrar e invadir a medula do pêlo, produzindo órgãos perfurantes especializados, enquanto que outras espécies apresentam um crescimento externo (AJELLO & GEORG, 1957). Neste teste é recomendado o uso de cabelos claros ou loiros para facilitar a visualização dos órgãos de perfuração que apresentam diversas perfurações cônicas ao longo do fio de cabelo. O teste *in vitro* permite a diferenciação entre isolados de *T. rubrum* (não apresentam órgãos perfurantes) e isolados de *T. mentagrophytes* que produzem órgãos de perfuração em 8-15 dias. Também pode ser útil para a distinção entre cepas atípicas de *M. canis*

(teste positivo) e *M. audouinii* ou *M. equinum* (teste negativo) (PADHYE *et al.*, 1980).

Os Dermatófitos são espécies heterotáticas. Assim, para obter uma reprodução sexuada, é necessário confrontar cepas da mesma espécie. Para observar o teleomorfo (gênero *Arthroderma*) entre as espécies dos gêneros de *Microsporum* ou *Trichophyton*, cepas de referência com as suas devidas polaridades complementares conhecidas são necessárias. Takashio ou De Vroey (sementes *Guizotia abyssinica*) meios de cultura pobres que estimulam a reprodução sexuada dos dermatófitos são utilizados. As cepas a serem testadas são inoculados em duas placas separadas perto de uma cepa de referência ou cepa controle com sua polaridade conhecida. Se os dois isolados pares são da mesma polaridade ou filogeneticamente independentes, as colônias permanecem separadas por uma zona clara. Quando os pares são compatível, ascocarpos estéreis são observados na linha de contato entre as duas cepas. Se as cepas compatíveis são pares da mesma espécie, numerosos ascos globosos com gimnotécio contendo 8 ascósporos cada estrutura, são produzidos. Este teste permite a diferenciação de cepas de *M. gypseum* de *Microsporum fulvum*, bem como de *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (TAKAHASHI *et al.*, 2002).

Muitas espécies de dermatófitos são heterotróficos para alguns aminoácidos ou vitaminas. Usa-se para diferenciar algumas espécies o cultivo em meios com ausência desses componentes essenciais (STOCKDALE, 1953). Requisitos nutricionais são determinados pela comparação do crescimento em meio de cultura controle ou em meio enriquecido com vitaminas ou aminoácidos específicos importantes para o desenvolvimento das espécies de dermatófitos. Inositol, tiamina, ácido nicotínico e histidina são testados em agar caseína base (DE HOOG *et al.*, 2002). *T. verrucosum* e *T. concentricum* necessitam para o crescimento de tiamina e inositol. A assimilação de sorbitol também é usada para diferenciar *T. rubrum* (positivo) de *T. Mentagrophytes* (negativo) (REZUSTA *et al.*, 1981).

2.3. TRATAMENTO DAS DERMATOFITOSE

O Tratamento das infecções por dermatófitos envolve principalmente as formulações orais e / ou tópicas de azóis ou alilaminas, particularmente itraconazol e terbinafina. A medicação tópica aplicada uma ou duas vezes por dia é o principal esquema de tratamento indicado para tinea corporis / cruris, tinea pedis e manuum. O uso de antifúngicos por via oral pode ser válido quando se observa uma tinea crônica com extenso comprometimento tecidual ou quando a aplicação de um antifúngico tópico não é possível. Na tinea unguium e tinea capitis, as terapias orais são os tratamentos primários prestados. Atualmente, as formulações tópicas de amorolfina e ciclopirox foram aprovadas para uso em casos mais leves de tinea unguium. A recaída da infecção continua sendo um problema, particularmente na tinea pedis e tinea unguium. O acompanhamento adequado durante o tratamento, o correto uso do esquema terapêutico e uma boa higiene dos sítios anatômicos acometidos são passos fundamentais para que haja uma terapia eficaz (GUPTA *et al.*, 2003).

Os dermatófitos podem infectar os seres humanos em todo o mundo, com variada frequência e ampla epidemiologia. No entanto, os métodos de tratamento são semelhantes em todo o mundo, e modernos medicamentos antifúngicos podem proporcionar um tratamento eficaz para a maioria das apresentações das dermatofitoses (LOO, 2006).

Há poucos novos medicamentos disponíveis para tratamento das infecções por dermatófitos. A maioria dos agentes, mesmo quando novos, continuam a ser das duas principais famílias de drogas antifúngicas, os azóis e as alilaminas. As equinocandinas representam uma nova classe e atualmente são utilizadas apenas para infecções invasivas por *Candida* e *Aspergillus* (LECHA *et al.*, 2005).

Medicação tópica aplicada uma ou duas vezes por dia é o tratamento primário indicado para tinea corporis, tinea cruris, tinea pedis e tinea manuum. Ultimamente, muitos agentes tópicos estão disponíveis em gel, creme, loção, shampoo e outras formulações (TARO, 2005; BERTEK, 2002). Muitos dos agentes utilizados são da família dos "azoles" (clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazole, tioconazol, etc...). Terbinafina e naftifine representam a família das 'alilaminas'. Ambas as famílias das drogas são conhecidas por sua alta eficácia contra as diversas manifestações clínicas das dermatofitoses. Ainda temos, amorolfina e butenafina que são antifúngicos populares classificados como derivados morfolínicos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

As taxas de cura de tinea corporis / tinea cruris / tinea pedis são elevadas, com resolução das infecções com 2-4 semanas de terapia tópica. Não se observa efeitos tóxicos que preocupem a classe médica na administração desses antifúngicos. A maioria dos eventos adversos após a aplicação tópica de drogas são reações da pele no local da aplicação, que são leves e transitórios (GUPTA *et al.*, 2003).

As infecções mistas contendo dermatófitos e bactérias podem ocorrer em alguns casos de dermatofitoses, principalmente na tinea pedis. Assim, um agente antifúngico tópico fornecendo atividade antifúngica e antibacteriana pode ser desejado, e muitos agentes disponíveis têm este efeito de amplo espectro. Da mesma forma, a inflamação é um componente de algumas dermatofitoses, e existem antifúngicos tópicos que fornecem atividade antiinflamatória e antifúngica.

Para tinea ungueal e tinea capitis, as terapias orais são os principais tratamentos, embora haja evidências que alguns agentes tópicos são eficazes e menos graves com relação aos efeitos tóxicos. Assim sendo, os antifúngicos tópicos, ciclopirox e amorolfina, foram aprovados para tratamento da onicomicose. Formulações orais de itraconazol e terbinafina são os medicamentos mais comuns utilizados na tinea unguium. Griseofulvina

desempenha um grande papel no tratamento de tinea capitis, embora seu uso tenha sido substituído em outras áreas por itraconazol e terbinafina (ROBERT & PIHET, 2008). Os antifúngicos por via oral podem estar associados com algum potencial de toxicidade e possíveis interações medicamentosas (LAMISIL, 2005; SPORANOX, 2006 e GRISEUOFULVIN, 2004). Os antifúngicos por via oral geralmente não são aprovados para uso em crianças, uso pediátrico tem sido documentada amplamente na literatura médica para inúmeras indicações, e tem tipicamente fornecido perfis de segurança semelhante ao utilizado em adultos (GUPTA *et al.*, 2003). Suspensões orais são disponíveis para muitos dos antifúngicos utilizados nas diversas dermatofitoses, fornecendo uma aplicação facilitada em crianças, no entanto, os perfis farmacológicos de suspensões orais podem diferir da dosagem da cápsula e ou comprimido. Terbinafina oral é indicada para o tratamento de adultos com onicomicose por dermatófitos. Testes sanguíneos das transaminases, isto é, a alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) são sugeridos antes de começar tratamentos orais com a terbinafina e devem ser realizados periodicamente durante a terapia (LAMISIL, 2005). Terbinafina não é recomendada para pacientes com doença hepática pré-existente (LAMISIL, 2005; GUPTA & RYDER, 2003). O itraconazol oral está indicado para o tratamento de adultos com onicomicose por dermatófitos e para micoses sistêmicas tais como a blastomicose, histoplasmose e aspergilose. A monitorização da função hepática devem ser realizada, e testes são necessários quando existe qualquer anormalidades pré-existentes da função hepática ou experiência anterior de toxicidade hepática com outros medicamentos (SPORANOX, 2006). Itraconazol é metabolizado através das enzimas hepáticas, portanto, tem potencial para interações medicamentosas, limitando seu uso em alguns pacientes. Itraconazol é proibido em pacientes que apresentam disfunção ventricular (SPORANOX, 2006). As cápsulas devem ser tomados depois de uma das refeições tradicionais da cultura do paciente (GUPTA & RYDER, 2003). O fluconazol oral está indicado para o tratamento

de (1) candidíase vaginal, (2) candidíase orofaríngea, candidíase esofágica e (3) meningite criptocócica (DIFLUCAN, 2004). Embora não seja especificamente indicado para infecção por dermatófitos, fluconazol tem sido agente de sucesso para todos os tipos de dermatofitoses superficiais, principalmente tinea capitis. Algumas interações medicamentosas podem acontecer na administração do fluconazol por via oral. Nesse contexto faz-se necessário a monitorização/acompanhamento dos pacientes que recebem esquemas terapêuticos com esse antifúngico (DIFLUCAN, 2004).

Griseofulvina oral é indicada para o tratamento de tineas que acometem a pele, cabelo e unha (GRISEOFULVIN, 2004). A griseofulvina deve ser utilizada quando antifúngicos tópicos não apresentam uma resposta satisfatória em infecções superficiais. O cetoconazol oral está indicado para o tratamento de pacientes com dermatofitose cutâneas graves recalcitrantes, infecções que não respondem a terapia tópica e oral com griseofulvina, ou que são incapazes de tomar griseofulvina, o cetoconazol tem sido associado com um potencial muito grande de danos ao fígado (AZOLES, 2005). Pacientes em uso de cetoconazol oral devem ser testados para detectar sinais de disfunção do fígado antes do início da terapia. Durante a terapia, os pacientes devem ser cuidadosamente monitorizados para sinais de hepatotoxicidade (AZOLES, 2005).

TRATAMENTO DE TINEA PEDIS / TINEA MANUM

Os antifúngicos tópicos de terbinafina, butenafina, miconazol, econazol, cetoconazol, clotrimazol, oxiconazole e ciclopirox são as preparações tópicas mais utilizadas no tratamento de tinea pedis e tinea manuum (PADHYE & WEITZMAN, 1998). Formulações tópicas podem ser usadas nas apresentações mais brandas e limitadas. Muitos agentes tópicos (por exemplo, nitrato de miconazol 1%, ciclopirox olamina 1%, o cloridrato de

naftifine 1%, nitrato de sulconazol 1%) fornecem atividade antibacteriana e podem ser preferidos quando existe a possibilidade da suspeita de uma infecção mista com bactérias. Formulações que permitam uma aplicação ao dia, do que, duas vezes por dia (por exemplo, naftifine creme 1%, bifonazol 1%, creme de cetoconazol 2%) pode ajudar a adesão do paciente ao tratamento e uma maior eficácia do mesmo nos processos infecciosos.

A infecção crônica pode justificar o uso da via oral, particularmente se os regimes tópicos anteriores falharem. Uso de itraconazol oral, terbinafina ou fluconazol pode ser prático, onde ocorra envolvimento extenso e a aplicação tópica não é possível (GUPTA *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que terbinafina e itraconazol por via oral podem apresentar tratamentos eficazes, e uma maior taxa de cura é observada com alilaminas tópicos do que com azóis tópicos (CRAWFORD, 2003). Terbinafina 250 mg / dia é usada para tinea pedis com uma duração de 2-6 semanas (GUPTA, 2003). Regimes de itraconazol 100 mg / dia para 30 dias ou quatro semanas, 400 mg por dia durante uma semana, e 200 mg / dia por 2-4 semanas têm sido relatados (GUPTA *et al.*, 2004). A dose de fluconazol para tinea pedis mais freqüentemente usada é de 150 mg administrado uma vez por semana por 2-6 semanas (FAERGEMANN, 1997).

Griseofulvina oral é aprovada para o tratamento de tineas/infecções que não respondem satisfatoriamente a antifúngicos tópicos, a griseofulvina tem menor eficácia do que os antifúngicos mais recentes. Têm espectro estreito (somente em dermatófitos), que pode ser uma limitação devido, muitas infecções fúngicas apresentarem infecções bacterianas ao mesmo tempo (GUPTA *et al.*, 2003). A administração da griseofulvina em tinea pedis é de 660 ou 750 mg por dia durante 4-8 semanas (GUPTA *et al.*, 2003). O uso de cetoconazol comprimidos não é muito utilizado devido aos efeitos colaterais tóxicos, principalmente a nível hepático (AZOLES, 2005; GUPTA *et al.*, 2003;).

A prevenção da reinfecção é muito importante, a educação do paciente sobre higienização adequada dos pés é essencial. Os pacientes devem evitar andar descalços em áreas comuns, como banheiros, chuveiros ou áreas de natação, e assegurar que os pés fiquem completamente secos após o contato com a água (GUPTA, 2005). Calçados completamente fechados não devem ser usados por muito tempo, ou esses sapatos devem ser alternados a cada 2-3 dias, com mudanças frequentes de meia para reduzir a umidade (GUPTA, 2005).

TRATAMENTO DE TINEA CORPORIS / TINEA CRURIS

Terapias tópicas para o tratamento de tinea corporis e tinea cruris incluem a terbinafina, butenafina, econazol, miconazol, cetoconazol, clotrimazol e ciclopirox (TRENT *et al.*, 2001). Formulações tópicas podem erradicar as menores áreas de infecção, mas a terapia oral pode ser exigida quando grandes áreas estão envolvidas ou onde a infecção é crônica ou recorrente (GUPTA *et al.*, 2003).

Uso de antifúngicos orais são práticos onde o envolvimento é extenso e a aplicação tópica não é viável (GUPTA, 2004). Os antifúngicos orais itraconazol, terbinafina e fluconazol são utilizados com sucesso no tratamento da tinea corporis e tinea cruris. Terbinafina 250 mg / dia tem sido utilizada em um regime de 2-4 semanas (GUPTA *et al.*, 2003). O itraconazol de 200 mg / dia por uma semana é recomendado, embora um regime de 100 mg / dia durante duas semanas também é eficaz (DE DONCKER *et al.*, 1997; PARENT *et al.*, 1994). A dose de fluconazol para tinea corporis e tinea cruris é de 150-300 mg administrado uma vez por semana de 2-4 semanas (GUPTA *et al.*, 2003). Esses agentes orais têm preferência sobre o cetoconazol, devido ao potencial hepatotóxico (GUPTA *et al.*, 2003). Griseofulvina, quando é utilizada para essas indicações, a dose sugerida é de 250 mg duas vezes ao dia até

atingir a cura (GUPTA, 2004). Quando o cetoconazol é o antifúngico escolhido, a posologia sugerida é 200-400 mg por dia durante 4-8 semanas (AZOLES, 2005).

TRATAMENTO DE TINEA CAPITIS

Ao contrário das outras dermatofitoses, na tinea capitis a monoterapia não é indicada. Terapia oral é necessária para tratar adequadamente tinea capitis, por ela ser capaz de penetrar no eixo dos cabelos infectados onde terapias tópicas não podem chegar. Antifúngicos tópicos, tais como xampus antifúngicos (cetoconazol, sulfeto de selênio, povidona, piritionato de zinco) podem ser utilizados como terapia adjuvante com ou sem antifúngicos para evitar a reinfecção ou para tratar portadores assintomáticos (GUPTA *et al.*, 2005; ROBERTS & FRIEDLANDER, 2005).

Griseofulvina é o único tratamento antifúngico oral aprovado para uso em tinea capitis na América do Norte; Contudo, o uso da terbinafina, itraconazol, fluconazol também são relatados extensivamente na literatura médica. Os perfis de eficácia e segurança de terbinafina, itraconazol, fluconazol são semelhantes ao de griseofulvina, estes são utilizados quando griseofulvina não apresenta uma resposta terapêutica eficaz. Itraconazol, terbinafina e fluconazol apresentam um menor período de duração de tratamento em comparação com a griseofulvina (GUPTA & SUMMERBELL, 2000). As dosagens são calculadas de acordo com o peso do paciente, infecções por *Microsporum* exigem uma dosagem maior do que as infecções por *Trichophyton*, aumentando assim a duração do tratamento (LIPOZENCIC *et al.*, 2002). Existem algumas suspensões pediátricas que são formuladas para melhorar a aceitação das crianças ao tratamento como griseofulvina, itraconazol, fluconazol. Os comprimidos de terbinafina e griseofulvina podem

ser esmagados, e as cápsulas de itraconazol podem ser abertas. Esses antifúngicos podem ser adicionados a alimentos como manteiga e amendoim (TOSTI *et al.*, 2003).

Além da Griseofulvina outros antifúngicos podem ser utilizados no tratamento de tinea capitis. A terbinafina, itraconazol, fluconazol sugerem uma dosagem de 20-25 mg / kg /, por 6-12 semanas (ROBERTS & FRIEDLANDER, 2005). A suspensão oral de griseofulvina contém 125 mg por 5 ml. O tratamento deve ser continuado por duas semanas após a resolução dos sintomas clínicos. Taxas de cura micológica e as taxas de terapia eficaz são geralmente elevadas, sendo na faixa de 80-95% e 88-100% (GUPTA *et al.*, 2004).

A dose diária de terbinafina para tinea capitis é baseada no peso (menos de 20 kg = 62,5 mg; 20-40 kg = 125 mg; maior que 40 kg = 250 mg por dia). A duração da terapia é geralmente 4 semanas, apesar de períodos mais curtos se mostrarem eficazes (CHAN & FRIEDLANDER, 2004; HAROON *et al.*, 1996). Doses mais elevadas ou um aumento na duração do tratamento são necessários para infecções por *M. canis* (ROBERTS & FRIEDLANDER, 2005).

Regimes contínuos de itraconazol são utilizados para tratar tinea capitis. O regime contínuo é de 5 mg / kg / dia durante 4 semanas. A dosagem da solução oral é reduzida para 3 mg / kg / dia (GUPTA *et al.*, 1998). Um número limitado de estudos têm mostrado que a terapia com fluconazol 6 mg / kg / dia com duração de 2 - 3 semanas podem efetivamente tratar tinea capitis (GUPTA & SUMMERBELL, 2000). Um estudo comparativo de 5 mg / kg / dia por quatro semanas, demonstrou eficácia semelhante à griseofulvina 6 mg / kg / dia por 6 semanas (DASTGHAIB *et al.*, 2005). Uma vez que a terapia semanal com fluconazol para Tinea capitis também pode ser eficaz (MONTERO, 1998).

A transmissão da infecção de pacientes portadores assintomáticos tem sido uma preocupação para os médicos que tratam esses pacientes com tinea

capitis. Terapias adjuvantes podem ser fornecidas aos pacientes e familiares para controlar a transmissão. Frequentemente as infecções podem iniciar a partir do contato com animais. Pacientes e familiares devem ser aconselhados a evitar compartilhar itens como bonés, pentes, brinquedos, chapéus, pentes, travesseiros, cobertores, tesouras e etc (GUPTA *et al.*, 2005). A maioria dos médicos concordam que as crianças infectadas não precisam ser mantidos fora da escola quando o tratamento é iniciado na crianças, especialmente nas classes onde os alunos apresentam uma faixa etária maior, onde existe pouco contato físico entre os alunos (ROBERTS & FRIEDLANDER, 2005).

TRATAMENTO DE TINEA UNGUIUM (ONICOMICOSSES)

Onicomicose subungueal distal-lateral é de difícil cura e apresenta alta taxa de recorrência (GUPTA & SCHER, 1997). Unhas das mãos apresentam maiores taxas de sucesso do que as unhas dos pés devido a taxas mais rápidas de crescimento e regimes de dose sugeridos (NOBLE *et al.*, 1998).

Muitas unhas não conseguem recuperar sua aparência normal quando essas apresentam uma infecção crônica. Além disso, a recorrência da infecção é observada frequentemente. O crescimento das unhas devem ser avaliados, e as expectativas do paciente devem ser analisadas, para que o paciente entenda que o sucesso do tratamento não ocorre rapidamente, que o acompanhamento a longo prazo é necessário para percepção de recaídas nas fases iniciais.

A adequada higiene das unhas pode ajudar a prevenir a reinfeção. Os pacientes devem evitar andar descalços em áreas comuns, como banheiros, chuveiros, ou áreas de natação, e garantir que os pés estejam bem secos após o banho ou natação (GUPTA *et al.*, 2005). As unhas devem ser mantidas curtas e limpas. Os sapatos devem se ajustar corretamente e as meias devem ser feitas a partir de material absorvente como o algodão. A desinfecção de

meias e sapatos deve ser realizada, e a lavagem das meias deve ser realizada com água e detergente a temperatura de 60° C (SEEBACHER, 2007).

TERAPIA TÓPICA

Terapia tópica pode ser indicada para casos de infecção leve a infecção moderada, onde a matriz ungueal não está envolvida, e poucos dedos são afetados (LECHA *et al.*, 2005). Poucos efeitos adversos são esperados em comparação com a terapia oral (LECHA *et al.*, 2005). Dois medicamentos tópicos formulados como esmaltes podem proporcionar uma boa penetração na camada ungueal e são aprovados para uso na onicomicose como monoterapias: ciclopirox e amorolfina (BARAN & KAOUKHOV, 2005). Os esmaltes são formulações superiores a outras formulações tópicas, como os veículos voláteis deixam uma camada oclusiva de filme da droga concentrada na unha, proporciona um gradiente de droga fixo (BARAN & KAOUKHOV, 2005). Juntamente com este tratamento tópico podemos empregar uma terapia oral quando muitos dedos estão acometidos ou quando a matriz ungueal estiver acometida.

Ciclopirox solução esmalte 8% é utilizado para onicomicose moderada e deve ser aplicado uma vez por dia durante 48 semanas, embora alguns estudos mostraram sucesso com utilização menos frequente (por exemplo, 3 vezes por semana) (BARAN & KAOUKHOV, 2005; PENLAC, 2006). Seu uso não está associado com qualquer dos potenciais efeitos adversos que podem ocorrer com antifúngicos por via oral (PENLAC, 2006). Amorolfina esmalte 5% é utilizada como monoterapia em onicomicose leves sem o envolvimento da matriz ungueal. A aplicação é tipicamente uma ou duas vezes por semana, por 6-12 meses. Principais ensaios indicaram que amorolfina 5% apresenta taxas de cura micológica de 60-76%. (GUPTA *et al.*, 2003 & GUPTA *et al.*, 2004). Embora as taxas de cura micológica sejam razoáveis, as taxas de sucesso

global podem ser bastantes menores (BARAN & KAOUKHOV, 2005). A monoterapia tópica com terbinafina ou azóis não apresenta resultados eficazes em situações mais graves, especialmente quando a matriz ungueal está envolvida (WARSHAW & ST CLAIR, 2005).

TERAPIA ORAL

Apesar da griseofulvina ser aprovada para as diversas tineas e onicomicoses, a sua afinidade com a queratina é baixa e isso faz com que se tenha um período muito longo de tratamento (GUPTA & RYDER, 2003). A eficácia no tratamento de onicomicose também é baixa, e novos azólicos e agentes alilamínicos substituíram a griseofulvina para esta indicação (GUPTA & RYDER, 2003) . O cetoconazol não é recomendado para a terapia de onicomicose, devido os efeitos tóxicos hepáticos (GUPTA & RYDER, 2003). Fluconazol tem alta eficácia e baixas taxas de recaída (TRENT *et al.*, 2001). Os regimes de terapêutica oral para onicomicose são : terbinafina 250 mg / dia durante 12 semanas (unhas) e itraconazol 200 mg duas vezes ao dia como terapia de pulso (um pulso: Uma semana de itraconazol, seguido de 3 semanas sem itraconazol), utilizando 2-3 pulsos (dois pulsos: unhas das mãos; três pulsos: as unhas dos pés) (SEEBACHER *et al.*, 2007). Uso de esquemas pulsados de terbinafina tem sido sugerido como um método para melhorar o perfil de segurança da terbinafina oral; no entanto, ao contrário de itraconazol, a eficácia da terbinafina pulsada não foi comprovada (SIGURGEIRSSON *et al.*, 2006)

COMBINAÇÕES TERAPÊUTICAS

As taxas de cura para a onicomicose são inferiores as desejáveis, em muitas das vezes apresenta uma recidiva nos tratamentos bem sucedidos

(FINCH & WARSHAW, 2007). Tem-se sugerido que antifúngicos por via oral com diferentes mecanismos de ação sejam utilizados concomitantemente com antifúngicos de uso tópico para aumento da eficácia e da relação custo-benefício. A monoterapia nas onicomicoses não apresenta resultados satisfatórios (GUPTA & COOPER, 2008)

3.2. MECANISMO DE RESISTÊNCIA

A definição típica de resistência ao longo da história da humanidade, é pontuada como persistência de crescimento de um microrganismo apesar da terapêutica antimicrobiana instituída ser apropriada. Essa resistência, também está relacionada com o uso indevido de antifúngicos, pelo abandono da parte do paciente de um esquema terapêutico instituído para uma determinada infecção fúngica. Esse comportamento do hospedeiro contribui para o surgimento de cepas mais resistentes, que se aproveitam do reconhecimento do mecanismo de ação da droga utilizada de maneira inadequada anteriormente. A resistência *in vitro* de um isolado pode ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca permite que todos os membros normais de uma espécie tolerem uma droga em particular. A resistência adquirida é um termo usado quando uma cepa resistente emerge de uma população que foi anteriormente sensível aquele antifúngico (HAYES & WOLF, 1990). Sabemos que existe uma baixa frequência de mutação genética nos isolados fúngicos estudados atualmente. A pressão seletiva exercida pelo uso constante de antifúngicos seleciona eventual cepas resistentes que se tornarão predominantes na população. Com surgimento de cepas resistentes, que passaram pelo processo de seleção através da constante exposição ao antifúngico, surge um problema, essa cepa não desaparecerá com a retirada da exposição do antifúngico. A mesma continuará distribuída no meio podendo apresentar processos infecciosos de difícil erradicação.

Vários mecanismos bioquímicos contribuem para o surgimento de resistência a drogas antifúngicas, o mais os freqüentes envolvem uma diminuição na absorção de drogas, alterações estruturais dos sítios alvos e um aumento das atividades das bombas de efluxo das drogas. No entanto, outros mecanismos moleculares podem ser envolvidos na expressão da resistência por microrganismo. É importante lembrar, que mais de um mecanismo pode oferecer um processo de resistência em uma única cepa. O que pode dificultar ainda mais, a erradicação do agente etiológico em um processo fúngico infeccioso (HAYES & WOLF, 1990).

Nos dermatófitos os principais mecanismos de resistência observados principalmente, na espécie *Trichophyton rubrum* são: Modificação da enzima

alvo, efluxo das drogas do interior do microrganismo, resposta celular ao estresse e mecanismo alternativo de resistência a terbinafina (MARTINEZ-ROSSI *et al.*, 2008).

3.3. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE

Testes destinados a determinar a quantidade mínima de droga necessária para inibir o crescimento de cepas fúngicas em cultura (concentração inibitória mínima ou MIC) geralmente são usados para determinar a eficácia relativa dos diferentes agentes antifúngicos e detectar o desenvolvimento de organismos resistentes as diversas drogas disponíveis (WARNOCK, 1999). No entanto, o valor do MIC para qualquer droga depende da qualidade da amostra, quantidade de inóculo, composição e pH do meio, temperatura e tempo de incubação das drogas, solvente e curva de crescimento do isolado clínico avaliado (ALIO, 2005). Além disso, esporulação/conidiação de alguns dermatófitos é muito pobre em comparação com outros fungos. O M38-A2 (Método de Referência de Diluição em Caldo para Teste de Sensibilidade em Fungos Filamentosos – CLSI/2008) estipula quais são os parâmetros que devem ser seguidos para uma boa reprodutibilidade do teste no laboratório quando se utiliza fungos filamentosos diversos e dermatófitos (CLSI, 2008). A correlação entre os dermatófitos *in vitro*, MICs e os resultados clínicos ainda não está bem elucidada (GHANNOUM *et al.*, 2006). Testes de sensibilidade sistemáticos de isolados clínicos de pacientes com onicomicoses, que falharam com a terapia utilizando terbinafina, não revelaram qualquer correlação entre o MIC da terbinafina e as falhas clínicas apresentadas (MUKHERJEE *et al.*, 2003).

Na verdade, muitos trabalhos nos quais utilizaram isolados clínicos de dermatófitos, e para este teste confeccionaram um inóculo com hifas como também, com diversos tipos de esporos não apresentaram uma boa correlação nos resultados expressos. Sendo assim faz-se necessário a especialização de centros de referência para que possam realizar quando solicitados os testes de susceptibilidade em caldo para avaliação da susceptibilidade das cepas isoladas dentro de Unidades Médicas.

No Laboratório de Micologia de Rotina o melhor método reprodutível e o da difusão em ágar utilizando disco de papel de filtro. Essa metodologia ainda não foi padronizada. Vários autores salientam sobre a dificuldade de se padronizar um inóculo para este teste. Nesta metodologia muitos preferem trabalhar com inóculos obtidos a partir de microconídios. Algumas espécies de dermatófitos já respondem melhor com os macroconídios. Mesmo assim, em todos os trabalhos existe uma busca constante no tocante a se padronizar/definir um inóculo que possa apresentar um crescimento satisfatório e expressar resultados que possam se correlacionar com os aspectos clínicos.

4. *Trichophyton rubrum*

O gênero *Trichophyton* apresenta em sua micromorfologia um padrão que acompanha todas as espécies que compõem este grupo: grande quantidade de microconídios de forma arredondada ou claviforme e disposição peculiar nas hifas, associados a poucos macroconídios em forma de clava, divididos por septos finos e transversais, com superfície externa lisa (SIDRIM & ROCHA, 2004).

A espécie *T. rubrum* quando semeada em meios de cultura que favorecem o seu desenvolvimento, apresenta características bem marcantes que ajudam na sua identificação laboratorial. No Ágar de Sabouraud apresenta um crescimento considerado intermediário, as colônias apresentam características de maturação em torno de 12-16 dias após a semeadura primária. As colônias caracterizam-se por uma textura algodonosa ou velutosa, com pregas radiais, formando uma pequena saliência no centro. O reverso da colônia apresenta, com o passar do tempo, uma coloração avermelhada, podendo, em algumas cepas, observar diferentes matizes do castanho; esse pigmento é geralmente difusível no meio. A microscopia revela uma grande quantidade de microconídios delicados, regulares e piriformes, muitas vezes dispostos em acladium. Os macroconídios, quando presentes, podem apresentar-se como clavas alongadas, quase com um aspecto cilíndrico e com duas a nove septações. Na identificação dessa espécie, muitas vezes é necessário lançar mão de provas complementares, pois, nem sempre as

características morfológicas são suficientes para realizar uma identificação fidedigna. Para isso, faz-se necessário, a utilização de provas complementares como: a utilização do ágar fubá com 1% de dextrose para observação da distribuição difusível do pigmento que a mesma produz e o não desdobramento da uréia presente no Agar Ureia de Christesen, pela falta da enzima urease nesse microrganismo).

É um agente do grupo dos dermatófitos considerado antropofílico (adaptado á queratina humana), que ultimamente têm apresentado alta incidência nas micoses humanas em diversos sítios anatômicos (ZAITZ *et al.*, 1998; PADILLA *et al.*, 2002). Este microrganismo pode desenvolver micoses em humanos e esporadicamente causar processos infecciosos em animais, sendo a dermatofitose por este agente considerada uma zoonose (SEEBACHER *et al.*, 2008).

Nas dermatofitoses humanas o *Trichophyton rubrum* aparece em determinadas regiões como o agente mais isolado nos processos infecciosos superficiais, seguido do *Trichophyton mentagrophytes* e do *Microsporum canis* (ARAÚJO *et al.*, 2009). Embora inúmeros relatos da ocorrência das dermatofitoses no país, alguns autores salientam que o *Trichophyton rubrum* juntamente com o *Trichophyton mentagrophytes* são as espécies mais freqüentemente isoladas nos processos infecciosos humanos, apresentando diversas manifestações clínicas características desses agentes (COSTA *et al.*, 2002; REZENDE *et al.*, 2008). Esse microrganismo é responsável por mais de 50% das dermatofitoses em humanos (HANDMAN, 2005).

Nas diferentes manifestações clínicas várias áreas do corpo são acometidas. O *trichophyton rubrum* é considerado o dermatófito mais isolado das onicomicoses, tinea corporis, tinea cruris, tinea manuum e tinea pedis conforme salientado por Foster (2004).

Nas manifestações clínicas das dermatofitoses, a *tinea unguium* (acometimento das unhas) e a *tinea pedis* (acometimento somente dos pés) são os principais processos envolvendo o *Trichophyton rubrum* (FOSTER *et al.*, 2004). As ferramentas medicamentosas existentes não apresentam uma resposta favorável frente a esses processos crônicos, tornando assim a

retirada do agente etiológico uma manobra muito difícil. Existe uma avaliação quantitativa quanto ao fracasso no tratamento de determinados processos crônicos ungueais, mostrando que essa realidade de tratamento e cura não é tão efetiva (TORRES, 2005).

5.0 Discussão:

A orientação do esquema terapêutico para tratamento das diversas manifestações das dermatofitoses pode ser planejada, a partir do antifungigrama, que é um parâmetro importante a ser analisado, pois, mostra o comportamento do agente etiológico frente a diversas drogas antifúngicas de várias classes com concentrações distintas. Com isso, a comunidade médica poderá alcançar um maior índice de cura quando estiver tratando esses processos infecciosos fúngicos, que ultimamente estão assolando de forma esmagadora a população em todo o mundo.

O método de disco-difusão é considerado um teste de triagem que apresenta resultados compatíveis com os métodos de diluição em caldo, que são considerados teste de referência, nos quais existem uma padronização bem fundamentada. Ao contrário, do método de disco-difusão que ainda não apresenta uma padronização para os dermatófitos.

No mercado brasileiro existem empresas que fornecem os discos com substâncias fungicidas e fungistáticas impregnadas para realização da técnica de disco-difusão. Neste estudo os discos contendo as drogas antifúngicas foram provenientes da CECON - Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. Muitos antifúngicos utilizados pela classe médica para tratamento das dermatofitoses, ainda não são confeccionados por esta empresa, o que não permitiu uma avaliação prévia do comportamento do agente etiológico estudado frente a todos os antifúngicos utilizados na terapêutica com suas concentrações distintas.

Existem diversos fatores que preocupam os micologistas quanto à realização do teste de sensibilidade para os dermatófitos através da técnica de disco-difusão. São estes, a incapacidade desse grupo de fungos de se desenvolverem rapidamente, a variedade morfológica de esporos produzidos por esse grupo de fungos, fotossensibilidade das drogas, entre outros. Mas, a principal preocupação conforme salientada por diversos autores (NWEZE *et al.*, 2010) é a padronização do inóculo que será utilizado nesta técnica.

Na padronização do inóculo para o teste de sensibilidade através da técnica de disco-difusão, existem algumas metodologias que podem ser empregadas para tal. Até o presente momento as principais metodologias para padronização do inóculo referente aos dermatófitos são: espectrofotometria, escala de Mac Farland, e a contagem na câmara de Neubauer (JESSUP *et al.*, 2000).

A falta de padronização do inóculo para este teste, infelizmente, não permiti que esta técnica seja confiável, pois, ainda não existe um protocolo que permita a avaliação por diversos Laboratórios para que se faça uma comparação dos resultados encontrados. Essa técnica além de ser de fácil realização, a mesma apresenta custos bem reduzidos para sua completa realização (NWEZE *et al.*, 2010).

Nesse estudo, diversos procedimentos micológicos foram utilizados para favorecer a utilização da técnica de disco-difusão. As amostras foram reidentificadas utilizando-se diversas etapas para assegurar a identificação dos isolados de *Trichophyton rubrum*. Todos os isolados foram submetidos a análise morfológica, análise fisiológica e produção de pigmentos (HOOG *et al.*, (2000; MENEZES & SILVA, 2006; REBELL & TAPLIN, 1979). Ao final das análises, os isolados foram criopreservados em glicerina para avaliações futuras (TEDESCHI & DE PAOLI, 2011).

Para confecção do inóculo, os esporos menores, produzidos pelos isolados foram as estruturas utilizadas para realização do teste de sensibilidade pela técnica de disco-difusão, deu-se preferência pela utilização dos esporos da metodologia de Santos & Hamdan (2005), que prioriza a utilização dos

microconídios, desprezando as outras estruturas formadas no crescimento do micélio vegetativo e reprodutivo.

Nosso estudo mostrou que existe uma relação muito estreita para confecção do inóculo quando se utiliza as seguintes metodologias: 1) turbidez frente a escala de Mac Farland com leitura em espectrofotômetro (M38-A, NCCLS, 2002), 2) Contagem de esporos através da câmara de Neubauer (PETRIKKOU *et al.*, 2001) e crescimento das colônias compatíveis com as contagens. As metodologias citadas acima, quando analisadas comparativamente apresentaram resultados compatíveis na produção do inóculo.

Quando a densidade óptica das amostras foi ajustada para variar em torno de 0,150 a 0,199 no filtro de 530 nanômetro no espectrofotômetro SP-22 da marca BIOSPECTRO. Verificou-se na câmara de Neubauer uma contagem de conídios entre 299 – 355 UFC/mL. Nessa faixa o número de colônias não passou de 100 UFC/mL. O inóculo com essas características não apresentou um bom padrão de crescimento no Ágar Müeller Hinton. Na segunda tentativa, com o intuito de se padronizar um inóculo que pudesse atender a metodologia de disco-difusão, a densidade óptica das amostras foi ajustada para variar em torno de 0,200 a 0,299 no filtro de 530 nanômetro no spectrofotômetro SP-22 da marca BIOSPECTRO. Verificou-se na câmara de Neubauer uma contagem de conídios entre 383 – 534 UFC/mL. Nesta faixa o número de colônias não passou de 150 UFC/mL e não ficou abaixo de 100 UFC/mL. O inóculo com essas características apresentou um bom padrão de crescimento no Ágar Müeller Hinton.

O Ágar Müeller Hinton foi o meio de cultura escolhido por não dificultar a difusão das drogas antifúngicas e ser amplamente utilizado na rotina laboratorial. O procedimento de preparo e estocagem seguiu a técnica padrão para estocagem e prazo para utilização do documento consultado do CLSI (M51-A CLSI, 2010).

Seguindo as informações do documento de referência para teste de sensibilidade pela técnica de disco-difusão para fungos filamentosos não-dermatófitos, a temperatura de incubação foi respeitada e mantida 30° C com

variação de 2° C tanto para mais como para menos neste estudo (M51-A CLSI, 2010). O tempo de incubação preconizado ficou em 72 horas, com observação da formação do halo de 24 em 24 horas.

Na avaliação da atividade de todos os discos seguiu-se o recomendado por Sejas *et al.*, com relação as distâncias de 30mm entre um disco e outro (centro a centro dos discos) e de 15mm da margem da placa, para que se impedisse a superposição dos halos de inibição formados. Na avaliação dos discos produzidos no Laboratório (Terbinafina de 1mcg e 30mcg) não foi possível seguir o que foi recomendado anteriormente. Os halos formados referentes à Terbinafina 1mcg e 30mcg foram superiores aos discos com as suas drogas antifúngicas e concentrações pré-estabelecidas, o que impossibilitou a avaliação desses discos na mesma placa de petri contendo Ágar Müeller Hinton. Foi necessário avaliar os discos de Terbinafina de 1mcg e 30mcg separadamente em placa de petri 150X15mm contendo Ágar Müeller Hinton, no qual observamos halos superiores a 43,00mm, o que também foi encontrado por alguns autores (HILDA, 2007). No início das avaliações utilizamos vários discos na mesma placa de petri de 150X15mm contendo Ágar Müeller Hinton, com essa sistemática não foi possível observar a formação dos halos. Essa sistemática de distribuição dos discos é preconizada pelo documento de referência para esta metodologia (M51-A CLSI, 2010). Provavelmente, nesse momento ocorreu uma confluência ou superposição dos grandes halos formados, o que não permitiu uma boa visualização dos mesmos. Nesta fase do estudo não se tinha nenhuma base dos tamanhos de halos que essas concentrações impregnadas nestes discos poderiam apresentar. Foi pensado, que os cálculos das concentrações dos discos não foram efetuados corretamente. Posteriormente, colocamos os discos nas placas isoladas e observamos que os halos formados de terbinafina de 1mcg e 30 mcg foram de 43,27 `mm á 91,98 mm. Observou-se que tanto os discos de terbinafina de 1mcg como o de 30 mcg, apresentam uma formação de halo frente os isolados de *Trichophyton rubrum* com uma atividade bem significativa, mostrando que esses isolados podem ser sensíveis a essas concentrações quando se padronizar definitivamente esta metodologia e puder fazer uma

comparação dos resultados encontrados a técnica de microdiluição, que é considerada padrão-ouro.

Nesse estudo conseguimos mensurar os halos com as concentrações de terbinafina de 1mcg e de 30mcg principalmente, diferindo do que alguns inicialmente comentaram sobre a dificuldade de avaliar a atividade de um disco com essa concentração de antifúngico (VIVAS & TORRES-RODRIGUEZ, 2001).

Esses resultados mostram que estudos futuros devem ser realizados com o intuito de incluir as concentrações de terbinafina para teste de sensibilidade através da disco-difusão frente aos isolados de *Trichophyton rubrum*. Quando se tem a oportunidade de produzir o disco para teste de sensibilidade dentro do Laboratório, esta produção “in door” agiliza e facilita a confecção do teste, como também, favorece a confecção de discos em diversas concentrações que podem posteriormente serem testadas para melhorar a pesquisa da dosagem terapêutica padrão para as diversas micoses superficiais que podem acometer humanos e animais. Vale ressaltar, que essas concentrações avaliadas formam halos bem extensos quando testadas frente ao *Trichophyton rubrum*. Esses comprometem uma grande área da superfície do ágar, isso faz com que os discos necessitem de uma placa isolada para tal, para que não ocorra sobreposição dos halos das drogas impregnadas. Para isso pode-se utilizar uma única placa de petri 150X15mm para o teste de sensibilidade e podemos incluir uma outra placa para controle de crescimento do inóculo produzido para o teste. Esta segunda placa, não precisa necessariamente ser do mesmo tamanho que a primeira. Importante lembrar, que as placas utilizadas nestes testes isolados são importantes quando não se conhece o comportamento dos discos produzido, mostrando que ao se conhecer o comportamento/tamanho do halo que o mesmo apresentará este disco pode ser incluído em uma placa que avaliará vários discos frente um único isolado.

Todos os isolados de *Trichophyton rubrum* do estudo apresentaram halos maiores que 35mm para as duas concentrações de terbinafina utilizadas (1mcg e 30mcg). De acordo com alguns autores, halos maiores que 35mm

para estas concentrações, mostram que os isolados são considerados sensíveis devido a avaliação feita em paralelo através da microdiluição que é a metodologia de referência para avaliação da sensibilidade (HILDA, 2007).

Para a validação da técnica de disco-difusão faz-se necessário a comparação dos resultados com a metodologia de referência. Nesse estudo não foi possível realizar tal comparação, necessitando de avaliações posteriores para tal ajuda na padronização desta técnica metodológica.

Até o momento não existe nenhum método de referência para avaliação das diversas concentrações de terbinafina frente os isolados de *Trichophyton rubrum*.

A confecção dos discos neste estudo mostrou ser um procedimento muito seguro, que pode ser desenvolvido em um laboratório de rotina que realiza testes de sensibilidade pela técnica de disco difusão. Foram comparados neste trabalho os tamanhos dos halos formados pelos discos adquiridos da CECON e os discos confeccionados dentro do Laboratório. As tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 mostram que não existe uma diferença, que possa impossibilitar a confecção dos discos “*in door*”. Ao contrário, esta prática vai ajudar o laboratorista conhecer melhor o padrão de resposta ativa das diversas drogas aos inúmeros isolados que o mesmo possa manipular. Esse hábito pode diminuir bastante os custos do Laboratório e agilizar a confecção dos testes.

O nosso principal objetivo foi ajudar a comunidade científica a aperfeiçoar esta metodologia, que no momento é a ferramenta mais cabível para os laboratórios de rotina avaliarem a resposta de uma droga frente ao agente etiológico fúngico, que necessita de uma abordagem terapêutica.

Estudos envolvendo este assunto são necessários para que se possa conhecer os perfis de sensibilidade de diversos isolados frente as concentrações de diversos antifúngicos, que precisarão ser estabelecidos. Com certeza a evolução da resposta clínica terapêutica dependerá de certa forma, desses estudos que poderão desvendar outros fatores importantes que

ajudarão na definição do comportamento de diversos fungos, que hoje estão causando infecções de difícil erradicação nos hospedeiros humanos.

6.0 Conclusões:

- O método de disco-difusão, empregando ágar Müller-Hinton e disco com drogas impregnadas dentro do Laboratório permitiu identificar perfis distintos de sensibilidade à drogas antifúngicas nos isolados clínicos de *Trichophyton rubrum*. Os discos confeccionados dentro do Laboratório apresentaram uma atividade compatível, bem próxima da atividade apresentada pelos discos adquiridos da CECON/RJ.

- A padronização do inóculo apresentada neste trabalho permitiu uma boa visualização dos halos de leitura em todos os discos contendo antifúngicos utilizados neste estudo. Na técnica de disco-difusão para espécie *Trichophyton rubrum* vários antifúngicos de diversas classes podem ser ensaiados utilizando-se a contagem da câmara na Neubauer, espectrofotometria e contagem de colônias em ágar para padronização do inóculo.

- A metodologia de disco-difusão com a padronização do inóculo, permitiu a avaliação da atividade dos antifúngicos com concentrações que são utilizadas nos tratamentos das micoses superficiais e não são confeccionados pela CECON/RJ. Como Terbinafina 1mcg, terbinafina de 30mcg e Anfotericina de 10 mcg.

- Os testes de difusão em ágar com diferentes antifúngicos e espécies presumidamente sensíveis devem ser realizados de forma que se respeite o espaço entre os discos, assim permitindo a apresentação nítida sem interferências dos halos de leitura de cada antifúngico.

- O método de disco-difusão é de fácil utilização e implantação, podendo ser uma ferramenta útil quando se possui profissionais habilitados e treinados

para utilizá-la. Essa ferramenta no momento é a mais adequada para utilização em Laboratórios que apresentam uma alta rotina e que não podem realizar ainda a microdiluição por falta de tempo e mão-de-obra especializada. Esses Laboratórios que apresentam esse tipo de serviço, podem ainda funcionar como apoio diagnóstico para Centros de Tratamento Dermatológico.

- A confecção dos discos dentro do Laboratório pode diminuir bastante o custo desta técnica. Sendo assim, essa produção *“in door”* pode facilitar e aprimorar os testes de sensibilidade que não ficaram dependentes de concentrações estipuladas por fabricantes, podendo cada vez mais avaliar a resposta de diversas concentrações utilizadas na clínica médica frente a diversas cepas fúngicas.

7. Referência Bibliográfica

ABDELRAHMAN, T.; LETSCHER BRU, V.; WALLER, J.; NOACCO, G. & CANDOLFI, E. Dermatomycosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails. *J Mycol Med.* 2006;16:87–91.

ADACHI, M. & WATANABE, S. Evaluation of combined deactivators-supplemented agar medium (CDSAM) for recovery of dermatophytes from patients with tinea pedis. *Med Mycol.* 2007;45:347–9.

AJELLO, L. & GEORG, L. In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Mycopathol Mycol Appl.* 1957;8:3–17.

AJELLO, L. Geographic distribution and prevalence of the dermatophytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.89, p. 30-38, 1960.

AJELLO, L. Present day Concepts of the dermatophytes. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 17, n. 4, p. 315-322, 1962.

AJELLO, L. Natural history of dermatophytes and related fungi. *Mycopathology e Mycology Applicata*, De Haag, v. 17, n.4, p.93-110, 1974.

ALJABRE, S. H. M.; RICHARDSON, M. D.; SCOTT, E. M. & SHANKLAND, G. S. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human stratum corneum *in vitro*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 30, p. 145-152, 1992.

APODACA, G. & MCCERROW, J. H. Regulation of *Trichophyton rubrum* proteolytic activity. *Infection and Immunity*, v. 57, p. 3081-3090, 1989.

ARAÚJO, C.R.; MIRANDA, K.C.; FERNANDES, O.F.L.; SOARES, A.J. & SILVA, M.R.R. - In vitro susceptibility testing of dermatophytes isolated in Goiania, Brazil, against five antifungal agents by broth microdilution method. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 51(1): 9-12, 2009.

AZOLES-KETOCONAZOLE. In: AHFS Drug Information_2005. Bethesda, MD, 2005, American Society of Health-System Pharmacists, Inc., p. 510–6.

BADILLET, G. Dermathophyties et dermatophytes. *Atlas Clinique et biologique*, 3^a Ed. Paris: Varia, 1991.

BAUDRAZ-ROSSELET, F. & FRENK, E. “*In vitro*” nail invasion by pathogenic and non-pathogenic fungi under different culture conditions. *Mycoses*, Berlin, v. 33, p. 553-557, 1990.

BARAN, R. & KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19:21–9.

BARRERA, C. R. Formation and ultrastructure of of *Mucor rouxii* arthrospores. *Journal of Bacteriology*, Washington, v. 55, p. 886-895, 1983.

BARRERA, C. R. Formation and germination of fungal arthroconidia. *Critical Reviews in Microbiology*, Boca Raton, v.12, p. 271-292, 1986.

BARROS, M.E.S.; SANTOS, D.A. & HAMDAN, J.S. - Evaluation of susceptibility of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum* clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). *J. Clin. Microbiol.*, 56: 514-518, 2007.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* V. 45, n. 4, p. 493-496, apr. 1966.

BERTEK. Pharmaceuticals Inc. Mentax__{TC} (butenafine HCl) cream, 1%. Prescribing information. Research Triangle Park, NC, USA, October 2002.

BLANK, F. MANN, J. & PEALE, P. A. Distribution of dermatophytosis according to age, ethnic group or sex. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v.12, p. 352-361, 1974.

BLANK, F. & MANN, J. *Trichophyton rubrum* infections according to age, anatomical distributions and sex. *British Journal of Dermatology*, v.92, p. 171-174, 1975.

BRASCH, J.; MARTINS, B. S. & CHRISTOPHERS, E. Enzyme RELEASE BY *Trichophyton rubrum* depends on nutritional conditions. *Mycoses*, Berlin, v. 34, p. 365-368, 1991.

BRASCH, J. & ZALDUA, M. Enzyme patterns of dermatophytes, *Mycoses*, Berlin, v. 37, p. 11-16, 1994.

CALDERON, R. A.; HAY, R. J. & SHENNAN, G. I. Circulation antigens and antibodies in human and mouse dermatophytosis: use of monoclonal antibody reactive to phosphorylcholine like epitopes. *Journal of General Microbiology*, v. 133, p. 2699-2705, 1987.

CALVO, M. A.; BRUGUERRA, T.; CABANES, F. J.; TRAPE, J. & ABARCA, L. Brief Communication: Extracellular enzymatic activities of dermatophytes. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 92, p. 19-22, 1985.

CALVO, M. A.; TRAPE, J.; ABARCA, L.; CABANES, F. J.; CALVO, R. M. & BRUGUEREA, T. Variability of biochemical characteristics in strains of *Trichophyton mentagrophytes*. *Mycopathologia*, Den Haag, v. 93, p. 137-139, 1986.

CHAN, Y. & FRIEDLANDER, S. F. New treatments for tinea capitis. *Curr Opin Infect Dis*. 2004;17:97–103.

CLAYTON, Y. M. & MIDGLEY, G. Identification of agents of superficial mycoses. In Evans, E. G. V., Richardson, M. D. eds. *Medical Mycology: A practical Approach*. Oxford, IRLPress, pp. 65-95, 1989.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard – second edition M-38A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard - M-38A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002a.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Proposed standard M-38P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1998.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-27A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1997.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth

dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – second edition M-27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2002b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard – third edition M-27A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008b.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Proposed standard M-27P. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 1992.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Third informational supplement M-27S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2008c.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved standard M-44A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2004.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Zone diameter interpretative standards, corresponding minimal inhibitory concentration (MIC) interpretative breakpoints, and quality control limits for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Second informational supplement M44-S2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2007.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of nondermatophyte filamentous fungi. Approved standard M-51A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa., 2010.

COSTA, M.: PASSOS, X. N.; HASIMOTO E SOUZA, L. K.; BORGES MIRANDA, A. T.; LEMOS, J. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G. & RODRIGUES SILVA, M. R. Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiânia, GO, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 35(1): 19-22, jan-fev, 2002.

CRAWFORD, F. Athlete's foot. In: Williams H, Bigby M, Diepgen T, Herxheimer A, Naldi L, Rzany B, editors. Evidence based dermatology. London: BMJ Books; 2003. p. 436–40.

CRAWFORD, F. & HOLLIS, S. Topical treatments for fungal infections of the skin and nails of the foot. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007 Jul 18;(3):CD001434.

CURRAH, R. S. Taxonomy of the Onygenales: Arthrodermataceae, Gymnoascaceae, Myxotrichaceae and Onygenaceae. *Mycotaxon*, Ithaca, v. 24, p. 1-126, 1985.

DAS, S. K. & BANERJEE, A. B. Phospholipid turnover in *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v. 15, p. 99-102, 1977.

DASTGHAIB, L.; AZIZADEH, M. & JAFARI P. Therapeutic options for the treatment of tinea capitis: griseofulvin versus fluconazole. *J Dermatolog Treat*. 2005;16:43–6.

DAWSON, C. O. & GENTLES, J. C. Perfect states of *Keratinomyces ajelloi*. *Nature*, v. 183, p. 1345-1346, 1959.

DE DONCKER, P. GUPTA, A. K. & MARYNISSEN, G. Itraconazole pulse therapy for onychomycosis and dermatomycoses: an overview. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37:969–74.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE, J. & FIGUERAS, M. J. *Atlas of clinical fungi*. 2nd ed. Utrecht/Reus: Centraalbureau voor Schimmelcultures /universitat Roviar i Virgili, 2002; 1126 pp.

DE KOCK, C. A.; SAMPERS, G. H. & KNOTTNERUS, J. A. Diagnosis and management of cases of suspected dermatomycosis in The Netherlands: influence of general practice based potassium hydroxide testing. *Br J Gen Pract*. 1995;45:349–51.

DIFLUCAN_ (fluconazole tablets) (fluconazole injection—for intravenous infusion only) (fluconazole for oral suspension) Prescribing information. Pfizer Inc, August 2004.

DVORAK, J. & OTCENASEK, M. Geophilic, zoophilic and anthropophilic dermatophytes. A review. *Mycophatology & Mycology applicata*, Den Haag, v. 23, p. 294-296, 1964.

ELEWSKI B. E. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:415–29.

EMMONS, C. W. Dermatophytes natural based on the form of the spore and accessory. *Archives of Dermatology and Syphilology*, Chicago, v. 30, n.3, p. 337-362, Sep. 1934.

EMYANITOFF, R. G. & HASHIMOTO, T. The effects of temperature and incubation atmosphere and medium composition on arthrospore formation in the fungus *Trichophyton mentagrophytes*. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 25, p. 362-366, 1979.

ENGLISH, M. P. The developmental morphology of the perforating mycelium of dermatophytes. *Sabouraudia*, Oxfordshire, v.6. p. 218-229, 1968.

ESTEVES, J. A.; CABRITA, J. D. & NOBRE, G. N. *Micologia Médica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1977. *Micoses Superficiais: Dermatofitias*: p. 282-374.

FAERGEMANN, J.; MORK, N. J. & HAGLUND A, A multicentre (double-blind) comparative study to assess the safety and efficacy of fluconazole and griseofulvin in the treatment of tinea corporis and tinea cruris. *Br J Dermatol*. 1997; 136:575–7.

FERNÁNDEZ-TORRES, B.; VÁZQUEZ-VEIGA, H.; LIOVO, X.; PEREIRO Jr., M. & GUARRO, J. - *In vitro* susceptibility to itraconazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. *Chemotherapy*, 46: 390-394, 2000.

FILIPELLO-MARCHISIO, V.; FUSCONI, A. & RIGO, S. Keratinolysis and its morphological expression in hair digestion by airborne fungi. *Mycopathologia*, v. 127, p. 103-115, 1994.

FINCH, J. J. & WARSHAW, E. M. Toenail onychomycosis: current and future treatment options. *Dermatol Ther*. 2007;20: 31–46.

FOSTER, K. W.; GHANNOUM, M. A. & ELEWSKI, B. E. Epidemiologic surveillance of cutaneous fungal infection in the United States from 1999 to 2002. *J Am Acad Dermatol* 50: 748-752, 2004.

FRIEDLANDER, S. F.; ALY, R. & KRAFCHIK, B. Terbinafine in the treatment of *Trichophyton* tinea capitis: a randomized, double-blind, parallel-group, duration-finding study. *Pediatrics*. 2002;109:602–7.

FUJITA, S. & MATSUYAMA, T. Experimental *tinea pedis* induced by no-abrasive inoculation of Trichophyton mentagrophytes arthrospores on the plantar part of a guinea pig foot. Journal of Medical and Veterinary Mycology, Oxfordshire, v. 25, p. 203-213, 1987.

GARETH-JONES, E. B. Fungal adhesion. Mycological Research, Cambridge, v. 98, n. 9, p. 961-981, 1994.

GARRAWAY, M. O. & EVANS, R. C. Fungal Nutrition and Physiology. New York: John Wiley & Sons, 1984. Respiration: p. 298-305.

GENTLES, J. C. & SCOTT, E. The preservation of medically important fungi. Sabouraudia, Oxfordshire, v.17. p. 415-418, 1979.

GEORG, L. K. Epidemiology of the dermatomycoses, sources of infection, modes of transmission and epidemicity. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, v. 89, p. 69-77, 1960.

GEORG, L. K. & CAMP, L. B. Routine nutritional test for the identification of dermatophytes. Journal of Dermatology, Tokyo, v. 74, p. 113-121, 1957.

GHANNOUM, M. A. & ABU-ELTEEN, K. H. Pathogenicity determinants of Candida. Mycoses, Berlin, v. 33, n. 6, p. 265-282, 1990.

GONZÁLES-CABO, J. F. & BÁRCENA-ASENSIO, M. C. Ecología de los dermatofitos. Revista Iberoamericana de Micología, v. 13, p. 47-54, 1996.

GRAPPEL, S. F.; BISHOP, C. T. & BLANK, F. Immunology of dermatophytes and dermatophytosis. *Bacteriological Reviews*, v. 38, p. 222-250, 1974.

GRIN, E. & OZEVOGIC, L. Influence of the soil on certain dermatophytes and their evolutionary trend. *Mycopathology & Mycology Applicata*, Den Haag, v. 21, p. 23-28, 1963.

GRISEOFULVIN (Systemic). In: Drug information for the health care professional, USP DI, The United States Pharmacopeial Convention, Inc., ed 24, Taunton MA, 2004, Micromedex, p. 1493-6.

GUPTA, A. K. Onychomycosis Combination Therapy Study Group. Ciclopirox topical solution, 8% combined with oral terbinafine to treat onychomycosis: a randomized, evaluator-blinded study. *J Drugs Dermatol*. 2005;4:481-5.

GUPTA, A. K. & COOPER, E. A. Update in Antifungal Therapy of Dermatophytosis. *Mycopathologia* (2008) 166:353-367.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. & MONTERO-GEI, F. The use of fluconazole to treat superficial fungal infections in children. *Dermatol Clin*. 2003;21:537-42.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. & GINTER, G. Efficacy and safety of itraconazole use in children. *Dermatol Clin*. 2003;21:521-35.

GUPTA, A.K.; COOPER, E. A. & LYNDE, C. W. The efficacy and safety of terbinafine in children. *Dermatol Clin*. 2003;21:511-20.

GUPTA, A. K. & KOHLI, Y. In vitro susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *British Association of Dermatologists*. 2003; Dec. 149(2): 296 – 305.

GUPTA, A. K. & RYDER, J. E. The use of oral antifungal agents to treat onychomycosis. *Dermatol Clin*. 2003;21:469–79.

GUPTA, A. K.; RYDER, J. & BLUHM, R. Onychomycosis. In: Williams H, Bigby M, Diepgen T, Herxheimer A, Naldi L, Rzany B, editors. *Evidence based dermatology*. London: BMJ Books; 2003. p. 441–68.

GUPTA, A. K., RYDER, J.E. & SKINNER, A. R. Treatment of onychomycosis: pros and cons of antifungal agents. *J Cutan Med Surg*. 2004;8:25–30.

GUPTA, A. K. & SCHER, R. K. Management of onychomycosis: a North American perspective. *Dermatol Ther*. 1997;3:58–65.

GUPTA, A. K. & SUMMERBELL, R. C. Tinea capitis. *Med Mycol*. 2000;38:255–87.

GUPTA, A. K.; SOLOMON, R. S. & ADAM, P. Itraconazole oral solution for the treatment of tinea capitis. *Br J Dermatol*. 1998;139:104–6.

GUPTA, A. K.; ZAMAN, M. & SINGH J. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* DNA from the nail samples of patients with onychomycosis by a double-round polymerase chain reaction-based assay. *Br J Dermatol*. 2007;157: 698–703.

HASEGAWA, A. & URSUI, K. *Nannizzia otae* sp. nov. the perfect state of *Microsporium canis*. *Japanese Journal of Medical Mycology*, Tokyo, v. 16, p. 148-153, 1975.

HASHIMOTO, T.; EMYANITOFF, R. G.; MOCH, R. C. & POLLACK, J. H. Morphogenesis. Of arthroconidiation in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* with special reference to wall ontogeny. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 30, p. 1415-1421, 1984.

HAYES, J. D. & WOLF, C. R. Molecular mechanisms of drug resistance. *Biochem J.* 1990;272:281-95.

HILDA, D. C. **Avaliação do método de disco difusão para determinação da eficácia da terbinafina em agentes de micoses cutâneas e subcutâneas.** Campinas: UNICAMP, 2007. 95p. il. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

JESSUP, C.J.; WARNER, J.; ISHAM, N.; HASAN, I. & GHANNOUM, A. - Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J. clin. Microbiol.*, 38: 341-344, 2000.

KAMINSKI, G. W. The routine use of modified Borelli's lactrimel agar (MBLA). *Mycopathologia.* 1985;91:57-9.

KANE, J. & FISCHER, J. B. The differentiation of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* by use of Christensen's urea broth. *Can J Microbiol.* 1971;17:911-3.

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

LACAZ, C. S. *Tratado de Micologia Médica*. SarvierSarvier, São Paulo, SP, 2002.

LAMISIL_ (terbinafine hydrochloride tablets) Prescribing information. Novartis Pharmaceuticals Corporation. East Hanover, NJ, November 2005.

LECHA, M.; EFFENDY, I.; FEUILHADE DE CHAUVIN, M. DI CHIACCHIO, N. & BARAN, R. Treatment options—development of consensus guidelines. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005;19(Suppl 1):25–33.

LILLY, K.K.; KOSHICK, R. L.; GRILL, J. P.; KHALIL, Z. M.; NELSON, D. B. & WARSHAW, E.M. Cost-effectiveness of diagnostic tests for toenail onychomycosis: a repeated-measure, single-blinded, cross-sectional evaluation of 7 diagnostic tests. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55:620–6.

LIPOZENCIC, J.; SKERLEV, M. & OROFINO-COSTA, R. 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*. 2002;146:816–23.

LOO, D. S. Systemic antifungal agents: an update of established and new therapies. *Adv Dermatol*. 2006;22:101–24.

MATSUMOTO, T. & AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. *International Journal of Dermatology*, Philadelphia, v. 26, n.8, p. 491-499, Oct. 1987.

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. & PERES, N. T. A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. *Mycopathologia* (2008) 166:369–383

MONOD, M.; BAUDRAZ-ROSSELET, F.; RAMELET, A. A. & FRENK, E. Direct mycological examination in dermatology: a comparison of different methods. *Dermatologica*. 1989;179:183–6.

MONTERO GEI, F. Fluconazole in the treatment of tinea capitis. *Int J Dermatol*. 1998;37:870–1.

MORIELLO K. A. Diagnostic techniques for dermatophytosis. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2001;16:219–24.

NAKASHIMA, T.; NOZAWA, A.; ITO, T.; MAJIMA, T. & YAMAGUCHI, H. Development of a new medium useful for the recovery of dermatophytes from clinical specimens by minimizing the carryover effect of antifungal agents. *Microbiol Immunol*. 2002;46:83–8.

NWEZE, E. I.; MUKHERJEE, P. K. & GHANNOUM, M. A. An agar-based disk diffusion assay for susceptibility testing of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol*. 2010; 56: 23-29.

NEUFELD, P. M. Manual de Micologia Médica: Técnicas Básicas de Diagnóstico. 1.ed. – Rio de Janeiro: Programa Nacional de Controle de Qualidade, 1999.

NOBLE, S. L.; FORBES, R. C. & STAMM PL. Diagnosis and management of common tinea infections. *Am Fam Physician*. 1998;58:163–8.

OSBORNE, C. S. B.; HOFBAUER, B.; & RYDER, S. 2003. In vitro analysis of the ability of *Trichophyton rubrum* to become resistant to terbinafine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3634–3636.

PADHYE, A. A.; YOUNG, C. N. & AJELLO, L. Hair perforation as a diagnostic criterion in the identification of *Epidermophyton*, *Microsporum*, and *Trichophyton* species. *Pan Am Health Org Sci Publ.* 1980;396:115–20.

PADHYE, A. A. & WEITZMAN, I. The dermatophytes. In: Collier L, Balows A, Sussman M, Ajello L, Hay RJ, editors. *Topley and Wilson's medical mycology*. New York: Oxford University Press; 1998. p. 215–36.

PADILLA, A.; SAMPEDRO, A.; SAMPEDRO, & P., DELGADO, D. Clinical and epidemiological survey of dermatophytoses in Jaen (Spain). *Revista Iberoamericana de Micologia.* V. 19, p. 36-39, 2002.

PANASITI, V.; BORRONI, R. G.; DEVIRGILIIS, V.; ROSSI, M.; FABBRIZIO, L., MASCIANGELO, R.; BOTTONI, U. & CALVIERI, S. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses.* v.49:26–9, 2006.

PARENTD.; DE CROIX, J. & HEENENM. Clinical experience with short schedules of itraconazole in the treatment of tinea corporis and/ or tinea cruris. *Dermatology.* 1994;189:378–81.

PELEGRINI, A.; TAKAHASHI, J. P.; PEREIRA, C. Q. M.; PESSONI, R. B.; & SOUZA, M. C. Incidence of dermatophytosis in a public hospital of São Bernardo do Campo, São Paulo State, Brazil. *Rev Iberoam Micol.* 2009;26(2):118-120.

PENLAC_ Nail Lacquer (ciclopirox) Topical Solution, 8% Prescribing information. Dermik Laboratories (a division of Sanofi-Aventis). Bridgewater, NJ, July 2006.

PETRIKKOU, E.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GÓMEZ, A.; MOLLEJA, A. & MELLADO, E. Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans. *J. Clin. Microbiol.* 2001; Apr.: 1345–1347.

PHILPOT, C. M. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *T. rubrum* by a single urease test. *Sabouraudia*. 1967;5:189–93.

PIPKIN, J. L. Tinea capitis in the adult and adolescent. *AMA Arch Derm Syphilol.* 1952; 66:9–40.

PUJOL, I.; CAPILLA, J.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; ORTONEDA, M. & GUARRO, J. - Use of the sensitive colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J. clin. Microbiol.*, 40: 2618-2621, 2002.

REZUSTA, A.; RUBIO, M. C. & ALEJANDRE, M. C. Differentiation between *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* by sorbitol assimilation. *J Clin Microbiol.* 1991;29:219–20.

RIPPON, J. W. 1988. *Medical mycology*. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 3rd ed. W. B. Saunders, Philadelphia.

ROBERTS, B. J. & FRIEDLANDER, S. F. Tinea capitis: a treatment update. *Pediatr Ann.* 2005;34:191–200.

ROBERTS, S. O. B.; HAY, R. J. & MACKENZIE, D. W. R. A Clinicians Guide to Fungal Diseases. New York: Dekker. 1984. Ringworm (tinea, dermatophytes infection, dermatophytosis): p. 56-102.

ROBERT, R. & PIHET, M. Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*. 166:295–306, 2008.

SANTOS, D. A.; BARROS, M. E. S. & HAMDAN, J. S. - Establishing a method of inoculum preparation for susceptibility testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *J. clin. Microbiol.*, 44: 98-101, 2006.

SANTOS, D. A. & HAMDAN, J.S. - *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. *Mycoses*, 50: 286-289, 2007.

SANTOS, D. A. & HAMDAN, J. S. Evaluation of Broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*. v, 43, n.4, p. 1917-1920. 2005.

SEEBACHER, C.; BRASCH, D. & ABECK, O. Onychomycosis. *Mycoses*. 2007;50:321–7.

SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O. & HÉLIO, S. S. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. V. 39. n. 1, p. 27-35, 2003.

SHADOMY, H. J. & PHILPOT, C. M. Utilization of standard laboratory methods in the laboratory: diagnosis of problem dermatophytes. *Am J Clin Pathol.* 1980;74:197–201.

SIDRIM, J. J. C. & MOREIRA, J. L. B. Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica. 1. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 1. ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SINGH D.; PATEL D. C.; ROGERS K.; WOOD N.; RILEY D. & MORRIS A. J. Epidemiology of dermatophyte infection in Auckland, New Zealand. *Australas J Dermatol.* 2003;44:263–6.

SPORANOX_ (itraconazole) Capsules prescribing information (Ortho-McNeil Inc). Janssen Pharmaceutica Products, L.P. Titusville, NJ, June 2006.

STOCKDALE, P. M. Nutritional requirements of dermatophytes. *Biol Rev.* 1953;28:84–104.

SIGURGEIRSSON, B.; ELEWSKI, B.E. & RICH, P. A. Intermittent versus continuous terbinafine in the treatment of toenail onychomycosis: a randomized, double-blind comparison. *J Dermatolog Treat.* 2006;17:38–44.

SUAREZ S. M.; SILVERS, D. N.; SCHER, R. K.; PEARLSTEIN, H. H. & AUERBACH, R. Histologic evaluation of nail clippings for diagnosing onychomycosis. *Arch Dermatol.* 127:1517–9, 1991.

SUMMERBELL, R. C. Epidemiology and ecology of onychomycosis. *Dermatology*. 1997;194(Suppl 1):32–6.

SUMMERBELL, R. C.; ROSENTHAL, S. A. & KANE, J. Rapid method for differentiation of *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and related dermatophyte species. *J Clin Microbiol*. 1988;26:2279–82.

SUMMERBELL, R. C.; COOPER, E.; BUNN, U.; JAMIESON, F. & GUPTA, A. K. Onychomycosis: a critical study of techniques and criteria for confirming the etiologic significance of nondermatophytes. *Med Mycol*. 2005;43:39–59.

TAKAHASHI, Y.; HARITANI, K.; SANO, A.; TAKIZAWA, K.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M. & NISHIMURA, K. An isolate of *Arthroderma benhamiae* with *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei* anamorph isolated from a four-toed hedgehog (*Atelerix albiventris*) in Japan. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2002;43:249–55.

TAPLIN, D.; ZAIAS, N.; REBELL, G. & BLANK, H. Isolation and recognition of dermatophytes on a new medium (DTM). *Arch Dermatol*. 1969;99:203–9.

TARO Pharmaceuticals Inc. Econazole nitrate cream 1%. Prescribing information. Brampton, Ontario, Canada, September 2001.

TARO Pharmaceuticals Inc. Ciclopirox olamine cream USP, 0.77%. Prescribing information. Brampton, Ontario, Canada, March 2005.

TORRES, B. F. Sensibilidad antifúngica de los dermatófitos. 2005. Tese de Doutorado. Universidade de Rovira i Virgili, Reus (Espanha).

TOSTI, A.; PIRACCINI, B. M. & IORIZZO, M. Management of onychomycosis in children. *Dermatol Clin*. 2003;21:507–9.

TRENT, J. T.; FEDERMAN, D. & KIRSNER, R. S. Common viral and fungal skin infections. *stomyWoundManage*. 2001;47:28–34.

VIVAS, J. R. C. & TORRES-RODRIGUEZ, J. M. Sensibilidad de Hongos Miceliares Dematiáceos a Diez Antifúngicos Empleando um Método de Difusión em Ágar. *Rev. Iberoam. Micol*. 2001; 18:113 -117.

WARSHAW, E. M. & ST CLAIR, K. R. Prevention of onychomycosis reinfection for patients with complete cure of all 10 toenails: results of a double-blind, placebo-controlled, pilot study of prophylactic miconazole powder 2%. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:717–20.

WEINBERG, J. M.; KOESTENBLATT, E. K.; TUTRONE, W. D.; TISHLER, H. R. & NAJARIAN, L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *J Am Acad Dermatol*. 49:193–7, 2003.

WEITZMAN, I. & ROSENTHAL, S. Studies in the differentiation between *Microsporum ferrugineum* Ota and *Trichophyton soudanense* Joyeux. *Mycopathologia*. 1984;84:95–101.

WEITZMAN, I. & SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev*. 1995;8:240–59.

WEST, B. C. & KWONG-CHUNG, K. J. Mycetoma caused by *Microsporum audouinii*. *American Journal of Clinical Pathology*, Philadelphia, v.73, p. 447-454, 1980.

ZAITZ, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B. & SOUZA, V. M.; *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: MEDSI. p. 81-84. 1998.

