

## SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE DERMATÓFITOS A TRÊS AGENTES ANTIFÚNGICOS USANDO O MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO EM CALDO.

**ARAUJO**, Crystiane Rodrigues; **MIRANDA**, Karla Carvalho; **LE MOS**, Janine de Aquino; **COSTA**, Carolina Rodrigues; **SOUZA**, Lúcia Kioko Hasimoto; **SILVA**, Maria do Rosário Rodrigues.

Laboratório de Micologia-Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública-UFG.

[crysra@yahoo.com.br](mailto:crysra@yahoo.com.br)

Palavras-chave: dermatófitos, suscetibilidade *in vitro*, microdiluição em caldo.

### Introdução

Os dermatófitos são constituídos por fungos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporium* e *Epidermophyton*, que têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados (pele, pêlo e unhas) de animais causando infecções, denominadas dermatofitoses (PUJOL et al, 2002; FERNANDEZ-TORRES et al, 2003). Estas são provavelmente as infecções fúngicas mais comuns em humanos, apresentando aspectos clínicos bastante variados, que resultam da combinação de destruição da queratina de células do extrato córneo associada a uma resposta inflamatória (GOLDSTEIN et al, 2000). Terapias tópicas ou sistêmicas podem ser usadas para as dermatofitoses, no entanto estas infecções em muitos casos mostram-se altamente recidivantes. (PUJOL et al., 2002). Devido ao grande número de agentes antifúngicos disponíveis para o tratamento das dermatofitoses e á dificuldade de eficácia em muitos casos, a determinação do medicamento adequado é de grande importância (BENGER et al, 2004; KARACA et al, 2004). A suscetibilidade *in vitro* destes microrganismos aos antifúngicos provavelmente pode ser a solução para este problema (JESSUP et al., 2000). Recentemente, o CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) publicou o documento M38-A, utilizando a técnica de microdiluição em caldo útil na determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de vários agentes antifúngicos para fungos filamentosos formadores de conídios (FERNANDEZ-TORRES et al., 2000; ESPINEL-INGROFF, 2001; PETRIKKOU et al, 2001). Para os dermatófitos, entretanto, não há nada estabelecido. O objetivo deste trabalho foi verificar a suscetibilidade *in vitro* de 30 isolados de dermatófitos (*M. canis*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*) frente à terbinafina, cetoconazol e fluconazol.

### Materiais e Métodos

**Teste de microdiluição em caldo:** O perfil de suscetibilidade foi avaliado usando o teste de microdiluição em caldo segundo o CLSI, documento M38-A modificado por KARACA & KOÇ, 2004. O fluconazol foi dissolvido em 1ml de água destilada, enquanto que cetoconazol e terbinafina foram dissolvidos em 1 ml de dimetilsulfóxido. Estes antifúngicos foram posteriormente diluídos em caldo RPMI 1640 sem bicarbonato de sódio, tamponado a pH 7,0 com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS), de tal modo que as concentrações variassem de 0,125 a 64 µg/ml para fluconazol, 0,03 a 16 µg/ml para cetoconazol e 0,001 a 16 µg/ml para terbinafina.

Os isolados de dermatófitos foram cultivados em agar batata dextrose, durante 7 dias à 28<sup>o</sup> C para produção de conídios. A estes tubos foram adicionados 10 ml de salina estéril a 0,85% acrescido de Tween 20 para facilitar desprendimento dos conídios. Cada suspensão foi transferida para um tubo estéril para ser ajustada em espectrofotômetro em l de 530 nm, transmitância de 68 a 70%, o que equivale a 0,6 a 1,4 X 10<sup>6</sup> UFC/ml. Em seguida, os inóculos foram diluídos em caldo RPMI 1640 para obtenção de uma concentração final de 0,4 a 5 X 10<sup>4</sup> UFC/ml.

**Procedimento do teste de suscetibilidade *in vitro*:** 100 µl do agente antifúngico contendo as diferentes concentrações foram colocados nos poços da placa de microdiluição e em seguida foram adicionados 100 µl do inoculo. As placas foram incubadas a 28° C por 7 dias e a leitura da concentração inibitória mínima foi considerado como 50% de inibição para os derivados azólicos e 100% para terbinafina. Cepas de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle em cada experimento.

**Resultados:** Os 30 isolados de dermatófitos mostraram concentrações que variaram de 4-16µg/ml para fluconazol, de 0,25-4 µg/ml para cetoconazol e de 0,015-0,5 µg/ml para terbinafina. As variações de CIM para cada agente antifúngico e para as três espécies de dermatófitos estudadas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 - Variações de concentração inibitória mínima para 30 isolados de dermatófitos

Espécies (n°)	Antifúngico	Valores de CIM (µg/ml)
<i>T. rubrum</i> (10)	Fluconazol	4 - 16
	Cetoconazol	0,25 - 2
	Terbinafina	0,015 - 0,5
<i>T. mentagrophytes</i> (10)	Fluconazol	8 - 16
	Cetoconazol	0,25 - 4
	Terbinafina	0,015 - 0,06
<i>M. canis</i> (10)	Fluconazol	4 - 16
	Cetoconazol	0,25 - 2
	Terbinafina	0,015 - 0,5

Os antifúngicos, cetoconazol e terbinafina mostraram concentrações inibitórias com valores baixos para a maioria dos dermatófitos, com exceção de 20% dos isolados de *T. mentagrophytes* que apresentaram concentração inibitória mínima (CIM) de 4 µg/ml para cetoconazol. Com relação ao fluconazol os maiores valores de CIM (16 µg/ml) foram encontrados para 10% de *T. rubrum*, 70% de *T. mentagrophytes* e 50% de *M. canis* (Figuras 1, 2 e 3).

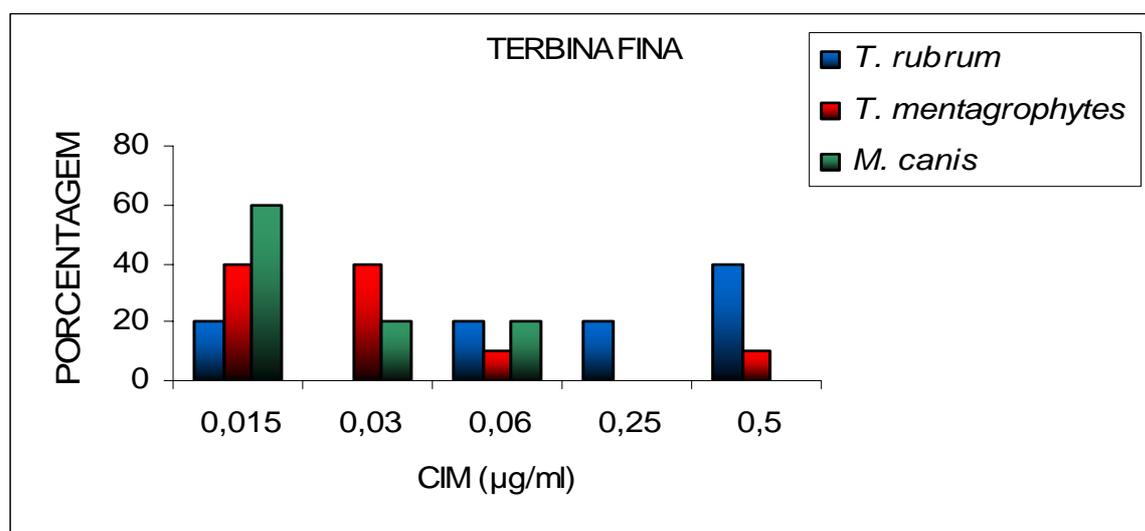


Figura 1 – Concentração inibitória mínima de terbinafina para dermatófitos

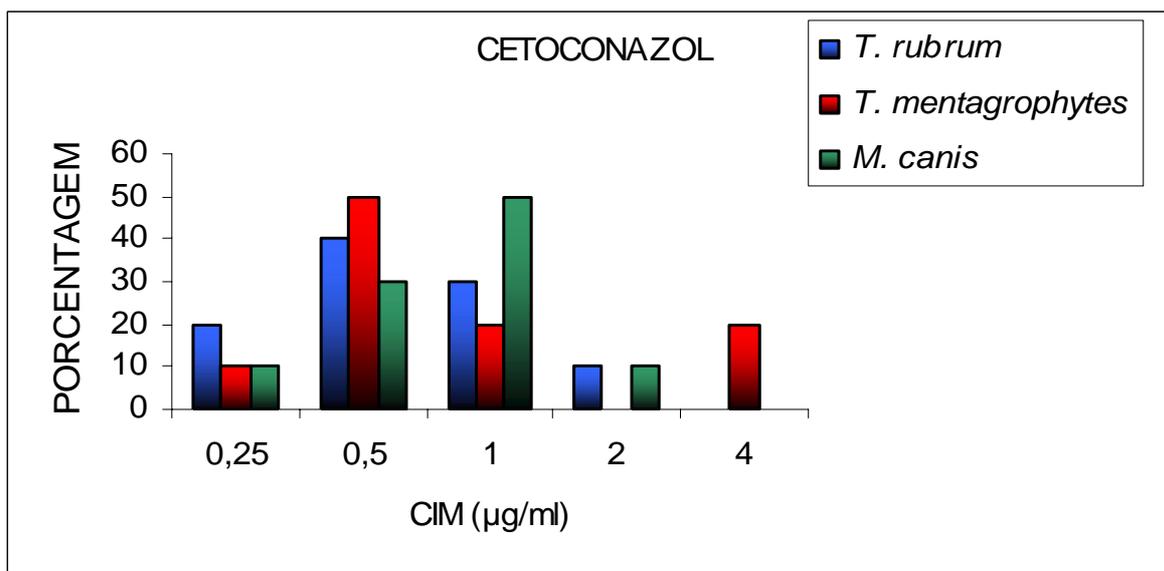


Figura 2 Concentração inibitória mínima de cetoconazol para dermatófitos

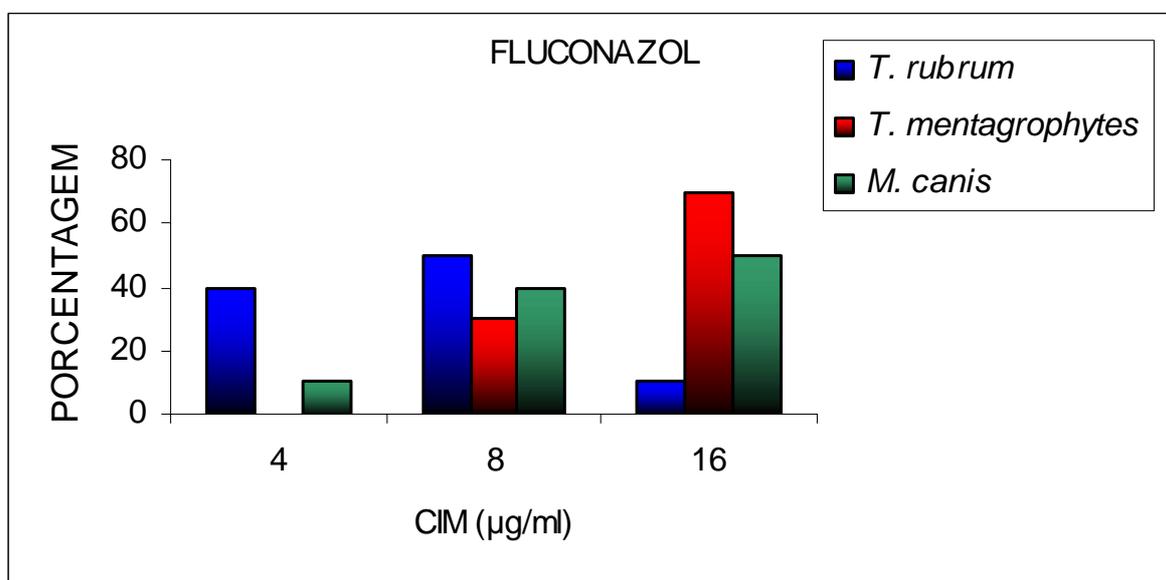


Figura 3- CIMs de fluconazol para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*.

**Discussão:** O grande número de agentes antifúngicos surgidos nos últimos 10 anos, as constantes recidivas de infecções por dermatófitos e o alto custo dos medicamentos torna necessário o uso de testes de suscetibilidade *in vitro* para a determinação da terapia adequada. O método de microdiluição em caldo, proposto pelo CLSI em 2002, documento M38-A, utilizado em nosso trabalho, com pequenas modificações com relação ao inóculo, permitiu a determinação da concentração inibitória mínima para dermatófitos, com certa facilidade, com leitura realizada até 7 dias de incubação a 28°C. As menores concentrações encontradas foram para terbinafina que se mostrou com valores variando de 0,015 a 0,5 µg/ml. Similar resultado encontrado em nosso trabalho tem sido verificado por diferentes pesquisadores. FERNANDEZ-TORRES et al, 2002, avaliando a atividade antifúngica para dermatófitos, verificaram que a terbinafina apresentou variações de CIM

semelhantes às encontradas em nosso estudo, que foi de 0,001 a 0,5 µg/ml. Em nosso trabalho, 80% dos isolados foram muito suscetíveis ao cetoconazol, mostrando provavelmente que este agente antifúngico também é eficaz para os dermatófitos, principalmente para *T. rubrum* que se mostrou com elevada suscetibilidade a este medicamento. Valores de CIM de cetoconazol que variaram de 0.008-4 µg/ml em isolados de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* têm sido observados por KARACA et al, 2004. Há diferenças nos resultados encontrados por vários pesquisadores. PEREA et al, 2001, verificaram que os valores de CIM de cetoconazol foram maiores para os isolados de *Trichophyton* sp variando de 0,25- >16 µg/ml. Como já conhecido, o fluconazol dentre os medicamentos estudados é o que apresenta menor eficácia no tratamento de dermatofitoses. Os resultados encontrados *in vitro* com valores de 4 a 16 µg/ml para os dermatófitos são semelhantes aos descobertos por PUJOL et al, 2002, que para as espécies estudadas como *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* encontraram valores de CIM de 0,5 a 128 µg/ml. Desta forma podemos concluir que o teste de microdiluição em caldo para dermatófitos, embora não padronizado, pode de alguma forma ser de grande valor na escolha do antifúngico.

**Conclusões:** Os resultados obtidos permitiram concluir que cetoconazol e terbinafina apresentaram alto poder de inibição de crescimento dos dermatófitos sugerindo que estes agentes antifúngicos podem ser usados no tratamento de dermatofitoses.

#### Referências bibliográficas

- BENGER, S., TOWNSEND, P., ASHFORD, R. A., LAMBERT, P. An in vitro study to determine the minimum inhibitory concentration of *Melaleuca alternifolia* against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **The Foot**, 14: 86-91. 2004.
- ESPINEL-INGROFF A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. **J Clin Microbiol**, 39(4): 1360-1367. 2001.
- FERNANDEZ - TORRES B., VAZQUEZ-VEIGA H., LLOVO X., PEREIRO M., GUARRO J. In vitro susceptibility to itronazole, clotrimazole, ketoconazole and terbinafine of 100 isolates of *Trichophyton rubrum*. **Chemotherapy**, 46: 390-394. 2000.
- FERNANDEZ – TORRES, B., INZA, I., GUARRO, J. In vitro activities of new antifungal drug eberconazole and three other topical agents against 200 strains of dermatophytes. **J Clin Microbiol**, 41: 5209-5211. 2003.
- GOLDSTEIN A. O.; SMITH K. M., IVES, T. J., GOLDSTEIN B. Effective management of conditions involving the skin, hair, and nail. **Geriatrics** 55: 40-52. 2000.
- JESSUP, C. J., WARNER, J., ISHAM, N., HASAN, I., GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **J Clin Microbiol**, 38: 341-344. 2000.
- KARACA, N., KOÇ, A. N. In vitro susceptibility testing of dermatophytes: comparison of disk diffusion and reference broth dilution methods. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 48: 259-264. 2004.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. CLSI document M38-A. 2002.
- PEREA, S., FOTHERGILL, A. W., SUTTON, D. A., RINALDI, M. G. Comparison of in vitro activities of voriconazole and five established antifungal agents against different

species of dermatophytes using a broth macrodilution method. **J Clin Microbiol**, 39: 385-388. 2001.

PETRIKKOU, E., RODRIGUEZ-TUDELA, J. L., CUENCA-ESTRELLA, M., GOMEZ, A., MOLLEJA, A., MELLADO, E. Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. **J Clin Microbiol**, 39.4: 1345-1347. 2001.

PUJOL, I., CAPILLA, J., FERNANDEZ-TORRES, B., ORTONEDA, M., GUARRO, J.. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J Clin Microbiol**, 40: 2618-2621. 2002.

Agradecimentos pelo suporte financeiro ao

