



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



ILMD
INSTITUTO LEÔNIDAS
& MARIA DEANE
FioCruz Amazônia

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E SITUAÇÕES
DE SAÚDE NA AMAZÔNIA

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM

MARIA EDUARDA GRISOLIA

MANAUS

2019

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO LEÔNIDAS E MARIA DEANE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CONDIÇÕES DE VIDA E
SITUAÇÕES DE SAÚDE NA AMAZÔNIA**

MARIA EDUARDA GRISOLIA

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ani Beatriz Jackisch Matsuura

MANAUS

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

G869p

Grisolia, Maria Eduarda.

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM / Maria Eduarda Grisolia.
– Manaus: Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

73 f.

Dissertação (Mestrado em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia) – Instituto Leônidas e Maria Deane, 2019.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ani Beatriz Jackisch Matsuura.

1. Dermatofitose 2. Antifúngicos 3. Micologia I. Título

CDU 616.596(811.3) (043.3)

CDD 616.969098113

22. ed.

Elaborado por Ycaro Verçosa dos Santos - CRB-11/ 287

MARIA EDUARDA GRISOLIA

Perfil de sensibilidade aos antifúngicos e de variabilidade genética de espécies de *Trichophyton* isolados de pacientes com infecção cutânea atendidos em um Serviço Público de Micologia em Manaus/AM

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia, como requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Saúde Pública.

Manaus – AM, 26 de fevereiro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura – Orientador
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Profa. Dra. Suanni Lemos de Andrade – Membro
Universidade do Estado do Amazonas

Prof. Dra. Ormezinda Celeste Cristo Fernandes – Membro
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/FIOCRUZ

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã pelo apoio, que muito me ajudaram para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane pela oportunidade da realização do curso de Mestrado em Saúde Pública;

À capes pela concessão da Bolsa;

À Profa. Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura pela orientação, apoio, incentivo e também pela amizade durante a realização deste trabalho, que em todas as nossas conversas sempre me ajudou a enxergar aonde posso chegar com a carreira que comecei nesse mestrado;

À Coordenação e Secretaria da Pós-graduação, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do Mestrado;

Ao Ycaro Verçosa dos Santos, Bibliotecário do Instituto Leônidas e Maria Deane, pelo apoio prestado durante o desenvolvimento do Mestrado;

Ao Prof. Dr. Adolfo José da Mota do Laboratório de Biotecnologia da UFAM pela colaboração na caracterização molecular das espécies trabalhadas, e pela amizade e paciência. Ainda agradeço às meninas do mesmo laboratório, Suelen e Marjory por todo apoio na etapa final do trabalho em bancada;

À Dra. Maria Jacirema F. Gonçalves do ILMD, por toda a colaboração na elaboração da revisão sistemática, e pela amizade e paciência;

À Dra. Maria Ivone da Micologia da UFAM/ICB, pela orientação durante o estágio à docência, pela amizade e apoio;

À equipe do laboratório de Micologia do ILMD, em especial à Marla Jalene Alves e Clarice Virgínia, por toda a ajuda laboratorial e apoio, e claro pelos momentos de descontração pós laboratório, que muito ajudaram na realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Takeshi Matsuura da UFAM/ICB, por ter me incentivado a seguir com a microbiologia desde que iniciei meu primeiro projeto de iniciação científica sob sua orientação, que me instruiu e me deu as bases para seguir na ciência;

Á Nani de Oliveira Carvalho, uma amiga querida que muito me apoia desde a graduação, e não fez diferente no desenvolver desse trabalho, sua amizade e apoio foram fundamentais;

Á Genevere, uma amizade feita nesse período de Mestrado, que esteve presente em momentos como os trabalhos em feriados e fim de semana, disciplinas e nos Seminários Discentes, agradeço pelas conversas, apoio, companheirismo e amizade;

Agradeço ainda à Gleica Soyan Barbosa, por toda a ajuda com a interpretação dos testes aos antifúngicos, sua ajuda foi essencial;

Á minha família que prestou todo apoio e incentivo basilares para a realização desta etapa da minha carreira acadêmica;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”

Hipócrates

RESUMO

Dermatófitos são fungos filamentosos queratinofílicos e estima-se que cerca de 20-25% da população mundial carrega uma infecção por dermatófitos. *Trichophyton* é um gênero com mais espécies patogênicas antropofílicas e *Trichophyton rubrum* é o agente etiológico mais prevalente das dermatofitoses no mundo, sendo em alguns casos a causa de tratamentos mais longos e muitas vezes mais complexos podendo causar desde lesões superficiais até crônicas. Para prevenção e controle das dermatofitoses, deve-se considerar a localização da lesão, agente causador e fonte da infecção. O tratamento desta doença é feito com antifúngicos como Terbinafina, Cetoconazol, Fluconazol, Anfotericina B e outros. No entanto, o uso indevido e indiscriminado de antifúngicos está causando um aumento na resistência a antifúngicos em dermatófitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade genética de isolados clínicos de *Trichophyton* obtidos de pacientes atendidos na Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado e verificar o perfil de susceptibilidade a nove antifúngicos; e através de uma revisão sistemática fornecer uma visão geral da prevalência mundial de *Trichophyton rubrum* e outros dermatófitos. As espécies *T. tonsurans*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* e *T. verrucosum* foram testadas quanto à resistência aos antifúngicos e todas apresentaram isolados resistentes a algum antifúngico, mas majoritariamente a resistência foi observada a Anfotericina B, Fluconazol, Miconazol e Nistatina. A análise filogenética dos dermatófitos foi realizada com a região ribossomal e a variabilidade genética foi conduzida por análise de RFLP desta mesma região. Os dados mostraram uma diversidade genética em *T. tonsurans* e *T. interdigitale*. A revisão sistemática permitiu concluir que a espécie *T. rubrum* tem uma ampla distribuição mundial, sendo a mais prevalente, seguido por *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton interdigitale*.

Palavras-chave: *Trichophyton*; Prevalência; Dermatofitoses; DNA ribossomal; Agentes Antifúngicos

ABSTRACT

Dermatophytes are keratinophilic filamentous fungi and it is estimated that about 20-25% of the world population carries a dermatophyte infection. *Trichophyton* is a genus with more anthropophilic pathogenic species and *Trichophyton rubrum* is the most prevalent etiological agent of dermatophytosis in the world, being in some cases the cause of longer and often more complex treatments that can cause from superficial to chronic lesions. For the prevention and control of dermatophytosis, the location of the lesion, causative agent and source of infection should be considered. Treatment of this disease is done with antifungals such as Terbinafine, Ketoconazole, Fluconazole, Amphotericin B and others. However, excessive and indiscriminate use of antifungals is causing an increase resistance to antifungals on dermatophytes. The objective of this study was to evaluate the genetic variability of clinical isolates of *Trichophyton* obtained from patients attended at the Heitor Vieira Dourado Fundação de Medicina Tropical and to verify the susceptibility profile to nine antifungals; and through a systematic review provide an overview of the worldwide prevalence of *Trichophyton rubrum* and other dermatophytes. The species *T. tonsurans*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* and *T. verrucosum* were tested for antifungal resistance and all had antifungal resistant isolates, but resistance was observed for Amphotericin B, Fluconazole, Miconazole and Nystatin. The phylogenetic analysis of the dermatophytes was performed with the ribosomal region and the genetic variability was conducted by RFLP analysis of the same region. The data showed a genetic diversity in *T. tonsurans* and *T. interdigitale*. The systematic review allowed us to conclude that the species *T. rubrum* has a wide world distribution, being the most prevalent, followed by *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton interdigitale*.

Key words: *Trichophyton*; Prevalence; Dermatophytosis; Ribosomal DNA; Antifungals Agents.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AM - Amazonas

ATCC - American Type Culture Collection (Coleção de Cultura-Tipo Americana)

CAAE - Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

cels - células

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

E. floccosum - *Epidermophyton floccosum*

FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas

FDA - Food and Drug Administration (administração de alimentos e medicamentos)

HVD - Heitor Vieira Dourado (Fundação de Medicina Tropical)

ILMD - Instituto Leônidas e Maria Deane

ITS - Internal Transcribed Space (Espaço Interno Transcrito)

KOH - Hidróxido de potássio

LILACS - Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde

M - Molar

Medline - Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica

min - minutos

mL - miliLitros

MLST - Multilocus sequence typing (tipagem da sequência multilocus)

MOPS - ácido (3-(N-morfolino) propanosulfônico

NG - glicogênio dissolvido em acetato de amônio

NH₄OAc - acetato de amônio

nm - nanômetros

Nº - número

pb - par de base (nucleotídeos)

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase)

pH - potencial Hidrogeniônico

primer - iniciador (oligonucleotídeo)

PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PROEP - Programa de Expansão da Educação Profissional

RFLP - Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

RNA - Ácido RiboNucleico

rpm - rotação por minuto

RPMI - Instituto Roswell Park Memorial (meio de cultura)

Scielo - Scientific Electronic Library Online (Biblioteca Eletrônica Científica Online)

Scopus - Base de Dados Bibliográfica

T. concentricum - *Trichophyton concentricum*

T. equinum - *Trichophyton equinum*

T. ferrugineum - *Trichophyton ferrugineum*

T. megninii - *Trichophyton megninii*

T. mentagrophytes - *Trichophyton mentagrophytes*

T. rubrum - *Trichophyton rubrum*

T. schoenleinii - *Trichophyton schoenleinii*

T. verrucosum - *Trichophyton verrucosum*

T. violaceum - *Trichophyton violaceum*

Web of Science - Base de Dados Bibliográfica

µg - microgramas

µl - microlitros

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Amostras estudadas provenientes de 23 pacientes atendidos no Serviço de Micologia da Fundação de Medicina Tropical – HVD no período de janeiro de 2015 a julho de 2017.	29
Tabela 2 - Especificações de cada primer utilizado para sequenciar parcialmente a região ribossomal 18S-5.8S-28S (Figura 5).	32
Tabela 3 - Valores de pontos de corte sugerido pelo CLSI para interpretação de susceptibilidade à antifúngicos. Os valores foram generalizados, visto que não foram estabelecidos valores específicos para Dermatófitos.....	35
Quadro 1 - Representação da pesquisa de Revisão Sistemática em banco de dados e os fatores de exclusão.....	36

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Linha temporal do desenvolvimento da taxonomia atual de dermatófitos.	19
Figura 2 - Manifestações Clínicas das dermatofitoses. a: Tinea capitis; b: Tinea corporis; c: Tinea faciei; d: Tinea barbae; e: Tinea cruris; f: Tinea pedis; g: Tinea manuum; h: Tinea unguium. Imagens encontradas no google imagens referenciadas uma a uma em cada imagem.	21
Figura 3 - Constituição ribossomal (imagem modificada de Winnebeck EC1, Millar CD, Warman GR. , 2010).	24
Figura 4 - Linha histórica do desenvolvimento dos antifúngicos (imagem original em inglês pode ser acessada no artigo de SHEEHAN e colaboradores, 1999)	26
Figura 5 - Representação da região ribossomal 18S-5.8S-28S com os respectivos primers para PCR e sequenciamento. As sequência e referências de cada primer podem ser vistas na Tabela2. Imagem modificada de WHITE, T.B.; LEE, 1990.	31
Figura 6 - Esquema da placa para Microdiluição em caldo (Protocolo M38-A2). Em uma placa testa-se 5 dermatófitos para um antifúngico. As letras de A-F são referentes as amostras de dermatófitos testadas; números de 1 a 10 são referentes a cada concentração testada e os números 11 e 12 são o Controle negativo e o positivo, respectivamente.	34

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1. <i>Dermatófitos</i>	<i>18</i>
2.2. <i>Dermatofitoses.....</i>	<i>20</i>
2.3. <i>Diversidade Genética dos Dermatofitos</i>	<i>22</i>
2.4. <i>Tratamentos utilizados nas Dermatofitoses</i>	<i>24</i>
3. OBJETIVOS	28
3.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	<i>28</i>
3.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>28</i>
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. <i>Modelo de Estudo</i>	<i>29</i>
4.2. <i>Aspectos Éticos.....</i>	<i>29</i>
4.3. <i>Amostras</i>	<i>29</i>
4.4. <i>Caracterização Molecular das Amostras.....</i>	<i>30</i>
4.4.1. <i>Extração de DNA.....</i>	<i>30</i>
4.4.2. <i>Amplificação da região ribossomal.....</i>	<i>31</i>
4.4.3. <i>Sequenciamento da região ribossomal.....</i>	<i>31</i>
4.4.4. <i>Precipitação da reação de Sequenciamento e Eletroforese capilar.....</i>	<i>32</i>
4.4.5. <i>Caracterização da variabilidade genética por PCR-RFLP</i>	<i>32</i>
4.5. <i>Teste de sensibilidade à Antifúngicos.....</i>	<i>33</i>
4.6. <i>Análise dos dados</i>	<i>34</i>
4.7. <i>Revisão Sistemática da Literatura.....</i>	<i>35</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1. <i>ARTIGO1: Nine drugs antifungal profile and genetic variability of clinical samples of Trichophyton species isolates in Manaus, Amazonas - Brazil.</i>	<i>38</i>
5.2. <i>ARTIGO 2: World Prevalence of Trichophyton rubrum: A Systematic Literature Review</i>	<i>50</i>

6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS	70
ANEXO I - Parecer de Aprovação do CEP.....	73
ANEXO II - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS	78

1. INTRODUÇÃO

Dermatofitose é uma infecção contagiosa que acomete os tecidos queratinizados, e seus sintomas gerais são erupção cutânea escamosa, geralmente acompanhada de coceira, ardência e queimação. Esta doença é causada por fungos filamentosos queratinofílicos chamados dermatófitos, e estão no grupo dos microrganismos citados como mais antigos relacionados com doenças humanas (KANNABIRAN, 2010; DE HOOG et al., 2016; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

Por se tratar de uma doença contagiosa existem algumas descrições sobre possíveis formas de contágio, onde fatores como situação sócio econômica desfavorável, má higiene pessoal, e a cultura de cada população tornam um grupo familiar ou determinada população mais vulnerável (LAKSHMIPATHY & KANNABIRAN, 2010). As dermatofitoses são de ocorrência cosmopolita, mas não são de registro obrigatório, e é estimado que 20 a 25% da população mundial tem alguma dermatofitose (LAKSHMIPATHY & KANNABIRAN, 2010).

Os dermatófitos são classificados como pertencentes do Filo Ascomycota, da Classe Pezizomycotina, da Ordem Onygenales, e da Família Arthrodermataceae, e estão agrupados em três gêneros de importância médica: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (DE HOOG et al., 2017). Dentre os três gêneros de dermatófitos, o *Trichophyton* é o que abriga a maior parte das espécies patogênicas estritamente relacionada a hospedeiros humanos (antropofílicos), e a espécie *Trichophyton rubrum* é a maior causadora de dermatofitoses no mundo, sendo esta uma espécie com íntima adaptação ao hospedeiro humano, tornando o tratamento mais longo e, muitas vezes mais complexo (DE HOOG et al., 2016; ZHAN; LIU, 2016; VISHNU et al., 2015).

Devido à alta prevalência desta espécie, muitos estudos foram feitos com este fungo com o objetivo de melhor entender os mecanismos de transmissão e tratamento, e para que medidas possam ser tomadas para melhorar a qualidade de vida da população, diminuir o sofrimento e constrangimento causado por esta doença (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011; KASZUBIAK et al., 2004). No Brasil, percebe-se que as medidas em saúde pública não dão o enfoque necessário para infecções fúngicas. Isso gera um agravamento “invisível” de diversas infecções fúngicas, inclusive dermatofitose, na camada mais vulnerável da população. Os agravantes são desde os diversos desconfortos de convívio social (como o estigma gerado pelas lesões) a qualidade de vida e longos tratamentos. Além disso, existem casos de pessoas

imunodeprimidas com dermatofitoses crônicas, que são mais complexos e de difícil tratamento (PIRES et al., 2014; NWEZE, 2011; CHEPCHIRCHIR et al., 2009).

Estudos com base na epidemiologia molecular tem demonstrado que espécies de *Trichophyton* possuem diferentes genótipos com distintos mecanismos infecciosos. Gräser, entre 1999 e 2016, demonstrou a importância da epidemiologia molecular dos dermatófitos, em particular o *T. rubrum*, constatando que um mesmo paciente pode ter diferentes lesões no corpo causadas por mais de uma espécie, ou ainda por mais de um genótipo de uma mesma espécie, implicando assim em um tratamento mais difícil (PIRES et al., 2014; CAFARCHIA et al., 2013; GRÄSER et al., 2007).

Este trabalho visa contribuir com a maior compreensão da correlação entre a variabilidade genética frente ao comportamento aos antifúngicos de espécies de *Trichophyton*, além de acrescentar dados importantes sobre a epidemiologia mundial de *Trichophyton rubrum* e outros dermatófitos com um estudo de revisão sistemática.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Dermatófitos

Dermatófitos é a denominação dada ao grupo de fungos que tem afinidade à queratina, principalmente quando estão em sua forma parasitária causando a dermatofitose. Atualmente estão classificados em três gêneros, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, mas desde sua primeira associação, em 1839, como agentes causadores de uma doença infecciosa humana ocorreram diferentes classificações desses fungos (DE HOOG et al., 2016; CAFARCHIA et al., 2013).

A primeira associação de lesões cutâneas com fungos em humanos foi feita em 1839 por Schoenlein, que nomeou esse fungo de *Achorion schoenleinii*, mas quem ficou conhecido como o fundador da dermatomicologia foi David Gruby (publicações de 1841 a 1844), descrevendo a invasão *ecto* e *endotrix* de cabelos, nomeando esses fungos, respectivamente, de *Microsporum audouinii* (remetendo-se aos pequenos esporos ao redor do cabelo) e *Herpes (Trichophyton) tonsurans*. Ao longo dos anos (1840 a 1890) os dermatófitos estavam sendo descritos de acordo com a classificação feita por Reimond Sabouraud, que os dividia em quatro gêneros diferentes, *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Décadas mais tarde, a taxonomia de dermatófitos foi modernizada, quando Chester Emmons passou a classificá-los a partir das características da estrutura vegetativa e de conídios, eliminando o gênero *Achorion* (DE HOOG et al., 2016; CAFARCHIA et al., 2013; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Entre os anos 1959 e 1963 com a utilização a técnica de Vanbreuseghem, que usa iscas de cabelo ou crinas de cavalo para o isolamento de dermatófitos, foi descoberto o estado Teleomorfo (forma sexuada ou perfeita) tornando a identificação desses fungos mais complexa. Recentemente De Hoog e colaboradores fizeram uma revisão filogenética polifásica de dermatófitos, trazendo uma nova proposta sobre a classificação destes fungos (figura 1). A nova proposta é composta de seis gêneros, onde três são os anamorfos já utilizados na classificação atual, *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e os outros três são teleomorfos divididos em *Arthraderma*, *Nannizia* e *Lophophyton* (DE HOOG et al., 2016; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

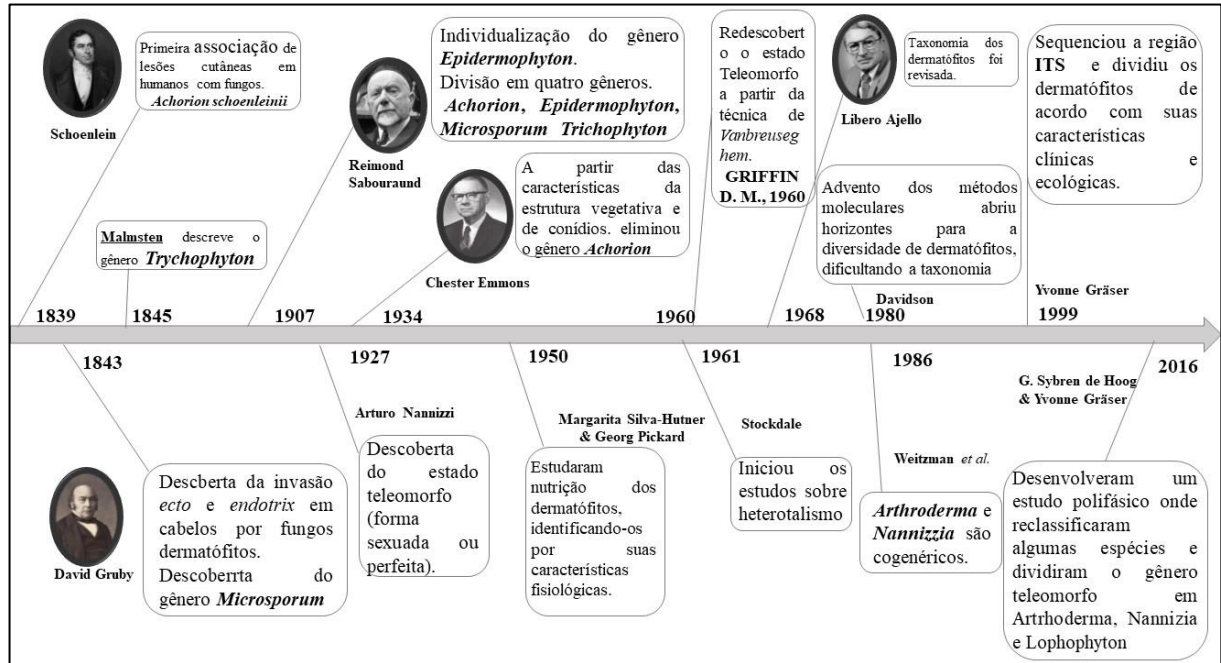


Figura 1 - Linha temporal do desenvolvimento da taxonomia atual de dermatófitos.

O gênero *Trichophyton*, descrito por Malmsten, 1845, tem como característica principal a presença de grande quantidade de microconídios, macroconídios multisseptados, de base larga, pouco numerosos ou ausentes. Nesse gênero há espécies com características distintas, fazendo com que os pesquisadores Georg & Camp (1957) o subdividissem em três grupos: **I** – raramente produzem esporos ou pigmentação característicos, colônias com difícil diferenciação morfológica, sendo as principais espécies desse grupo *T. verrucosum*, *T. schoenleinii* e *T. concentricum*; **II** – colônias e pigmentação são variáveis, não servindo como critérios de identificação de espécies, para tanto se deve utilizar provas bioquímicas ou ferramentas moleculares, e as principais espécies são *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*; **III** – raramente produz microconídio, mas apresenta pigmentação como característica marcante (do vinho ao violeta), além de possuir crescimento lento e as principais espécies são *T. violaceum* e *T. ferrugineum*; **IV** – não podem ser diferenciados por morfologia, necessitando de ferramentas moleculares ou utilizando testes de necessidades nutricionais, são as espécies *T. megninii* e *T. equinum* (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995; Lacaz et al., 2002).

Os dermatófitos são também classificados de acordo com sua relação ecológica, podendo ser geofílico, zoofílico e antropofílico. As espécies de dermatófitos que são transmitidas entre humanos são as antropofílicas, sendo as outras consideradas como oportunistas, mas ainda podem causar lesões graves e de difícil tratamento, onde a espécie

geofílica *Microsporum gypseum* quando está causando dermatofitose provoca lesões com inflamações agudas e prurido excessivo. As espécies que infectam animais de uma maneira geral são as consideradas zoofílicas, e podem ser transmitidas entre animais contaminados e animais saudáveis inclusive humanos saudáveis, e as isoladas originalmente no solo são consideradas como as geofílicas, que podem ser transmitidas por contato com solos contaminados, sendo a população que trabalha diretamente com manejo de solo mais vulnerável à dermatofitoses com lesões de inflamações agudas. É importante ressaltar que os dermatófitos zoofílicos e geofílicos podem agir como porta de entrada para outros patógenos, podendo produzir uma infecção ainda mais grave (DE HOOG et al., 2016; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

2.2. Dermatofitoses

Dermatofitoses são também conhecidas como Tinhas ou Tíneas, e a manifestação clínica normalmente é de uma lesão eritramatosa, escamosa, e com prurido intenso. As dermatofitoses podem se apresentar como lesões superficiais até crônicas, a depender do estado de saúde inicial do paciente, no entanto, mesmo as lesões superficiais podem conduzir a um declínio na qualidade de vida do paciente, devido à desfiguração (principalmente em regiões anatômicas visíveis como a face). As Tíneas são agrupadas de acordo com a parte do corpo lesionada, com o a palavra Tínea seguido do nome do sítio anatômico em latim (PIRES et al., 2014; Lacaz, 2002; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Tínea capitis (figura 2a) é distribuída pelo couro cabeludo, usualmente causada por espécies dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, sendo mais frequente em crianças, é caracterizada como uma reação altamente inflamatória, com alopecia e as vezes acompanhada de febre, mal estar e linfadenopatia; *Tínea corporis* (figura 2b) é distribuída pelo tronco e extremidades formando lesões circulares, chamadas de ringworm; *Tínea faciei* e *tínea barbae* (figura 2c e 2d) são distribuídos pela face, sendo a *tínea faciei* na parte não barbada e a *tínea barbae* na parte barbada, podendo causar de severa a superficial reação inflamatória folicular pustulenta, comumente causada por *Trichophyton mentagrophytes* e *T. verrucosum*; *Tínea cruris* (figura 2e) é distribuída pela virilha e áreas adjacentes, e os principais agentes etiológicos são *T. rubrum* e *Epidermophyton floccosum*; *Tínea pedis* e *tínea manuum* (figura 2f e 2g) ocorrem nas extremidades dos membros, sendo a *tínea pedis* comumente chamada de “pé de atleta”, e a *tínea manuum* com tendência a afetar uma das mãos, embora o envolvimento de ambas as mãos é possível, os agentes etiológicos mais frequentes são *T.*

rubrum, *T. mentagrophytes* e *E. floccosum*; *Tínea unguium* (figura 2h) é a infecção das unhas, os dermatófitos *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* são os mais frequentemente encontrados neste tipo de lesão. As dermatofitoses quando se apresentam como lesões escamosas e secas marcadas por hiperkeratose (hiperplasia da camada córnea da pele) são características de infecções crônicas causadas pelos dermatófitos antropofílicos (CORTEZ *et al.*, 2012; Lacaz *et al.*, 2002; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).



Figura 2 - Manifestações Clínicas das dermatofitoses. a: Tinea capitis; b: Tinea corporis; c: Tinea faciei; d: Tinea barbae; e: Tinea cruris; f: Tinea pedis; g: Tinea manuum; h: Tinea unguium. Imagens encontradas no google imagens referenciadas uma a uma em cada imagem.

Em países europeus os agentes etiológicos mais frequentemente isolados são *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *T. mentagrophytes* var. *granulosum* e *T. verrucosum*, no entanto, devido a uma grande massa imigratória de ocorrência atual, como refugiados de guerras dentre outros, pode ter ocorrido uma mudança na prevalência desses agentes etiológicos. Dentre os agentes etiológicos já citados, o *T. rubrum* é o mais frequentemente identificado em pacientes com *Tínea corporis*, *Tínea pedis* e *Tínea unguium*, sendo encontrados em cerca de 83% das infecções na Suécia, por volta de 70% no Reino Unido, e na Alemanha e na Bélgica foi apontado que cerca de 90% e 76%, respectivamente, das onicomicoses são causadas por dermatófitos da espécie *Trichophyton rubrum* (HAYETTE & SACHELI, 2015; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

Quando se trata da América do Norte e Central o *T. rubrum* também é o agente etiológico mais encontrado nas dermatofitoses. Nos Estados Unidos e no México o agente infeccioso prevalente de dermatofitoses costuma ser da espécie *T. rubrum*, porém há uma concentração maior no México que nos EUA, sendo a prevalência de *T. rubrum* por volta de 47% nos EUA e 71% no México. Vale lembrar que nos EUA os casos de dermatofitoses são pouco registrados ou até mesmo identificados, além de que estes são países vizinhos com

intenso fluxo imigratório, o que reforça a existência de um mesmo agente infeccioso prevalente em proporções distintas (HAYETTE & SACHELI, 2015; SEEBACHER et al., 2008).

No Brasil, os estudos geralmente focam em uma determinada região ou estado, não havendo dados sobre o Brasil em sua totalidade. No estado de Goiânia foi feito um estudo em 1999 onde os autores afirmam que o *T. rubrum* é o mais prevalente, assim como em Fortaleza. Em um estudo feito entre março e novembro de 2003 na cidade de Manaus, o *T. rubrum* foi o mais frequentemente associado a onicomicose, com 45,45% dos casos registrados (AUGUSTO et al., 2006; BRILHANTE et al., 2000; COSTA et al., 1999).

A prevenção e o controle das infecções por dermatófitos devem levar em consideração a área invadida, o agente etiológico e a fonte da infecção. De uma forma geral, são poucos os casos de transmissão de dermatofitoses por via nasocomial havendo alguns surtos conhecidos (Lewis & Lewis, 1997; Snider, Landers & Levy, 1993; Kane et al., 1988; Mossovitch, M, Mossovitch, B & Alkan, 1986; Shah et al., 1988), em contrapartida transmissões por contato direto ocorrerem com uma frequência maior. As transmissões e os surtos, quando ocorrem, devem ser investigados imediatamente para evitar maior disseminação, devendo ser feito um exame nos profissionais de saúde, principalmente da ala neonatal e pediátrica, em busca de áreas de fluorescência pela lâmpada de Wood e por lesões óbvias na pele ou no couro cabeludo (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

2.3. Diversidade Genética dos Dermatófitos

Desde os primeiros estudos genéticos com dermatófitos podemos observar que a diferenciação das espécies não é tão simples, pois se trata de fungos com reprodução sexuada e muitas semelhanças morfológicas, além da facilidade de pleomorfismo. Stockdale em 1961 iniciou os estudos sobre heterotalismo (micélio autoestéril que requer a participação de outro talo compatível para a reprodução sexuada) em dermatófitos, demonstrando os *mating type* positivo e negativo. Geralmente neste tipo de reprodução, a progênie de ascósporos positivos e negativos é encontrada na proporção de 1:1, no entanto, os dermatófitos antropofílicos não apresentam este padrão, onde foi provado ao parear uma espécie antropofílica anamorfo e uma teleomorfo (*Arthroderma*), resultando em uma cepa de *Trichophyton* exclusivamente *mating type* negativo, sem a proporção 1:1. Esse tipo de reprodução trouxe algumas dificuldades para a identificação dos dermatófitos (GRUMBT; MONOD; STAIB, 2011; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

O pleomorfismo é um fenômeno que tornou a identificação dos dermatófitos mais complexa e se refere ao crescimento de um micélio aéreo, cotonoso e branco, sem pigmentação e conidiação característica (WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995). Para o entendimento deste fenômeno e para a melhor elucidação da classificação dos dermatófitos, foi necessário se utilizar de estudos em genética, já que estudos de morfologia não poderiam mais ser utilizados como características únicas no processo de identificação dos dermatófitos, havendo ainda o estudo de *de Hoog* e colaboradores (2016) sobre propostas relativas a taxonomia desses fungos, utilizando a taxonomia polifásica correlacionada.

O sequenciamento da região ITS é comumente utilizado para análises filogenéticas e identificação de espécies de dermatófitos, sendo a identidade para identificação de espécies de 99 - 100%, o que favoreceu o desenvolvimento de técnicas para abordagens de polimorfismos na mesma espécie, como a PCR (Reação em cadeia da polimerase) seguida de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) da região ITS (ITS1**Erro! Indicador não definido.** e ITS2), que permitiu a diferenciação de uma cepa africana e europeia de *Arthroderma benhamiae* (Cafarchia *et al.*, 2013).

A região ITS (internal transcribed spacer) fica localizada entre a subunidade maior e a pequena do RNA ribossomal, e é a região mais utilizada para a identificação de espécies. O RNA ribossômico constitui de 80 a 90% do RNA celular total, sendo 50 a 60% componente essencial da estrutura do ribossomo. Os ribossomos contêm várias moléculas de RNA diferentes, nos eucariotos são quatro moléculas 18S-5.8S-28S 5S (Figura 3). O sequenciamento da região completa (unidade grande e pequena) é pouco empregado para identificação de dermatófitos, pois a região ITS já vem sendo muito bem utilizada para a identificação, no entanto, para um estudo de diferenciação de cepas pode vir a ser de um bom uso a região ITS1, sendo esta a mais diversa na região ribossômica (Korabecna, M., 2007; WHITE, T.B.1990).

O gene *Topoisomerase II* não é tão amplamente utilizado para identificação de espécies, havendo descrição do emprego em uma abordagem de nested-PCR (PCR modificada reduzir a ligação não específica do produto amplificado) seguido de RFLP para identificação e espécies do gênero *Microsporum* e *Trichophyton* (Cafarchia *et al.*, 2013), no entanto, recentemente *de Hoog* e colaboradores (2018) descreveram uma abordagem onde diferenciaram espécies muito próximas geneticamente utilizando este gene e o gene *beta-tubulina II*, diferenciando corretamente *T. rubrum* e *T. violaceum*.

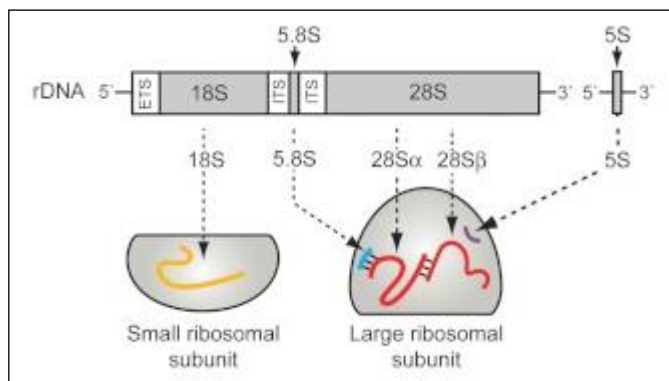


Figura 3 - Constituição ribossomal (imagem modificada de Winnebeck EC1, Millar CD, Warman GR. , 2010).

Os dermatófitos possuem também mecanismos de defesa contra drogas antifúngicas, com mutações pontuais em genes de importância para a estrutura celular fúngica, que interferem diretamente no metabolismo de antifúngicos (Salehi, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2018). Persinot e colaboradores 2018 descreveram uma abordagem de MLST (multilocus sequence typing) para *T. rubrum* com foco nesses genes, no entanto, só conseguiu diferenciações com um estudo genômico, na qual todo o genoma do fungo foi analisado e comparado.

2.4. Tratamentos utilizados nas Dermatofitoses

O relato do primeiro tratamento oral das dermatofitoses com griseofulvina isolada do *Penicillium chrysogenum* nos anos 1930 e utilizada pela primeira vez no tratamento de dermatofitoses em 1958, revolucionou a terapia dessas infecções fúngicas e iniciou a primeira grande mudança na terapia da *tinea capitis* desde o trabalho de Sabouraud. Nos dias atuais usa-se ainda a griseofulvina como tratamento oral, mas pelo fato de ser fungistática (interrompendo o crescimento, mas não causando a morte do fungo) deve ser administrada em conjunto com tratamento tópico. No tratamento tópico geralmente são utilizados os antifúngicos de derivados azólicos como o Cetaconazol, Nitrato de Miconazol e Clotrimazol. A venda desses antifúngicos de uso tópico para tratamento de dermatofitoses é comum e mais frequente (SINGH; KUMAR; JOSHI, 2014; LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; SIDRIM & MOREIRA, 1999; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

O tratamento das dermatofitoses e de outras micoses em geral são difíceis principalmente porque os antifúngicos não têm ação somente sobre o agente infeccioso, afetando células eucarióticas, inclusive podendo afetar também os humanos. O agente

antifúngico Anfotericina B é uma droga antifúngica que possui um grau de toxicidade renal estimada através do monitoramento do nitrogênio ureico no sangue, além de outros efeitos colaterais quando em testes sistêmicos como dores de cabeça, calafrios, febre e anorexia. O tratamento oral por Cetoconazol é eficaz em dermatofitoses, mas tratamentos prolongados leva a efeitos colaterais (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; VISHNU et al., 2015).

Os antifúngicos derivados azólicos passaram a ser sintetizados após os anos 1970, quando o primeiro do grupo foi lançado, o Miconazol. Este grupo de antifúngicos se diferenciam por terem seu mecanismo de ação focado na enzima *citocromo-oxidase P₄₅₀*, sendo subdivididos em dois grupos imidazol e triazol (com base no número de átomos de nitrogênio em suas moléculas). O grupo imidazol inclui o Miconazol, Econazol, Cetaconazol, Oxiconazol e Clotrimazol aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) a partir de 1974, 1982, 1985, 1988, 1993 respectivamente, e os agentes antifúngicos Bifonazol, Tioconazol e Sertaconazol também fazem parte deste grupo, sendo o último citado o mais recente com atividade antifúngica de amplo espectro. Em geral, os imidazóis exibem efeitos colaterais como anorexia, constipação, dor de cabeça, hepatite, prurido, exantema e inibição da síntese de hormônio. O grupo triazol inclui os antifúngicos Fluconazol, Voriconazol, Itraconazol (1980), Posaconazol, Teraconazol e Ravuconazol, e em comparação com os imidazóis, os triazóis apresentam menor grau de efeitos colaterais que incluem náuseas, tonturas e transtorno gastrointestinal (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999).

O grupo das Alilaminas (1980) incluem Naftifina e Terbinafina, que obtiveram a aprovação da FDA nos anos de 1988 e 1992, respectivamente (Figura 2). O modo de ação desses medicamentos é a inibição da principal enzima *esqualeno-epoxidase*, envolvida na síntese de epóxido do esqualeno. A Anfotericina B e a Nistatina são pertencentes a classe dos poliênicos com mecanismo de ação relacionado à síntese de Ergosterol, semelhante aos azóis (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; SHEEHAN; HITCHCOCK; SIBLEY, 1999). Dentre os principais antifúngicos receitados aos pacientes, aqueles que podem ser encontrados, dos mais baratos aos mais caros variando entre genérico e marca, não são encontrados na lista da farmácia popular disponibilizada, são: Cetoconazol, Clotrimazol, Nitrato de Miconazol, Fluconazol, Griseofulvina e Nistatina (numa faixa de R\$68,49 a R\$ 170,41); e Cloridrato de Terbinafina e Itraconazol (na faixa de 81,08 a R\$314,24).

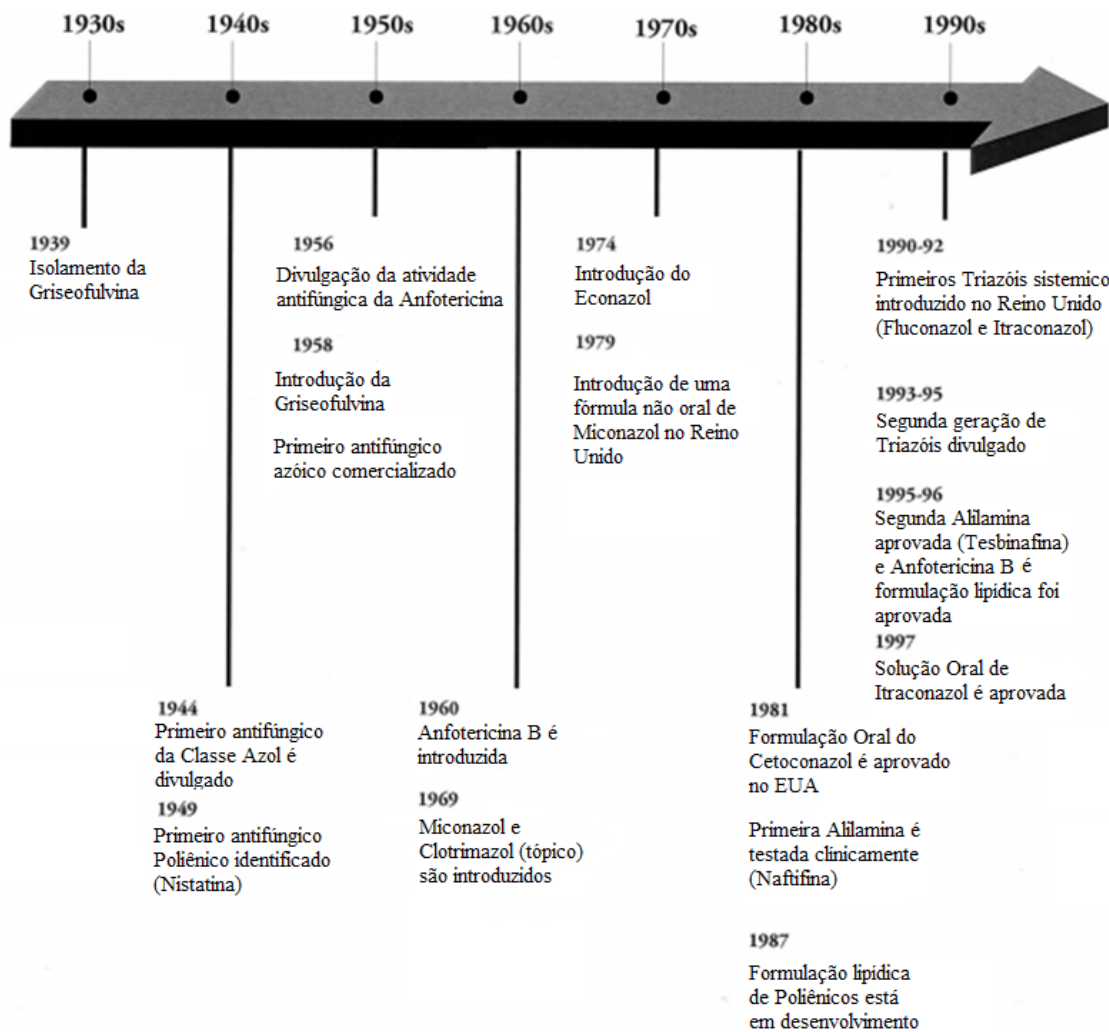


Figura 4 - Linha histórica do desenvolvimento dos antifúngicos (imagem original em inglês pode ser acessada no artigo de SHEEHAN e colaboradores, 1999)

O conhecimento do diagnóstico adequado e do sítio anatômico afetado é necessário para que o tratamento tenha uma maior eficácia minimizando os efeitos colaterais da droga no paciente com dermatofitose. A Sulfadiazina de prata é uma droga nova e com atividade antifúngica eficaz, tendo como mecanismo de ação direta no DNA microbiano, evitando a descompactação da dupla hélice, inibindo a replicação de microrganismos sem perturbar a regeneração celular epitelial do hospedeiro (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010; VISHNU et al., 2015).

Os casos de reincidência da doença são comuns em dermatofitoses, principalmente após a interrupção do tratamento com antifúngicos. Estudos sobre a resistência ao tratamento tentam trazer as possíveis explicações sobre os casos de reincidência, principalmente pelo fato do mal-uso da medicação. Em testes laboratoriais a resistência de um microrganismo pode ser classificada como intrínseca ou adquirida, a primeira é aquela em que todos os membros

normais de uma espécie são tolerantes a um determinado fármaco, sendo esta uma característica específica responsável pela resistência, inerente à espécie que surgiu através do processo evolutivo. Em contrapartida, a resistência adquirida é um termo usado quando a resistência emerge em uma população que era anteriormente sensível a drogas. O desenvolvimento da resistência a esses fármacos ocorre devido ao uso inadequado ou irregular de drogas, casos em que o paciente é imunodeficiente, e do aumento da venda indiscriminada de antifúngicos nos últimos anos, especialmente aos azóis (NIGAM, 2015; MARTINEZ-ROSSI; PERES; ROSSI, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar a correlação entre a variabilidade genética frente ao comportamento aos antifúngicos de espécies do gênero *Trichophyton* causadores de dermatofitose em pessoas atendidas em um Serviço Público de Micologia de Manaus/AM.

3.2. Objetivos Específicos

- i. Conhecer o perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos do gênero *Trichophyton* à antifúngicos de uso tópico e oral;
- ii. Determinar a variabilidade genética intraespecífica de isolados clínicos do gênero *Trichophyton*;
- iii. Realizar uma revisão sistemática da literatura para determinar a prevalência mundial de *T. rubrum* como causador de dermatofitose.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Modelo de Estudo

Trata-se de um estudo transversal, descritivo, observacional.

4.2. Aspectos Éticos

O presente estudo é parte do projeto intitulado: “Estudo etio-epidemiológico e molecular dos dermatófitos causadores de dermatofitoses em pessoas atendidas em Serviços Públicos de Micologia de Manaus/AM”, com Chamada Pública PROEP/FAPEAM n. 001/2014. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa por meio da Plataforma Brasil, e está aprovado com o CAAE 45590015.3.0000.5020 (ANEXO I).

4.3. Amostras

Foram estudadas 24 cepas do gênero *Trichophyton* (Tabela 1) isolados de pacientes atendidos no Serviço de Micologia da Fundação de Medicina Tropical – HVD no período de janeiro de 2015 a julho de 2017. As amostras foram armazenadas no Laboratório de Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz na temperatura de 4° C.

A identificação prévia de cada amostra foi feita por exame direto com o uso de 20% de KOH (hidróxido de potássio) montada ao microscópio e crescimento em cultura de ágar Sabouraud dextrose (Merck). As culturas foram incubadas à temperatura ambiente (30° C) e observadas por até 4 semanas. A interpretação dos resultados foi obtida do exame direto e as identificações por morfologia dos dermatófitos foram realizadas de acordo com os critérios de Rebell & Taplin (1979) e *de Hoog et al.* (2014) no Laboratório de Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane da Fiocruz / AM.

Tabela 1 - Amostras estudadas provenientes de 23 pacientes atendidos no Serviço de Micologia da Fundação de Medicina Tropical – HVD no período de janeiro de 2015 a julho de 2017.

Número de amostra 309 e 1482 são do mesmo paciente, que é reincidivo.

* Identificado apenas pela morfologia.

Amostra	Espécie	Tinea	Doença Concomitante	Grupo etário
129	<i>Trichophyton interdigitale</i> .	Tínea cruris e Tínea corporis	.	Criança
309	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tínea unguium, Tínea pedis, Tínea faciei e Tínea corporis	pré diabetes	Idosa
568	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tinea cruris	.	Idosa
28	<i>Trichophyton interdigitale</i> .	Tinea cruris	.	Adulto
1600	<i>Trichophyton rubrum</i>	Tinea capitis	.	Criança
299	<i>Trichophyton rubrum</i> *	Tinea corporis	HIV	Adulto
372	<i>Trichophyton rubrum</i> *	Tinea faciei	HIV	Adulto
1560	<i>Trichophyton rubrum</i> *	Tínea cruris e Tínea corporis	.	Adulto
419	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Criança
538	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	Exantema Súbito	Criança
116	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Adulto
125	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tínea capitis e Tínea corporis	HIV	Adulto
133	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	.
220	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Criança
245	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	Pediculose	Criança
286	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea faciei	Neurodermatite	Adulto
290	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea faciei	.	Criança
358	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	Treatment immunosuppressivo	Idoso
1254	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Criança
1413	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Criança
1645	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Criança
Q200R	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	.	Criança
Q200B	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	.	Criança
1482	<i>Trichophyton verrucosum</i>	Tinea pedis e Tinea unguium	pré diabetes	Idosa

4.4. Caracterização Molecular das Amostras

4.4.1. Extração de DNA

As amostras de dermatófitos foram cultivadas de três a sete dias em caldo Sabouraud e submetidas ao protocolo de extração por fenol/clorofórmio e proteinase K. O micélio foi rompido em macerador automático (BeadBug™, Merck) com pérolas de vidro 0,5 mm na presença de Tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 8, 50 mM EDTA, DTT 1%, SDS 1%). Após isso, foi adicionado proteinase K e a mistura foi incubada em temperatura de 60° C por 30 min. O DNA foi extraído com fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico (v/v) e precipitado com isopropanol. O total de ácidos nucleicos precipitados foram lavados em 500 µL etanol 70%,

secos à temperatura ambiente e ressuspensos em 30 μ L de Tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM EDTA) e armazenado à - 20° C até o momento do uso.

4.4.2. Amplificação da região ribossomal

A partir de 2 μ L do DNA genômico de cada amostra foi possível realizar a PCR, com volume final de 15 μ L, utilizando o “kit” Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) e os primers 18S (Medlin *et. al* 1988) e 28S (FELL, J.W, 1993), nas concentrações: Tampão 1X, Mix de dNTPs 0,2mM, MgCl² 1,5 mM, primers 0,3 mM cada (forward e reverse). A desnaturação inicial foi a 95° C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, anelamento a 60° C por 30 segundos e 72° C por 3 minutos, a extensão final de 10 minutos a 72° C, com produto de 3000 pb da região ribossomal parcial (Figura 5). As amplificações foram confirmadas em gel de agarose a 1%, corados com Brometo de etídio (Merck) e visualizados com luz UV-III.

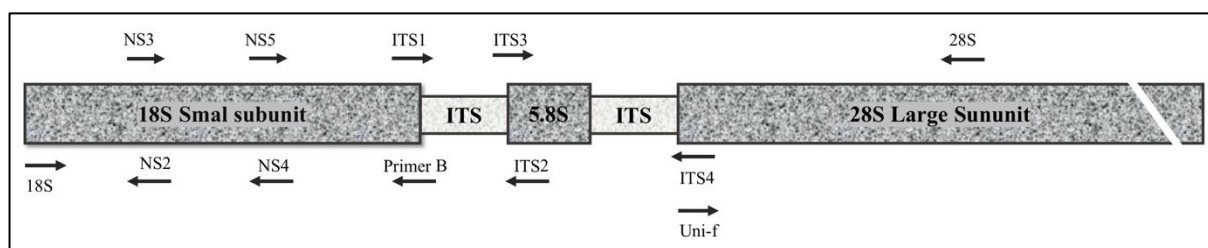


Figura 5 - Representação da região ribossomal 18S-5.8S-28S com os respectivos primers para PCR e sequenciamento. As seqüência e referências de cada primer podem ser vistas na Tabela2. Imagem modificada de WHITE, T.B.; LEE, 1990.

4.4.3. Sequenciamento da região ribossomal

O DNA amplificado foi purificado com o Agencourt Ampure xp (kit beads magnéticas) para a retirada de impurezas.

A região ribossomal foi sequenciada em partes, utilizando primers de acordo com a parte de interesse (Figura 5) e com um conjunto de reagentes “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems) com volume final de 10 μ L contendo 5,2 μ L de água ultrapura, 0,3 μ L do primer específico (Tabela 2) a 10mM, 0,5 μ L de BigDye, 2,0 μ L de tampão e 2 μ L de DNA (produto amplificado). As condições da reação de sequenciamento procederam da seguinte forma: 95° C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95° C por 30 segundos, hibridização a 58° C por 10 segundos e 60° C por 2 minutos.

Tabela 2 - Especificações de cada primer utilizado para sequenciar parcialmente a região ribossomal 18S-5.8S-28S (Figura 5).

Primer	Sequência	Referência
NS2	5' - GGC TGC TGG CAC CAG ACT TGC - 3'	
NS3	5' - GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC - 3'	
NS4	5' - CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG - 3'	
NS5	5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'	WHITE, T.B.; LEE, 1990
ITS1	5' - TCC GTA GGT GAA CCT GCG G - 3'	
ITS3	5' - GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3'	
ITS4	5' - TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC - 3'	
18S	5' - AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT - 3'	
PrimerB	5' - TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC - 3'	Medline <i>et. al</i> 1988
Uni-f	5' - GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG - 3'	
28S	5' - GGT CCG TGT TTC AAG ACG - 3'	FELL, J.W, 1993.

4.4.4. Precipitação da reação de Sequenciamento e Eletroforese capilar

Após a reação de sequenciamento foi adicionado 6 µL de NG (1 mg/mL de glicogênio dissolvido em NH₄OAc 5 M) e 50 µL de Etanol 95% (Merck) incubados a -20° C por 30 minutos.

As amostras foram centrifugadas a 4400 rpm por 40 minutos a 4° C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado duas vezes com 110 µL de Etanol 70% (Merck) com centrifugação de 4400 rpm por 10 minutos, entre as lavagens. Após descartar o sobrenadante a secagem do precipitado foi em temperatura ambiente.

Após a secagem do precipitado, foi dissolvido em 10 µL de formamida e submetido a desnaturação por 5 minutos a 95° C e depois do resfriamento foi sequenciado em equipamento de eletroforese capilar (AB1 3500, Applied Biosystems).

4.4.5. Caracterização da variabilidade genética por PCR-RFLP

A partir da obtenção das sequências das amostras de *Trichophyton* da região ribossomal 18S-5.8S-28S foi verificado que para um ensaio homogêneo entre as cepas, somente aquelas que apresentaram as sequencias integras da região ITS1 até a região parcial 28S entraram para o ensaio.

Sendo assim, 17 amostras das 24 foram analisadas *in silico* com o software NEBcutter V2.0, para determinar a melhor estratégia de PCR-RFLP a ser utilizada, sendo esta com as enzimas *ApoI* e *EcoRI*. Foram incluídas as espécies *T. rubrum* (1 amostra), *T. verrucosum* (1 amostra), *T. tonsurans* (12 amostras) e *T. interdigitale* (3 amostras). As duas primeiras

espécies entraram no estudo apenas com a finalidade de demonstrar a diferenciação das espécies para o corte enzimático das enzimas de restrição.

4.5. Teste de sensibilidade à Antifúngicos

As amostras de dermatófitos foram testadas quanto à sensibilidade aos antifúngicos utilizando a técnica de microdiluição em caldo protocolo M38-A2 para fungos filamentosos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Os antifúngicos testados foram: Cetoconazol, Fluconazol, Miconazol, Clotrimazol, Cloridrato de Terbinafina, Anfotericina B, Griseofulvina (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo), Itraconazol e Nistatina (European Pharmacopoeia Reference Standard).

O Fluconazol e a Nistatina foram dissolvidos em água destilada, enquanto que os demais em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções estoques foram preparadas a uma concentração de 1280 µg/mL e armazenadas a -20° C antes do uso.

Os agentes antifúngicos foram diluídos ao dobro em caldo RPMI 1640 (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo) sem bicarbonato de sódio tamponado a pH 7,0 com ácido morfolino- propanossulfônico (MOPS) de tal modo que as concentrações variaram de 0,125 a 64 µg/mL para Fluconazol e Nistatina e para os demais antifúngicos acima citados 16 µg/mL a 0,0313 µg/mL.

As amostras de dermatófitos foram cultivados em tubos contendo ágar batata dextrose durante sete a 14 dias a 30° C, onde foram adicionados 10 mL de solução salina estéril (0,85%) de maneira a cobrir a superfície da colônia para raspagem e mistura de conídios e hifas. A suspensão resultante foi transferida para um tubo estéril e após 15 minutos de sedimentação, as partículas suspensas foram utilizadas para o inóculo, o qual foi ajustado em espectrofotômetro em uma transmitância de aproximadamente 65 a 70%, em um comprimento de onda de 530 nm, que equivale a aproximadamente 0,6 a 1,4 X 10⁶ cels/mL. Em seguida, as suspensões contendo os inóculos foram diluídas em caldo RPMI 1640 de tal modo a obter uma concentração final de 0,4 a 5 X 10⁴ cels/mL.

As placas de microtitulação contendo 96 poços foram montadas de maneira a conter as concentrações, mencionadas a cima, do agente antifúngico (100 µL). A cada poço, contendo 100 µL do agente antifúngico, foram adicionadas alíquotas de 100 µL do inóculo na concentração a cima citada, de tal modo que as concentrações dos fármacos ficaram diluídas ao dobro.

Foi utilizado a cepa-tipo *Candida parapsilosis* ATCC 22019 para controle dos agentes antifúngicos, além de controle do inóculo e do meio de cultura (RPMI 1640) para cada teste

(Figura 3). Todas as placas de microdiluição foram incubadas a temperatura de 35° C, sem agitação.

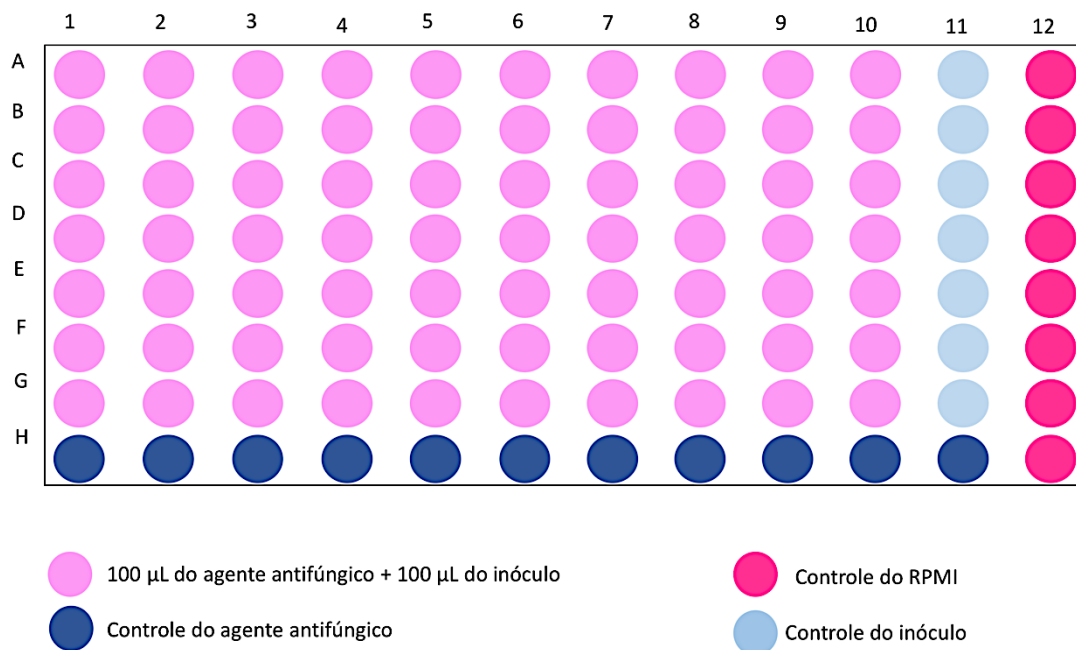


Figura 6 - Esquema da placa para Microdiluição em caldo (Protocolo M38-A2). Em uma placa testa-se 5 dermatófitos para um antifúngico. As letras de A-F são referentes as amostras de dermatófitos testadas; números de 1 a 10 são referentes a cada concentração testada e os números 11 e 12 são o Controle negativo e o positivo, respectivamente.

4.6. Análise dos dados

As seqüências e eletroferogramas de 21 amostras foram analisadas no Software Geneious versão 6.0.6, e comparadas com o banco de dados GenBank do NCBI, através da ferramenta BLASTn do NCBI. Aquelas sequencias que apresentaram maior query de identidade foram escolhidas e alinhadas pelo programa ClustalW junto com as 21 seqüências obtidas nesse estudo. O alinhamento múltiplo foi agrupado por identidade. O modelo de substituição foi escolhido usando a ferramenta Best-Fit models do MEGA X.

Análises evolutivas foram conduzidas em MEGA X e a história evolutiva foi inferida usando o método da Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood) e o modelo de Tamura-Nei (1993). A árvore consenso, criada a partir de 500 replicatas utilizando o teste filogenético “bootstrap”, e uma distribuição Gama discreta para modelar as diferenças de taxa evolutiva entre os locais (5 categorias (+ G, parâmetro = 1.8500)). A análise envolveu 42 seqüências nucleotídicas, todas as posições com menos de 80% de cobertura do sitio foram eliminadas. Houve um total de 860 posições no conjunto de dados final.

Na etapa de teste de sensibilidade à antifúngicos a leitura dos espelhos do CIM para a *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi realizada 48h após o inóculo, e para cada amostra de *Trichophyton* após 120 h (5 dias). Todas as leituras dos espelhos foram feitas por duas pessoas de forma independente, e depois os resultados foram mesclados e acordados por ambos.

Os valores de ponto de corte utilizados para interpretar a susceptibilidade estabelecidos no protocolo do CLSI são para Fluconazol, Anfotericina B e Itraconazol (incluindo novos triazólicos), sendo os demais antifúngicos sem pontos de corte definidos na literatura (Tabela 3). Os resultados obtidos foram analisados pelo programa WHONET 5.6 v.19.2.15 (WHO, Genebra, Suíça), programa desenvolvido e disponibilizado gratuitamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como parte do Programa de Monitoramento de Resistência Microbiana. Com este programa foi calculada, CIMrange, CIM50, CIM90 e Média Geométrica.

Antifúngico	Sensível	SDDependente* / Intermediário	Resistente ®
Anfotericina B	≤ 1	2	≥4
Itraconazol	≤ 1	2-4	≥8
Fluconazol	≤ 8	16-32	≥64

Tabela 3 - Valores de pontos de corte sugerido pelo CLSI para interpretação de susceptibilidade à antifúngicos.

Os valores foram generalizados, visto que não foram estabelecidos valores específicos para Dermatófitos.

* Susceptibilidade dose-dependente categoria exclusiva para triazólicos

Na etapa de caracterização da variabilidade genética das amostras de *Trichophyton* por PCR - RFLP não foi realizada a comparação com cepas-padrão, sendo os padrões de RFLP atribuídos visualmente comparando-os entre si, determinando uma variabilidade entre as amostras de *Trichophyton* para comparação com os resultados obtidos na etapa de caracterização dos perfis de sensibilidade aos antifúngicos.

A correlação entre o perfil de sensibilidade à antifúngicos e os dados moleculares encontrados foram feitas de forma descritiva sem tratamento estatístico.

4.7. Revisão Sistemática da Literatura

A revisão sistemática foi conduzida seguindo as normas estabelecidas pelo PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*).

A pesquisa bibliográfica eletrônica foi conduzida em cinco Base de dados (Medline, Web of Science, Scopus, LILACS e Scielo) e foi realizada utilizando termos de pesquisa para a pergunta: *Qual a prevalência de dermatofitoses causadas por Trichophyton rubrum?*

Os termos de pesquisa foram: *Medline*: ("trichophyton"[MeSH Terms] OR "Trichophyton rubrum"[All Fields]) and ("Prevalence"[Mesh]); *Lilacs*: (mh:(trichophyton)) OR (tw:(Trichophyton rubrum)) AND (mh:(Prevalence)); *Scielo*: ((trichophyton) OR (Trichophyton rubrum)) AND (Prevalence); *Web of Science*: Tópico:(trichophyton rubrum) AND Tópico:(Prevalence); *Scopus*: (TITLE-ABS-KEY (trichophyton) OR ALL (trichophyton AND rubrum)) AND (TITLE-ABS-KEY (prevalence)).

Os resultados das bases de dados foram mesclados e as duplicatas removidas utilizando o software Mendeley Ltd v 1.19 (Elsevier). A avaliação dos resultados da busca no banco de dados eletrônico foi realizada por dois autores de forma independente, e as discrepâncias foram discutidas e acordadas de acordo com os critérios de inclusão e exclusão (Quadro 1).

Editoriais, revisões, comentários e artigos de opinião foram excluídos. Os artigos foram limitados a dermatofitose humana. Artigos de interesse adicionais foram identificados a partir da revisão das bibliografias de artigos relevantes.

Por atender os critérios de inclusão, cada publicação teve um escore de cinco a oito na aplicação do instrumento de validação (Loney, 1998). Para a coleta de dados e montagem da base de dados no Microsoft Excel (2016) foi utilizado um instrumento de coleta de dado elaborado no presente trabalho (ANEXO II).

Pergunta	Base de dados	Limitações	Nº de publicações	Fator de Exclusão de Artigos
Qual a prevalência de dermatofitoses causadas por <i>Trichophyton rubrum</i>?	pubMed	humanos	199	<ul style="list-style-type: none"> · Idioma; · Falta de dados obre <i>T. rubrum</i>; · não aborda prevalência.
	Lilacs		160	
	Scielo		17	
	ISI		275	
	Scopus		274	

Quadro 1 - Representação da pesquisa de Revisão Sistemática em banco de dados e os fatores de exclusão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão expostos em formato de dois Artigos.

- **ARTIGO 1: Nine drugs antifungal profile and genetic variability of clinical samples of *Trichophyton* species isolates in Manaus, Amazonas - Brazil.**
Artigo a ser submetido à revista *Mycoses*.
- **ARTIGO 2: World Prevalence of *Trichophyton rubrum*: A Systematic Literature Review.** Artigo a ser submetido à revista *Journal of Infection and Public Health*.

5.1. ARTIGO1: Nine drugs antifungal profile and genetic variability of clinical samples of *Trichophyton* species isolates in Manaus, Amazonas - Brazil.

1 **Nine drugs antifungal profile and genetic variability of clinical samples of *Trichophyton***
2 **species isolates in Manaus, Amazonas - Brazil.**

3

4 GRISOLIA M.E.¹, MOTA, A. J.³, ALVES G.S.³, BARROSO L.C., NETO J.R.S., TAVARES
5 R.M., CRUZ, K. S.², JACKISCH-MATSUURA, A. B.⁴

6

7 ¹Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia -
8 ILMD/Fiocruz; ²Pesquisadora em Micologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor
9 Vieira Dourado (FMT-HVD); ³Professor da Universidade Federal do Amazonas (UFAM);

10 ⁴Pesquisadora no Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD/Fiocruz). E-mails:
11 ⁴ani.matsuura@fiocruz.br, ¹eduarda.grisolia@hotmail.com.

12

13 **ABSTRACT**

14 *Trichophyton* is a genus with the most anthropophilic pathogenic species and some species
15 can a longer and often more complex treatments being able to cause a chronic, non- or mild-
16 inflammatory infection. The aim of this study was to evaluate the genetic variability of
17 dermatophytes in clinical isolates and to verify the antifungal susceptibility profile. The
18 dermatophytes (24 isolates, 13 *T. tonsurans*, 6 *T. interdigitale*, 4 *T. rubrum* and 1 *T.*
19 *verrucosum*) obtained of 23 patients in Department of Mycology of Fundação de Medicina
20 Tropical Heitor Vieira Dourado studied in the present work, was tested for nine drugs
21 (itraconazole, fluconazole, clotrimazole, ketoconazole, miconazole, griseofulvin, terbinafine,
22 nystatin and amphotericin B). The phylogenetic analysis of dermatophytes was performed
23 with the ribosomal region and the genetic variability was by a RFLP analysis with *ApoI* and
24 *EcoRI*. The data provide resistant isolates of all isolates tested and a genetic diversity in *T.*
25 *tonsurans* and *T. interdigitale*.

26

27 **Keywords:** *Trichophyton*; Ribosomal DNA; Antifungal Agents

28

29 **INTRODUCTION**

30 Dermatophytes are keratinophilic filamentous fungi, and estimated that about 20–25 %
31 of the world's population carries a dermatophyte infection. Currently are three genera of
32 dermatophytes: *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton* (ZHAN, P. et al., 2018).

33 *Trichophyton* is a genus with the most an anthropophilic pathogenic species, and some
34 species can a longer and often more complex treatments being able to cause a chronic, non- or
35 mild-inflammatory infection. For prevention and control of dermatophytosis, it is to
36 consideration the lesion location, causative agent and source of infection (ZHAN, P. et al.,
37 2018; WEITZMAN & SUMMERBELL, 1995).

38 Treatment of dermatophytoses with antifungal agents has effect not only on the
39 infectious agent, affecting others eukaryotic cells, also humans cells. Antifungal susceptibility
40 test of dermatophytes is a helpful tool for managing patients with different types of
41 dermatophytosis (Salehi, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M., 2018; Vishnu
42 et al., 2015; Lakshmiathy; Kannabiran, 2010).

43 The aim of this study was to evaluate the genetic variability of dermatophytes of
44 *Trichophyton* genus in clinical isolates and to verify the antifungal susceptibility profile.

45 **METHODS**

46 **Clinical fungal isolates**

47 Clinical samples obtained from patients suspected to dermatophytosis referred to the
48 Department of Mycology of the Fundação de Medicina Tropical Heitor Vieira Dourado were
49 examined for etiologic dermatophytes from January 2015 to July 2017. Identification of
50 isolates was primarily carried out using direct microscopy and culture.

51 In this study was included 24 dermatophyte (table 1). Reference strain for the
52 antifungal drugs test was *Candida parapsilosis* (ATCC 22019). All the samples are stored in
53 the Laboratory of Mycology on Instituto Leonidas e Maria Deane (Fiocruz/Amazonas) at a
54 temperature of 4° C.

55 **Molecular Identification by ribossomal region sequencing**

56 The molecular Identification was performed in Biotechnology Laboratory of
57 Universidade Federal do Amazonas. Genomic DNA was obtained by phenol/chloroform and
58 proteinase K method. The fungal mycelium was disrupted by microtube homogenizer
59 (BeadBug™, Merck) with glass bead 0.5 mm, in presence of extraction buffer (100 M Tris-
60 HCl, pH 8, 50 mM EDTA, DTT 1%, SDS 1% w/v). After that, the mixture was vortexed,
61 proteinase K was added, and total content was incubated at 60 °C for 30 min. The DNA was
62 extracted with an equal volume of phenol/chloroform. Total nucleic acids were precipitated
63 with isopropanol, washed in 500 µL ethanol 70%, air-dried, rehydrated in 50 µL TE buffer,
64 and stored at - 20 °C till it was used.

65 The Ribosomal region was amplified using primer 18S (Medlin et. al 1988) and 28S
66 (FELL, J.W, 1993). Each mixture contained 2 μ L of DNA template, 0.3 μ M of each primer,
67 0,3 mM of DNTP Mix, enzyme buffer 1X, 1 U/ μ L of Taq Polymerase Platinum® (Invitrogen)
68 and enough water to reach a final reaction volume of 25 μ L. Negative controls (water instead
69 of fungal DNA) were added to each PCR. The reaction mixture was initially denatured at 95°
70 C for 3 min followed by 35 cycles of 30 seconds at 95° C, 30 seconds at 60° C, and 3 min at
71 72° C, and a terminal extension step of 72° C for 10 min.

72 PCR products was electrophoresed on 1% agarose gel in TE buffer, then observed, and
73 photographed under ultraviolet irradiation.

74 **Antifungal sensitivity profile**

75 Stock solutions of antifungal drugs are in Mycology Laboratory of Instituto Leônidas e
76 Maria Deane (Fiocruz/Amazon), and were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-
77 Aldrich, St. Louis, MO, USA) and in deionized water (Fluconazol and Nystatin) according to
78 CLSI M38-A2 broth microdilution guidelines. Diluted in standard RPMI 1640 medium
79 buffered to pH 7.0 with 0.165 mole/L 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) with
80 L-glutamine without bicarbonate (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). The final
81 concentration of drugs, fungal spore suspensions, and drug dilutions was prepared according
82 to CLSI M38-A2 broth microdilution guidelines (CLSI, 2008).

83 All the dermatophytes were exposed to different concentrations of antifungal drugs in
84 96-well flat bottom microplates. The inoculated microplates were incubated at 35 °C and
85 visually assessed for fungal growth after 5 days incubation. The MIC was defined as the point
86 at which the growth of dermatophyte was inhibited by 80% for nine antifungals in comparison
87 with the control. The reference strain *C. parapsilosis* (ATCC 22019) were used as quality
88 control.

89 The braking-points used to interpret the susceptibility established in the CLSI protocol
90 are for Fluconazole, Amphotericin B and Itraconazole (including new triazolic), and the other
91 antifungal agents without braking-points are defined in the literature. The results obtained
92 were analyzed by WHONET program 5.6 v.19.2.15 (WHO, Geneva, Switzerland), developed
93 and made freely available by the World Health Organization (WHO) as part of the Microbial
94 Resistance Monitoring Program. With this program was calculated, MIC_{range}, MIC₅₀, MIC₉₀
95 and Geometric mean.

96

97 **Ribosomal region sequencing, Assembly and Phylogeny**

98 The ribosomal region was Sequencing in steps (figure 2), and using BigDye®
99 Terminator v3.1 Cycle Sequencing Applied Biosystems in AB1 3500 Applied Biosystems.
100 The sequences assembly were made by *De Novo* analysis in Geneious software. Evolutionary
101 analyzes were conducted in MEGA X and evolutionary history was inferred using the
102 Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model (1993).

103 **Genetic Variability of *Trichophyton* species**

104 For the genetic variability of *Trichophyton* was used *in silico* RFLP performed with
105 NEBcutter v2.0 online tool. From the sequencing of the *Trichophyton*, samples from the
106 ribosomal region 18S-5.8S-28S it was established that for a homogeneous assay among the
107 strains only ITS1 region to the 28S region would enter the assay. Thus, 17 samples of 24
108 implemented the *in silico* assay. To determine the best strategy for genetic variability, was
109 used the restriction enzymes *ApoI* and *EcoRI* for cut the sequences of 12 samples of *T.*
110 *tonsurans*, three *T. interdigitale*, one *T. rubrum* and one *T. verrucosum*.

111 **RESULTS and DISCUSSION**

112 **Clinical fungal isolates**

113 General features of 24 dermatophyte isolates studied in the present work are
114 summarized in Table 1. Among of 23 patients 43,5% had Tinea capitis, 17,4% Tinea corporis,
115 13% Tinea faciei, 8,7% Tinea cruris and 21,7% has lesion in multiple sites of infection. This
116 20,8% is dermatophytose caused by *Trichophyton interdigitale*, 17,4% *Trichophyton rubrum*
117 an 58,3% *Trichophyton tonsurans*. Because this study use a random chosen of sample, this no
118 represented the most causative agent of dermatophytosis in Amazonas. However,
119 *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton interdigitale* has been presenting an increase
120 growth as the second most common etiologic agent isolated in dermatophytoses in several
121 countries (Borman, A. M. et al., 2007; Welsh, O., et al., 2006; Zamani, S., et al., 2016).

122 Show attention for isolate of *T. rubrum* (1600 in table 1.) causing Tinea capitis. This
123 agent is not common cause of T. capitis and less 1% in a children patient (Schwinn A1, Ebert
124 J, Bröcker EB., 1995).

125

126

127

Sample	Specie	Tinea	Concomitant Disease	Age Group
309	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tinea unguium, Tinea pedis, Tinea faciei e Tinea corporis	pre diabetes	Elderly
568	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tinea cruris	.	Elderly
28	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tinea cruris	.	Adult
129	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Tinea cruris e Tinea corporis	.	Children
1600	<i>Trichophyton rubrum</i>	Tinea capitis	.	Children
299	<i>Trichophyton rubrum*</i>	Tinea corporis	HIV	Adult
372	<i>Trichophyton rubrum*</i>	Tinea faciei	HIV	Adult
1560	<i>Trichophyton rubrum*</i>	Tinea cruris e Tinea corporis	.	Adult
419	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Children
538	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	Skin rash	Children
116	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Adult
125	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis e Tinea corporis	HIV	Adult
133	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	.
220	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Children
245	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	Pediculosis	Children
286	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea faciei	Neurodermatite	Adult
290	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea faciei	.	Children
358	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	immunosuppressive treatment	Elderly
1254	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Children
1413	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Children
1645	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea capitis	.	Children
Q200R	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	.	Children
Q200B	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Tinea corporis	.	Children
1482	<i>Trichophyton verrucosum</i>	Tinea pedis e Tinea unguium	pre diabetes	Elderly

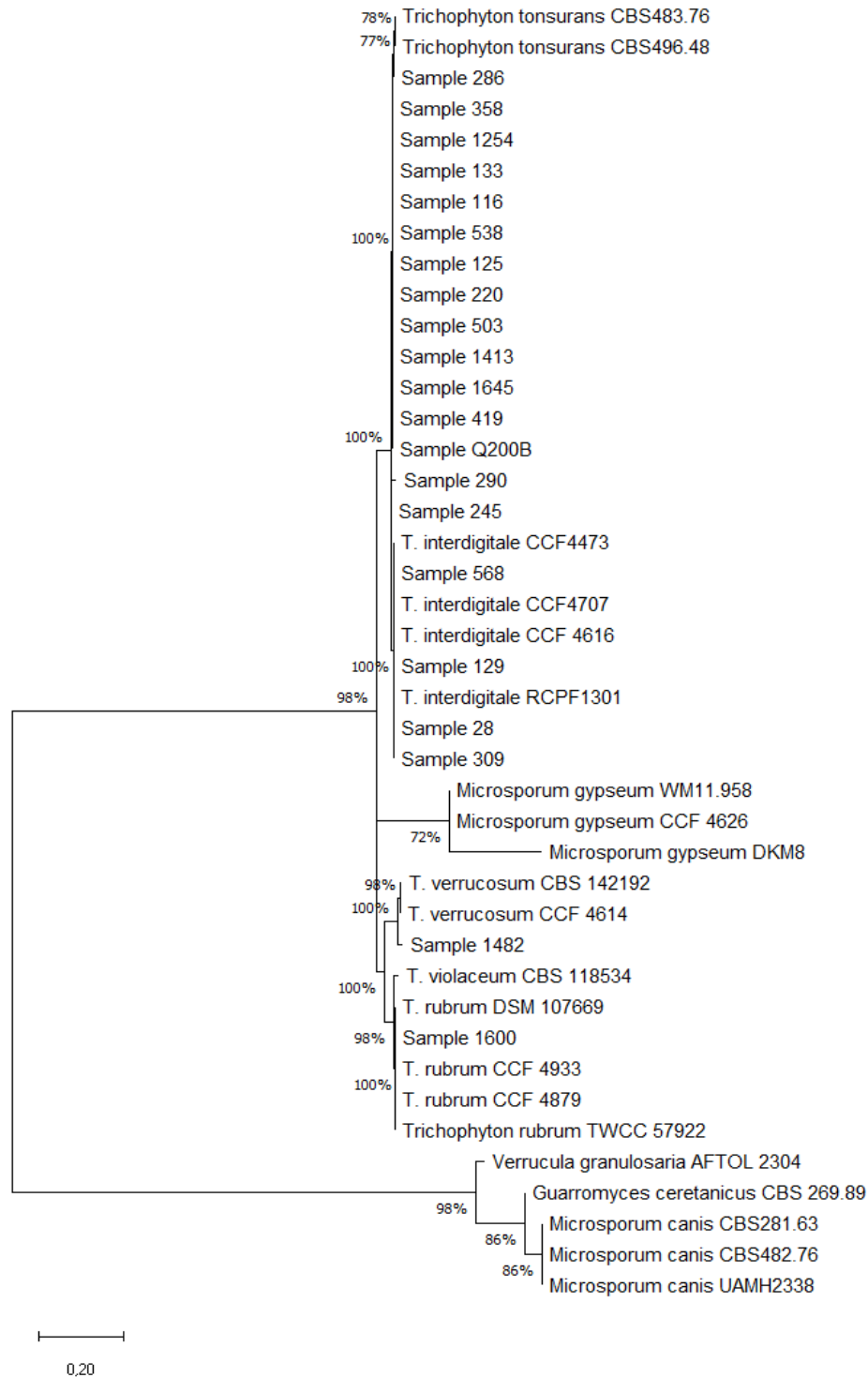
129 **Table 1** - Samples studied from 23 patients attended at the Mycology Department of the Tropical
130 Medicine Foundation - HVD from January 2015 to July 2017. Sample number 309 and 1482 are from the same
131 patient, which is reincindive. *Identificated by morphology only.

132 **Identification of dermatophytes by Ribosomal region sequencing and RFLP**

133 The query sequences were paired with those in the GenBank database by the Blast
134 analysis, others 21 sequences were chosen for the phylogeny analysis. All the sequences was
135 align in Clustalw program. The substitution models was chosen by Best-fit tool in MEGA X.
136 The phylogenetic analysis was performed and 21 dermatophytes was identified by ITS1- 28S
137 regions sequencing (see figure 1).

138 The phylogeny of ribossomal region is proved very well for evolutionary studies, but
139 for identification of all species of dermatophytes is not so precised, this is because the
140 evolutionary proximally, been the region ITS1 more diverse for the identification (Harmsen,
141 D., *et al.*, 1999). However, the phylogenetic tree of this work, provide identification of clades

142 of dermatophytes (*T. tonsurans*, *T. interdigitale*, *T. rubrum* and *T. verrucosum*), showed the
 143 proximity of the isolates, principally between *T. tonsurans* and *T. interdigitale*.



144

145

146

147

148

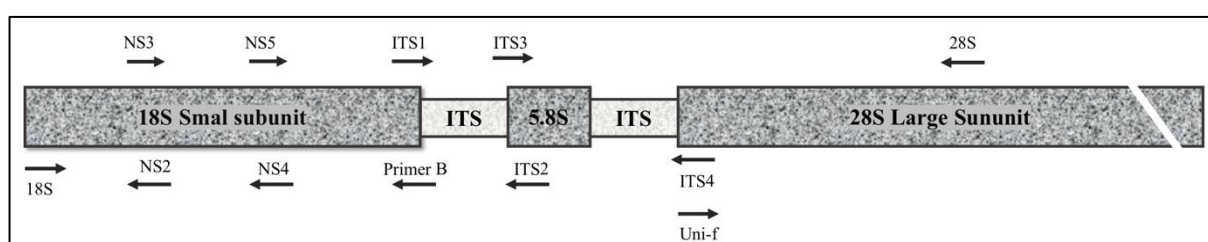
Figure 1 - Evolutionary analyzes were conducted in MEGA X and evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood method and the Tamura-Nei model (1993). The consensus tree, created from 500 replicates using the "bootstrap" phylogenetic test, and a discrete Gamma distribution to model evolutionary rate differences between sites (5 categories (+ G, parameter = 1.8500)). The analysis involved 42 nucleotide

149 sequences; all positions with less than 80% site coverage were eliminated. There were 860 positions in the final
150 data set.

151 The RFLP assay (figure 3) show differentiation strains of *T. tonsurans*, when can see
152 six strains (1254, 538, 116, 1645, 286 and Q200B) and two strains (358 and 1413) has no
153 genetic variability difference between them. However, when we went with other strains of
154 same species, the genetic differentiation is more diverse and clearer, showing in these specie
155 six different strains in this work.

156

157



158

159 **Figure 2** - Ribosomal region in representative figure with primers for sequencing. Modified figure from
160 WHITE, T.B.; LEE, 1990. **Following the sequence:** 18S (5'-AAC CTG GTT GAT CCT GCC AGT-3') and
161 PrimerB (5'-TGA TCC TTC TGC AGG TTC ACC TAC - 3') from Medlin et. al 1988; NS2 (5' - GGC TGC
162 TGG CAC CAG ACT TGC - 3'), NS3 (5' - GCA AGT CTG GTG CCA GCA GCC - 3'), NS4 (5' - CTT CCG
163 TCA ATT CCT TTA AG - 3'), NS5 (5' - AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G - 3'), ITS1 (5' - TCC GTA
164 GGT GAA CCT GCG G- 3'), ITS3 (5' GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC - 3') and ITS4 (5' TCC TCC
165 GCT TAT TGA TAT GC - 3') from WHITE, T.B.; LEE, 1990; Uni-f (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG
166 GAA AAG - 3') and Uni-r (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG - 3') from FELL, J.W, 1993.

167

168

169

170 The direct relation between genetic variability and antifungal profile is not clear.
171 Saheli *et al.* in 2018 demonstrated for a differentiation related with antifungal profile is
172 possible using a point mutation of resistance gene. However this reporting show a diversity
173 for *Trichophyton tonsurans*, when the RFLP assay show a strain differentiation its possible
174 deliberate in distance related with a resistance to Amphotericin B.

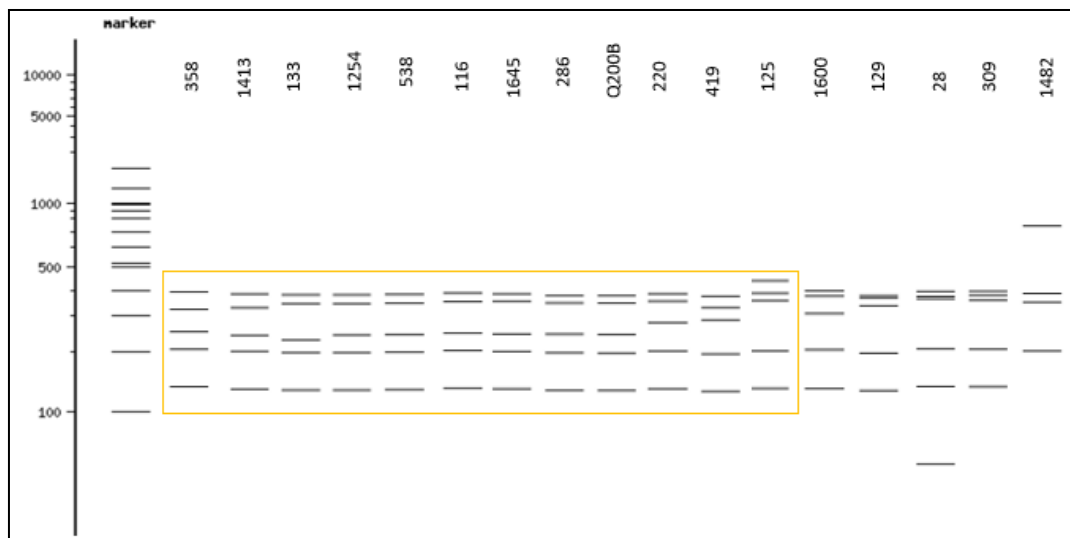
175 Genetic variability was also observed in the *Trichophyton interdigitale* (129, 28 and
176 309) isolates, when the three samples presented difference between each other (figure 3).

177

178

179

180
181



182
183
184

185 **Figure 3** - Gel representation of RFLP assay performed in NEBcutter v2.0 online tool using two
186 restriction enzymes *ApoI* and *EcoRI*. The Gel representation is in 1% of agarose and the Marker DNA ladder is
187 100pb. Following the order in the gel: 358 to 125 *Trichophyton tonsurans*, 1600 *Trichophyton rubrum*, 129 to
188 309 *Trichophyton interdigitale* and 1482 *Trichophyton verrucosum*.

189
190
191
192
193
194

195 **Antifungal susceptibility of dermatophyte isolates**

196 The MIC range, MIC50, and MIC90 were obtained by the CLSI method for the
197 dermatophyte species against the nine antifungals tested and by WHONET program 5.6
198 v.19.2.15. A resistance of Amphotericin B is reported in this study (Table 2).

199
200
201
202
203
204

205

206

<i>Trichophyton</i> species	Number of sample tested	Antifungal drug	MIC ($\mu\text{g/ml}$)			
			Range	50	90	G Mean
<i>Trichophyton tonsurans</i>	14	AMP. B	0.0625 - 4	2	4	1.724
	13	CTR	0.125 - 2	0.5	2	0.653
	14	FLU	0.25 - 128	16	64	13.125
	10	GRI	0.5 - 8	2	2	1.414
	9	ITR	0.0625 - 0.5	0.125	0.5	0.157
	7	KTC	0.125 - 0.25	0.25	0.25	0.226
	8	MCZ	0.25 - 4	4	4	2.181
	3	NYS	0.5 - 1	0.5	1	0.63
4	TRB	0.0625 - 1	0.064	1	0.177	
<i>Trichophyton rubrum</i>	4	AMP. B	2 - 4	2	4	2.828
	4	CTR	0.25 - 1	0.5	1	0.5
	4	FLU	4 - 128	4	128	9.514
	4	GRI	2 - 2	2	2	2
	2	ITR	0.25 - 2	0.25	2	0.707
	4	KTC	0.0625 - 8	0.064	8	0.21
	4	MCZ	0.5 - 32	1	32	2
	1	NYS	4 - 4	4	4	4
2	TRB	0.25 - 0.5	0.25	0.5	0.354	
<i>Trichophyton interdigitale</i>	4	AMP. B	0.5 - 4	2	4	1.682
	3	CTR	0.25 - 2	0.5	2	0.63
	4	FLU	0.24 - 64	32	64	13.318
	3	GRI	1 - 4	2	4	2
	4	ITR	0.125 - 2	0.25	2	0.354
	2	KTC	0.0625 - 0.5	0.064	0.5	0.177
	3	MCZ	0.5 - 8	4	8	2.52
	1	NYS	1 - 1	1	1	1
1	TRB	0.5 - 0.5	0.5	0.5	0.5	

207

208

209

210

211

212

213

214

Table 2 - Antifungal profile of *Trichophyton* species against nine antifungals. FLU = Fluconazole; KTC = Ketoconazole; CTR = Clotrimazole; MCZ = Miconazole; ITR = Itraconazole; GRI = Griseofulvin; AMP. B = Amphotericin B.

In vitro susceptibility testing plays an essential role to determine emerging resistance patterns among etiologic dermatophytes. In generally, dermatophytes are susceptible to fluconazole, while others infection by filamentous fungi or yeast already know show resistance of it. In studies like of Sahali (2018), the terbinafine resistance was presented in

215 dermatophytes. The results of Sahali (2018) and our, represent a change of spectrum of
216 antifungal profile of dermatophytes.

217 In generally, the dermatophytes isolates are susceptible to ketoconazole, clotrimazole,
218 itraconazole and terbinafine. On the other hand, griseofulvin is not so prescribed, showing
219 resistance since 1981, and in this study, the dermatophytes isolates have presented a
220 susceptible dose-dependent of griseofulvin. However, although oral ketoconazole treatment is
221 effective in dermatophytosis, prolonged treatment leads to side effects (LAKSHMIPATHY;
222 KANNABIRAN, 2010; Artis, W. M.; Odle, B.M.; Jones, H.E., 1981).

223 *Trichophyton tonsurans* are the most resistant. Showing MIC_{range} ≥4 for Amphotericin,
224 Fluconazole ≥64. The MIC for *T. rubrum* specie show high levels principally because of one
225 isolate (1600), witch MIC was multiple resistance for five drugs (AMP. B = 4; FLU ≥64;
226 KTC = 8; MCZ ≥32; NYST = 4). Only one isolate of *T. verrucosum* (1482) was tested and
227 showed resistance for fluconazole (MIC ≥64) and miconazole (MIC = 8).

228 CONCLUSION

229 The RFLP assay report a genetic diversity in the dermatophytes *T. tonsurans* and *T.*
230 *interdigitale*. All species tested showed resistant isolates. The present study allowed
231 resistance to amphotericin B, fluconazole, Miconazol and nystatin. The genetic variability can
232 demonstrated a possible correlation with antifungal. However, requires a study specifying
233 resistance genes to be more accurate.

234

235 **Funding:** This study was funded by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas
236 (FAPEAM) for financial support (public notice N. 001/2014 – PROEP).

237 **Conflict of interest:** The authors declare that they have no conflict of interest.

238 **Ethical approval:** The project was submitted to the Research Ethics Committee through the
239 Plataforma Brasil, (CAAE 45590015.3.0000.5020).

240 REFERENCES

241 BORMAN, A. M., CAMPBELL, C. K., FRASER, M., & JOHNSON, E. M. (2007).
242 Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and
243 review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology*,
244 45(2), 131–141.

- 245 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method
246 for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous, CLSI, 2002. (Approved
247 Standard M38-A)
- 248 FELL, J. W. (1993). Rapid identification of yeast species using three primers in a
249 polymerase chain reaction. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 2(3), 174–180.
- 250 HARMSSEN, D., SCHWINN, A., BRÖCKER, E.-B., FROSCH, M. Molecular
251 differentiation of dermatophyte fungi. *Mycoses* 42, 67–70, 1999.
- 252 KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. (2018). MEGA
253 X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology
254 and Evolution* 35:1547-1549.
- 255 LAKSHMIPATHY, D.T. and KANNABIRAN, K. (2010) Review on
256 Dermatomycosis: Pathogenesis and Treatment. *Natural Science*, 2, 726-731. KASZUBIAK et
257 al., 2004
- 258 MEDLIN, L., ELWOOD, H. J., STICKEL, S., & SOGIN, M. L. (1988). The
259 characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*,
260 71(2), 491–499.
- 261 SALEHI, Z., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., & RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2018).
262 Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination
263 of point mutations in terbinafine-resistant isolates, 12–15.
- 264 SCHWINN A1, EBERT J, BRÖCKER EB. Frequency of *Trichophyton rubrum* in
265 tinea capitis. *Mycoses*, 38(1-2):1-7, 1995.
- 266 TAMURA K. AND NEI M. (1993). Estimation of the number of nucleotide
267 substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees.
268 *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
- 269 VISHNU, S. et al. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment.
270 *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 19, p. 1286–1293, 2015.
- 271 WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.
272 8, n. 0893–8512 (Print), p. 240–259, 1995. WHITE, T.B.; LEE, 1990
- 273 WELSH, O., WELSH, E., OCAMPO-CANDIANI, J., GOMEZ, M., & VERA-
274 CABRERA, L. (2006). Dermatophytoses in Monterrey, México. *Mycoses*, 49(2), 119–123.
- 275 WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing
276 of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and
277 Applications*, Academic Press Inc, 1999.
- 278 ZAMANI, S., SADEGHI, G., YAZDINIA, F., MOOSA, H., PAZOOKI, A.,
279 GHAFARINIA, Z., RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2016). Epidemiological trends of
280 dermatophytosis in Tehran, Iran: A five-year retrospective study. *Journal de Mycologie
281 Médicale*, 26(4), 351–358.
- 282 ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide.
283 *Mycopathologia*, v. 182, n. 1, p. 1–10, 2016.
- 284

5.2. ARTIGO 2: World Prevalence of *Trichophyton rubrum*: A Systematic Literature Review

1 **World Prevalence of *Trichophyton rubrum*: A Systematic Literature Review**

2 Grisolia M.E.^{1#}, Gonçalves, M.J.F.² Jackisch-Matsuura, A. B^{2#}.

3

4 ¹ Programa de Pós-Graduação em Condições de Vida e Situações de Saúde na Amazônia,
5 Instituto Leônidas e Maria Deane/Fiocruz, Brazil; ² Pesquisadora no Instituto Leônidas e
6 Maria Deane, Instituto Leônidas e Maria Deane/Fiocruz, Brazil

7 #Address correspondence to Grisolia, M. E.: eduarda.grisolia@hotmail.com and to
8 Jackisch-Matsuura, A. B.: ani.matsuura@fiocruz.br;

9

10

11 Contents:

12 **Abstract**

13 **Introduction**

14 **Methods of systematic literature review**

15 **Discussion of systematic literature review**

16 **Conclusion**

17 **Reference**

18

19

20 **ABSTRACT**

21 The genera *Trichophyton* is home of to the most of the anthropophilic pathogenic species.
22 *Trichophyton rubrum* can cause a chronic, non- or mild-inflammatory infection. This
23 Review aims to provide an overview of the worldwide prevalence of *Trichophyton*
24 *rubrum* and other dermatophytes, following PRISMA (Preferred Reporting Items for

25 Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines. From the data bank of 93
26 publications was possibly made a map of population distributed according *Trichophyton*
27 *rubrum* isolated for each study, see implications of dermatophytosis developed in patients
28 with concomitant disease, and to know a second most prevalent dermatophyte in each
29 country.

30 **Keywords:** *Trichophyton*; Prevalence; *Trichophyton rubrum*; Dermatophytosis.

31

32 INTRODUCTION

33 Dermatophytes (Onygenales: Arthrodermataceae) are a keratinophilic filamentous
34 fungi, and it is estimated that about 20–25 % of the world's population carries a
35 dermatophyte infection. *Trichophyton* is a genera with the most an anthropophilic
36 pathogenic species, and *Trichophyton rubrum* is the most prevalent, cause of
37 dermatophytosis in the world, being in some cases the pivot of longer and often more
38 complex treatments being able to cause a chronic, non- or mild-inflammatory infection
39 (ZHAN, P. et al., 2018; ZHAN; LIU, 2016; VISHNU et al., 2015).

40 This Review aims to provide an overview of the worldwide prevalence of
41 *Trichophyton rubrum* and other dermatophytes.

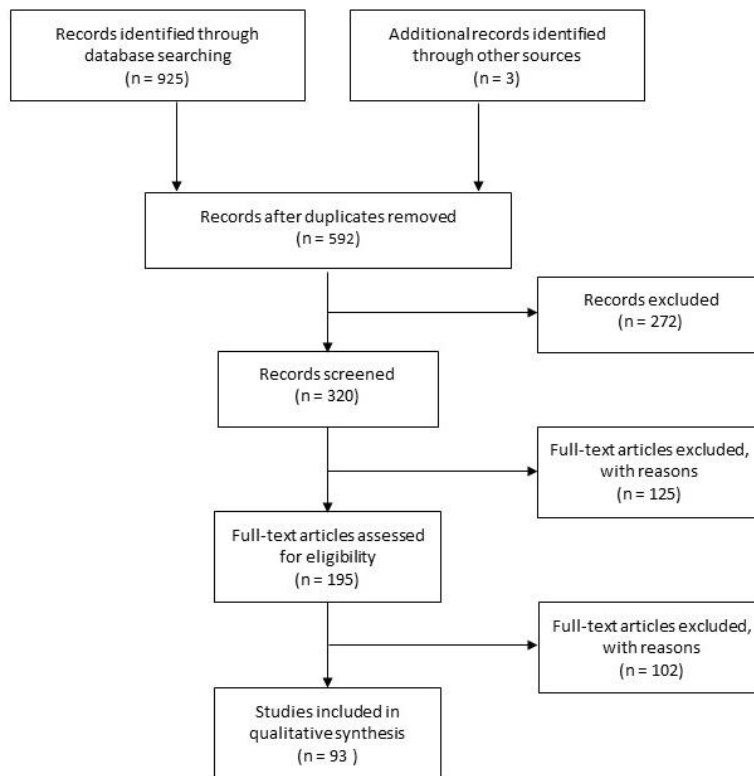
42 METHODS OF SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW

43 We conducted a systematic literature review following PRISMA (Preferred
44 Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines. An electronic
45 literature search (Medline, Web of Science, Scopus, LILACS, and Scielo) was performed
46 using the following search terms for the question **What is the prevalence of**
47 **dermatophytosis caused by *Trichophyton rubrum*?** Medline: ("trichophyton"[MeSH
48 Terms] OR "Trichophyton rubrum"[All Fields]) and ("Prevalence"[Mesh]); Lilacs:
49 (mh:(trichophyton)) OR (tw:(Trichophyton rubrum)) AND (mh:(Prevalence)); Scielo:
50 ((trichophyton) OR (Trichophyton rubrum)) AND (Prevalence); Web of Science:
51 Tópico:(trichophyton rubrum) AND Tópico:(Prevalence); Scopus: (TITLE-ABS-KEY
52 (trichophyton) OR ALL (trichophyton AND rubrum)) AND (TITLE-ABS-KEY
53 (prevalence)).

54 The last search was conducted on May 24th of 2018. The results from the
55 databases were merged and duplicates removed. Two authors assessed the combined
56 results of the electronic database search independently, and discrepancies were discussed
57 and agreed upon according to the inclusion and exclusion criteria (see flow). Editorials,
58 reviews, commentaries, brief communications and opinion pieces were excluded.
59 Additional articles of interest were identified from reviewing the bibliographies of
60 relevant articles. Publications were limited to human dermatophytosis, with no limitation
61 of idiom.

62 The literature search resulted in 925 publications and after removal of duplicates
63 592 publications remained. Two authors reviewed titles and abstracts and identified 195
64 records that then underwent full text review. For met the inclusion criteria the publication
65 has to have a five score in application of validation instrument (Loney, 1998). Then, the
66 creation of data bank was in Microsoft Excel professional, and data collect was by an
67 instrument of data collect (product of this work in the end of the publication).

68



69

70

Flow 1 - Methods of Systematic Literature Review by PRISMA.

71 **DISCUSSION OF SYSTEMATIC LITERATURE REVIEW**

72 From the data bank of 93 publications, we made a map of population distributed
 73 according *Trichophyton rubrum* isolated for each study (Figure 1). In the majority, this
 74 dermatophyte has great prevalence in Europe and Middle East. Nevertheless, the India
 75 has substantial studies about dermatophytes prevalence, principally in their south region.
 76 The data demonstrated the dermatophytosis were not so prevalent in north America and
 77 Asia, yet we think that is because the studies trend to be about case-control or studies
 78 about dermatophytes without prevalence, being these studies for approach of new
 79 molecular tools, antifungal profile, etc. Therefore, excluded of this review.

80 We bring to attention a few publications (Frame 1) about population with
 81 concomitant disease and these implications of dermatophytosis developed. On India, a
 82 paper about dermatophytosis on renal transplant individuals demonstrated when in that

83 cases the dermatophytosis trend to developed to chronical. (Sentamilselvi, G. *et al.*,
84 1999).

85 A chronic dermatophytosis is persistent, with episodes of remission and
86 exacerbation, identified by duration and recurrences of infection (Sentamilselvi, G. *et al.*,
87 1997). A concomitant disease submitted the patient most susceptible for chronical
88 dermatophytosis. In patients with positive HIV the prevalence of dermatophytosis is
89 majority, over the 35% of population of study. However, the work publication about
90 population of positive HIV is in majority a case-control study, so then was excluded by
91 this work for no complain the inclusion criteria. We bring to attention the importance of
92 that's works with this object, for the reason that vulnerable population is so care of
93 attention of public health authorities.

94

Title	Author	Country of study	Concomitant Disease	Year of publication	Population of study	Positive Dermatophyte samples (%)	Number of <i>Trichophyton rubrum</i>
Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil.	da Silva, B. C., <i>et al.</i>	Brazil	HIV	2014	84	47,60%	30
The spectrum of dermatological disorders among primary school children in Dar es Salaam.	Komba, E. V, & Mgonda, Y. M.	Tanzania	Skin Disorders	2010	420	10%	8
Clinico mycological Profile of Dermatophytosis in a Reference Centre for Leprosy and Dermatological Diseases in Addis Ababa.	Woldeamanuel, Y., <i>et al.</i>	Ethiopia	Skin Disorders	2006	539	67,50%	2
Superficial mycoses and HIV infection in Yaoundé.	Lohoué Petmy, J., <i>et al.</i>	Cameroon	HIV	2004	148	22,20%	27
Prevalence and causative agents of superficial mycoses in a textile factory in Adana, Turkey.	Çelik, E., Ilkit, M., & Tanir, F.	Turkey	Work of predisposition risk	2003	431	13%	32
Prevalence of dermatomycoses in Mal de Meleda patients: A field study.	Ergin, Ç., Ergin, Ş., & Arikan, S.	Turquia	Mal de Maleda	2002	29	37,90%	4
Clinical and mycological features of dermatophytosis in renal transplant recipients.	Sentamilselvi, G <i>et al.</i>	India	Renal Trasplant	1999	100	26%	21
Scenario of chronic dermatophytosis: an Indian study.	Sentamilselvi, G., <i>et al.</i>	India	Various	1997	300	57,30%	129

Frame 1 - Studies of Population with concomitant disease.

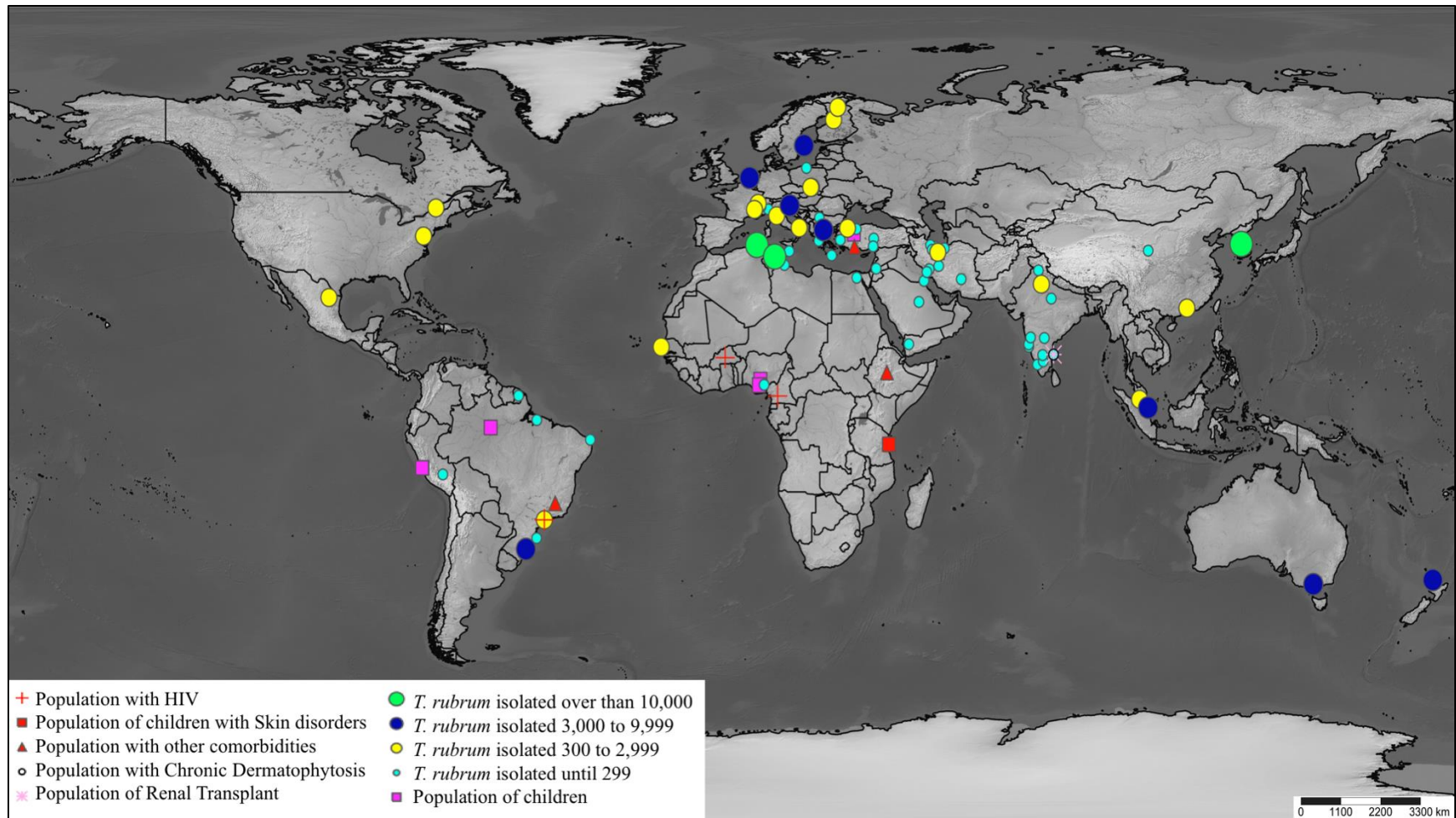
95

96

97

98

99



100

101

102

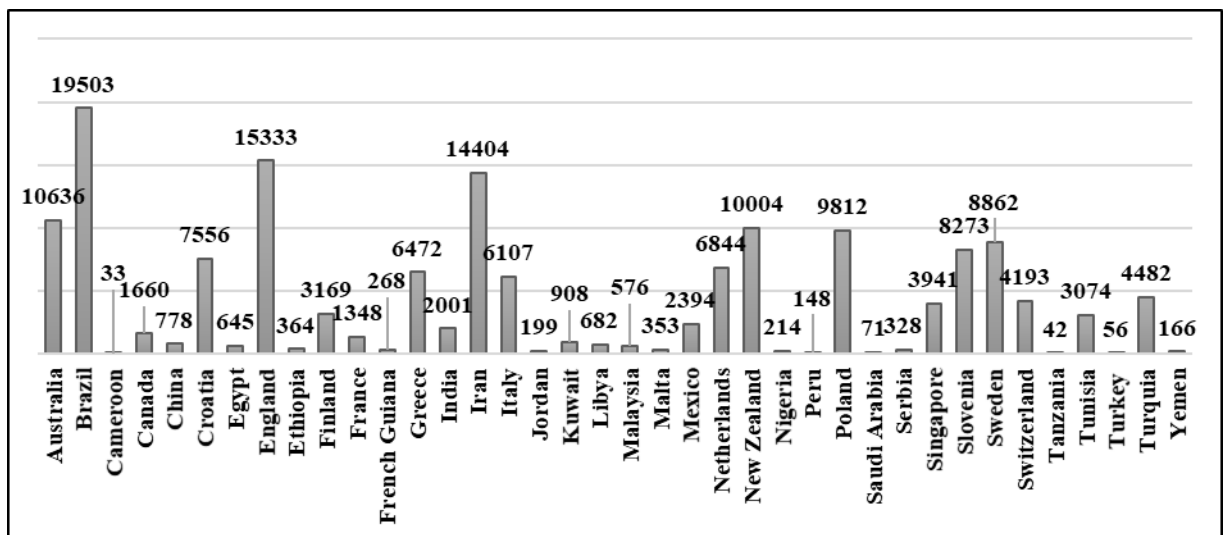
103

Figure 1 - *Trichophyton rubrum* distribution in the world based on the data of publication since 1960 until 2016. The distribution is in subgroups according to type of population, the codes are in the above legend. The map was created using SimpleMappr, online tool for publications.

104 The first paper in our study is from 1960, a retrospective study about dermatophytosis
 105 in Brazil, about a comparison of the more urban population with rural population of the south
 106 of the country (MEZZARI, A., 1998). From that, we screened a data bank for trends and
 107 perspectives. Therefore, the specific trend is about the diminution of large retrospective
 108 analysis around the world, prejudicing the data of prevalence of that so negligence disease.

109 In figure 2, the total of dermatophytes is directly related with quantitative of studies
 110 and time of studies, so in the figure, South Korea not fit in, the reason is the population and
 111 dermatophytes studies were over than 100.000 subjects. The most important is the clearance
 112 about cosmopolitan infection caused by *Trichophyton rubrum*.

113



114

115 **Figure 2** - The sum of total dermatophytes isolates for each country for all studies in this review, since
 116 1960 until 2018, without South Korea.

117

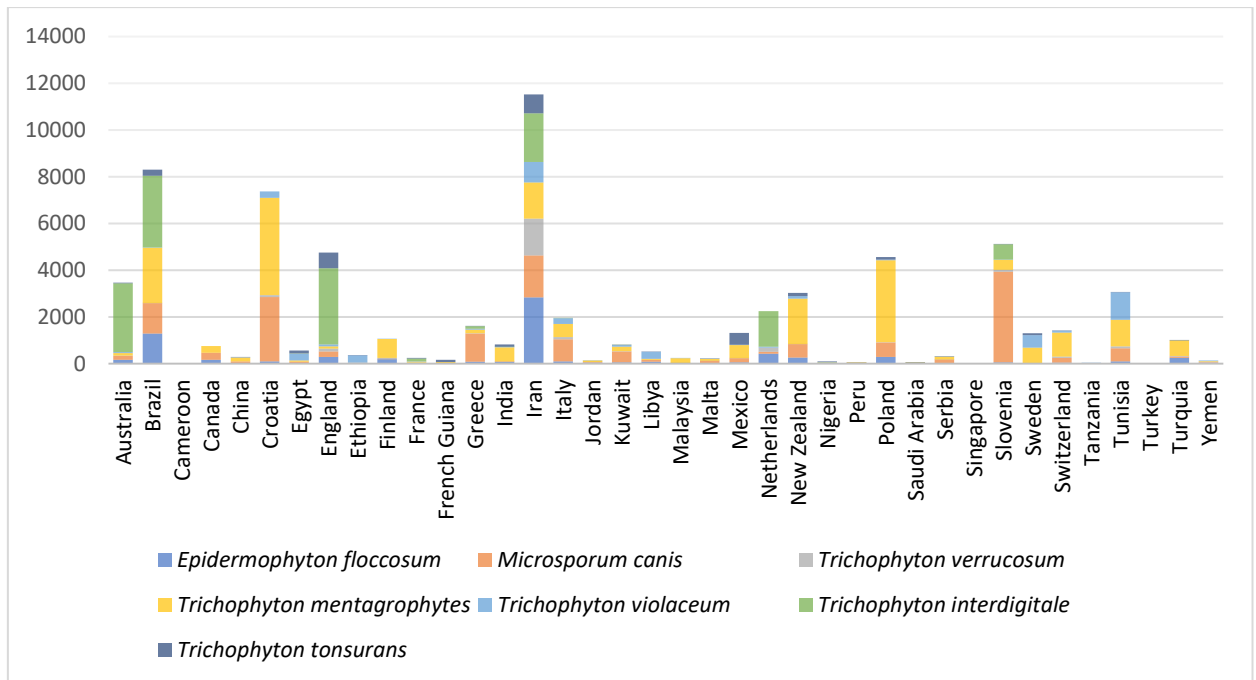
118 The second most prevalent dermatophyte in the world is *Trichophyton mentagrophytes*
 119 (Figure 3). In whatever way, in several countries the second most prevalence is *Microsporum*
 120 *canis*, *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton interdigitale*.

121

122

123

124



125

126

127

128

129

130 CONCLUSION

131

132

133

134

135

136

137

138 REFERENCES

139

140

141

142

143

144

145

Figure 3 - The frequency distribution of species other than *T. rubrum* dermatophytes in each country, from 1960 until 2018. The specie *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis* and *Epidermophyton floccosum* are the most prevalent in the world.

Trichophyton rubrum is widely distributed and the most prevalent in the world, following by *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*, *Epidermophyton floccosum* and *Trichophyton interdigitale*.

Cosmopolitan species of dermatophytes are the major causative agents of this disease in the world, and the part of the population with immunosuppressive disease or other predisposing factors is the most susceptible to chronic dermatophytosis.

1. Abanmi, A., Bakheshwain, S., El Khizzi, N., Zouman, A. R., Hantirah, S., Al Harthi, F., Tariq, M. (2008). Characteristics of superficial fungal infections in the Riyadh region of Saudi Arabia. *International Journal of Dermatology*, 47(3), 229–235.

2. Abastabar, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Shidfar, M. R., Kordbacheh, P., Mohammadi, R., Shokoohi, T., Mirhendi, H. (2013). A Molecular Epidemiological Survey of Clinically Important Dermatophytes in Iran Based on Specific RFLP Profiles of Beta-tubulin Gene. *IRANIAN JOURNAL OF PUBLIC HEALTH*, 42(9), 1049–1057.

- 146 3. Abd Elmegeed, A. S. M., Ouf, S. A., Moussa, T. A. A., & Eltahlawi, S. M. R. (2015).
 147 Dermatophytes and other associated fungi in patients attending to some hospitals in Egypt.
 148 *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(3), 799–805.
- 149 4. Abu-Elteen, K. H., & Malek, M. A. (1999). Prevalence of dermatophytoses in the
 150 Zarqa district of Jordan. *Mycopathologia*, 145(3), 137–142.
- 151 5. Aghamirian, M. R., & Ghiasian, S. A. (2008). Dermatophytoses in outpatients
 152 attending the Dermatology Center of Avicenna Hospital in Qazvin, Iran. *Mycoses*, 51(2),
 153 155–160.
- 154 6. al-Fouzan, A. S., & Nanda, A. (1992). Dermatophytosis of children in Kuwait.
 155 *Pediatric Dermatology*, 9(1), 27–30. Retrieved from
- 156 7. Asticcioli, S., Di Silverio, A., Sacco, L., Fusi, I., Vincenti, L., & Romero, E. (2008).
 157 Dermatophyte infections in patients attending a tertiary care hospital in northern Italy. *The*
 158 *New Microbiologica*, 31(4), 543–548. Retrieved from
- 159 8. Bassiri-Jahromi, S., & Khaksar, A. (2010). Prevalence of cutaneous fungal infections
 160 among sports-active individuals. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 3(2), 53.
- 161 9. Bhatia, V., & Sharma, P. (2014). Epidemiological studies on Dermatophytosis in
 162 human patients in Himachal Pradesh, India. *SpringerPlus*, 3(1), 134.
- 163 10. Borman, A. M., Campbell, C. K., Fraser, M., & Johnson, E. M. (2007). Analysis of the
 164 dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of
 165 worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology*, 45(2), 131–
 166 141.
- 167 11. Brajac, I., Prpic-Massari, L., Stojnic-Sosa, L., & Gruber, F. (2003). Dermatomycoses
 168 in the Rijeka area, Croatia, before, during and after the war 1990-1999. *Mycoses*, 46(5–6),
 169 213–217.
- 170 12. Budak, A., Bogusz, B., Tokarczyk, M., & Trojanowska, D. (2013). Dermatophytes
 171 isolated from superficial fungal infections in Krakow, Poland, between 1995 and 2010.
 172 *Mycoses*, 56(4), 422–428.
- 173 13. Cai, W., Lu, C., Li, X., Zhang, J., Zhan, P., Xi, L., Yu, X. (2016). Epidemiology of
 174 Superficial Fungal Infections in Guangdong, Southern China: A Retrospective Study from
 175 2004 to 2014. *Mycopathologia*, 181(5–6), 387–395.
- 176 14. Celik, E., Ilkit, M., & Tanir, F. (2003). Prevalence and causative agents of superficial
 177 mycoses in a textile factory in Adana, Turkey. *Mycoses*, 46(8), 329–333.
- 178 15. Chadeganipour, M., Shadzi, S., Dehghan, P., & Movahed, M. (1997). Prevalence and
 179 aetiology of dermatophytoses in Isfahan, Iran. *Mycoses*, 40(7–8), 321–324.

- 180 16. Chinelli, P. A. V., Sofiatti, A. de A., Nunes, R. S., & Martins, J. E. da C. (2003).
181 Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. *Revista Do Instituto de*
182 *Medicina Tropical de Sao Paulo*, 45(5), 259–263. Retrieved from
- 183 17. Coloe, S., & Baird, R. (2010). Dermatophyte infections in Melbourne: Trends from
184 1961/64 to 2008/09. *Australasian Journal of Dermatology*, 51(4), 258–262.
- 185 18. Costa-Orlandi, C. B., Magalhães, G. M., Oliveira, M. B., Taylor, E. L. S., Marques, C.
186 R. S., & de Resende-Stoianoff, M. A. (2012). Prevalence of Dermatormycosis in a Brazilian
187 Tertiary Care Hospital. *Mycopathologia*, 174(5–6), 489–497.
- 188 19. da Silva, B. C. M., Paula, C. R., Auler, M. E., Ruiz, L. da S., dos Santos, J. I.,
189 Yoshioka, M. C. N., ... Gambale, W. (2014). Dermatophytosis and immunovirological status
190 of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil. *Mycoses*, 57(6), n/a-n/a.
- 191 20. Dal Tio, R., & Lunardi, M. (1991). Prevalence of superficial mycoses in the Aosta
192 Valley region of Italy from 1984 to 1989. *Mycopathologia*, 116(3), 155–158.
- 193 21. Das, S., Goyal, R., & Bhattacharya, S. N. (2007). Laboratory-based epidemiological
194 study of superficial fungal infections. *Journal of Dermatology*, 34(4), 248–253.
- 195 22. Devliotou-Panagiotidou, D., Koussidou-Eremondi, T., Karakatsanis, G., Minas, A.,
196 Chrysomallis, F., & Badillet, G. (1992). Dermatophytosis due to *Trichophyton rubrum* in
197 northern Greece during the decade 1981-1990. *Mycoses*, 35(11–12), 375–380.
- 198 23. Dion, W. M., & Kapica, L. (1975). Isolation of dermatophytes, *Candida* species and
199 systemic fungi from dermatologic specimens in Montréal, 1963 to 1973. *Canadian Medical*
200 *Association Journal*, 112(6), 712–716.
- 201 24. Dolenc-Voljc, M. (2005). Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia,
202 1995-2002. *Mycoses*, 48(3), 181–186.
- 203 25. Drakensjö, I. T., & Chryssanthou, E. (2010). Epidemiology of dermatophyte infections
204 in Stockholm, Sweden: a retrospective study from 2005–2009. *Medical Mycology*, 49(5), 1–
205 5.
- 206 26. E, A., Marothi, M., K, V., M, A., & M, M. (2015). Distribution and characterization of
207 dermatophytes in a tertiary care hospital in madhyapradesh. *Journal of Evolution of Medical*
208 *and Dental Sciences*, 4(02), 201–206.
- 209 27. Ellabib, M. S., Khalifa, Z. M., & Kavanagh, K. (2002). Dermatophytes and other fungi
210 associated with skin mycoses in Tripoli , Libya. *Annals of Saudi Medicine*, 104(3–4), 101–
211 104.
- 212 28. Enemuor, S. C., & Amedu, A. S. (2009). Prevalence of superficial mycoses in primary
213 school children in Anyigba, Kogi State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*,
214 3(2), 62–65.

- 215 29. Ergin, Ç., Ergin, Ş., & Arıkan, S. (2002). Prevalence of Dermatomycoses in Mal de
216 Meleda Patients: A Field Study. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34(10), 753–
217 755.
- 218 30. Falahati, M., Akhlaghi, L., Lari, A. R., & Alaghebandan, R. (2003). Epidemiology of
219 Dermatophytoses in an Area South of Tehran, Iran. *Mycopathologia*, 156(4), 279–287.
- 220 31. Faure-Cognet, O., Fricker-Hidalgo, H., Pelloux, H., & Leccia, M. T. (2016).
221 Superficial Fungal Infections in a French Teaching Hospital in Grenoble Area: Retrospective
222 Study on 5470 Samples from 2001 to 2011. *Mycopathologia*, 181(1–2), 59–66.
- 223 32. Flores, J. M., Castillo, V. B., Franco, F. C., & Huata, A. B. (2009). Superficial fungal
224 infections: clinical and epidemiological study in adolescents from marginal districts of Lima
225 and Callao, Peru. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(04), 313–317.
- 226 33. Ganesan, K., Banu, A. S. S., & Jasmine, R. (2017). Clinico-mycological study on
227 superficial fungal infections in tertiary care hospital and a profile of their antifungal
228 susceptibility pattern Clinico - mycological study on superficial fungal infections in tertiary
229 care hospital and a profile of their ant, (January), 2–6.
- 230 34. Ganeshkumar, P., Mohan, Sr., Hemamalini, M., Madhavan, R., & Lakshmanan, A.
231 (2015). Epidemiological and clinical pattern of dermatomycoses in rural India. *Indian Journal*
232 *of Medical Microbiology*, 33(5), 134.
- 233 35. Gopi, A., Harindranath, D., & Kaushik, A. (2015). Mycological profile of
234 dermatophytes isolated from clinical samples in kims hospital, bangalore. *Journal of*
235 *Evolution of Medical and Dental Sciences*, 04(05), 835–842.
- 236 36. Gowda, T., Manikonda, R., & Hosthota, A. (2018). Microbiological profile of
237 dermatophyte infections in a tertiary care hospital. *Journal of Evolution of Medical and*
238 *Dental Sciences*, 7(01), 67–70.
- 239 37. Heidrich, D., Garcia, M. R., Stopiglia, C. D. O., Magagnin, C. M., Daboit, T. C.,
240 Vettoratto, G., ... Scroferneker, M. L. (2015). Dermatophytosis: a 16-year retrospective study
241 in a metropolitan area in southern Brazil. *The Journal of Infection in Developing Countries*,
242 9(08), 865.
- 243 38. Kaštelan, M., Utješinović-Gudelj, V., Prpić-Massari, L., & Brajac, I. (2014).
244 Dermatophyte Infections in Primorsko-Goranska County, Croatia: a 21-year Survey. *Acta*
245 *Dermatovenerologica Croatica*, 22(3), 175–179.
- 246 39. Kayman, T., Sarigüzel, F. M., Koç, A. N., & Tekinşen, F. K. (2013). Etiological
247 agents of superficial mycoses in Kayseri, Turkey. *Journal of the European Academy of*
248 *Dermatology and Venereology*, 27(7), 842–845.

- 249 40. Khosravi, A. R., Aghamirian, M. R., & Mahmoudi, M. (1994). Dermatophytoses in
250 Iran. *Mycoses*, 37(1–2), 43–48.
- 251 41. Koksai, F., Er, E., & Samasti, M. (2009). Causative agents of superficial mycoses in
252 Istanbul, Turkey: retrospective study. *Mycopathologia*, 168(3), 117–123.
- 253 42. Komba, E. V., & Mgonda, Y. M. (2010). The spectrum of dermatological disorders
254 among primary school children in Dar es Salaam. *BMC Public Health*, 10(1), 765.
- 255 43. Korstanje, M. J., & Staats, C. C. G. (1995). Fungal Infections in the Netherlands.
256 *Dermatology*, 190(1), 39–42.
- 257 44. Koussidou-Eremondi, T., Devliotou-Panagiotidou, D., Mourellou-Tsatsou, O., &
258 Minas, A. (2005). Epidemiology of dermatomycoses in children living in Northern Greece
259 1996-2000. *Mycoses*, 48(1), 11–16.
- 260 45. Lee, W. J., Kim, S. L., Jang, Y. H., Lee, S.-J., Kim, D. W., Bang, Y. J., & Jun, J. B.
261 (2015). Increasing Prevalence of *Trichophyton rubrum* Identified through an Analysis of
262 115,846 Cases over the Last 37 Years. *Journal of Korean Medical Science*, 30(5), 639.
- 263 46. Lehenkari, E., & Silvennoinen-Kassinen, S. (1995). Dermatophytes in northern
264 Finland in 1982-90. *Mycoses*, 38(9–10), 411–414.
- 265 47. Lohoue Petmy, J., Lando, A., Kaptue, L., Tchinda, V., & Folefack, M. (2004).
266 Superficial mycoses and HIV infection in Yaounde. *Journal of the European Academy of*
267 *Dermatology and Venereology*, 18(3), 301–304.
- 268 48. Loney, P. L., Chambers, L. W., Bennett, K. J., Roberts, J. G., & Stratford, P. W.
269 (1998). Critical appraisal of the health research literature: prevalence or incidence of a health
270 problem. *Chronic Diseases in Canada*, 19(4), 170–176.
- 271 49. Macura, A. B., Krzyściak, P., & Bochenek, M. (2008). Trends in the spectrum of
272 dermatophytes causing superficial mycoses in the past decade. *Mikologia Lekarska*, 15(2),
273 76–79.
- 274 50. MacUra, A. B., Krzyściak, P., Skóra, M., & Gniadek, A. (2010). Dermatophyte
275 species in superficial mycoses in the Kraków district, Poland in the years 1972-2007.
276 *Mycoses*, 53(2), 148–152.
- 277 51. Magdum, R. J., Gadgil, S. A., Kulkarni, S. A., Rajmane, V. S., & Patil, S. S. (2016).
278 Clinico mycological study of superficial mycoses. *Journal of Krishna Institute of Medical*
279 *Sciences University*, 5(4), 37–44.
- 280 52. Mahmoud, A.-L. E. (2002). A study of dermatophytoses in Sana'a, Yemen Republic.
281 *Mycoses*, 45(3–4), 105–108.

- 282 53. Maraki, S., & Mavromanolaki, V. E. (2016). Epidemiology of dermatophytoses in
283 crete, greece: A 5-year survey. *Medical Mycology Journal*, 57(4), E69–E75.
- 284 54. Maraki, S., & Tselentis, Y. (1998). Dermatophytoses in Crete, Greece, between 1992
285 and 1996. *Mycoses*, 41(3–4), 175–178.
- 286 55. Maraki, S., Nioti, E., Mantadakis, E., & Tselentis, Y. (2007). A 7-year survey of
287 dermatophytoses in Crete, Greece. *Mycoses*, 50(6), 481–484.
- 288 56. Maulingkar, S. V, Pinto, M. J. W., & Rodrigues, S. (2014). A Clinico-Mycological
289 Study of Dermatophytoses in Goa, India. *Mycopathologia*, 178(3–4), 297–301.
- 290 57. Metintas, S., Kiraz, N., Arslantas, D., Akgun, Y., Kalyoncu, C., Kiremitçi, A., &
291 Unsal, A. (2004). Frequency and risk factors of dermatophytosis in students living in rural
292 areas in Eskişehir, Turkey. *Mycopathologia*, 157(4), 379–382.
- 293 58. MEZZARI, A. (1998). Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto
294 Alegre, RS, Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 40(2), 71–76.
- 295 59. Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. G. (2009). Preferred reporting items
296 for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Medicine*, 6(7),
297 e1000097.
- 298 60. Monod, M., Jaccoud, S., Zaugg, C., Léchenne, B., Baudraz, F., & Panizzon, R. (2002).
299 Survey of Dermatophyte Infections in the Lausanne Area (Switzerland). *Dermatology*, 205(2),
300 201–203.
- 301 61. Nazer, M. R., Golpour, B., & Hatkehlouei, M. B. (2018). Prevalence of Cutaneous
302 Fungal Infections among Patients Referred to Mycology Laboratory of Toba Clinic in Sari,
303 Iran : A Retrospective Study from 2009 to 2014. *World Family Medicine Journal/Middle East*
304 *Journal of Family Medicine*, 16(1), 107–112.
- 305 62. Neji, S., Makni, F., Cheikhrouhou, F., Sellami, A., Sellami, H., Marreckchi, S., ...
306 Ayadi, A. (2009). Epidemiology of dermatophytoses in Sfax, Tunisia. *Mycoses*, 52(6), 534–
307 538.
- 308 63. Ng, K. P., Soo-Hoo, T. S., Na, S. L., & Ang, L. S. (2002). Dermatophytes isolated
309 from patients in University Hospital, Kuala Lumpur, Malaysia. *Mycopathologia*, 155(4), 203–
310 206.
- 311 64. Nowicki, R. (1996). Dermatophytoses in the Gdańsk area, Poland: a 12-year survey.
312 *Mycoses*, 39(9–10), 399–402. Retrieved from
- 313 65. Nweze, E. I., & Okafor, J. I. (2005). Prevalence of Dermatophytic Fungal Infections in
314 Children: A Recent Study in Anambra State, Nigeria. *Mycopathologia*, 160(3), 239–243.

- 315 66. Otasevic, S., Đorđević, J., Randelović, G., Ignjatović, A., Stojanović, P., Zdravković,
316 D., & Marković, R. (2011). Superficial mycoses in the Nis region, Southeast-Serbia. *Open*
317 *Medicine*, 6(5), 665–671.
- 318 67. Oyeka, C. A., & Eze, I. I. (2008). Fungal skin infections among prison inmates in
319 Abakaliki, Nigeria. *Mycoses*, 51(1), 50–54.
- 320 68. Ozkutuk, A., Ergon, C., & Yulug, N. (2007). Species distribution and antifungal
321 susceptibilities of dermatophytes during a one year period at a university hospital in Turkey.
322 *Mycoses*, 50(2), 125–129.
- 323 69. Palathingal Narayanan, M., Illathukandy, S., Angattukuzhiyil Narayanan, V., Kuttiyil,
324 A., & Surendren, R. (2017). CLINICAL PROFILE OF DERMATOPHYTOSES IN NORTH
325 KERALA. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 5(87), 6461–6465.
- 326 70. Pavani, A., Singh, M., Basireddy, S., & Kabra, V. (2016). DERMATOPHYTOSIS IN
327 AND AROUND MAHABUBNAGAR. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*,
328 5(32), 1739–1743.
- 329 71. Puthenpurayil Ebrahimkutty, S., Kurian Pulikkottil, S., & Kochuplapparambil Thampi,
330 D. (2018). Clinico-mycological study of dermatophytic skin infections in a tertiary care
331 centre. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 7(08), 1008–1011.
- 332 72. Rassai, S., Feily, A., Sina, N., & Derakhshanmehr, F. (2011). Some epidemiological
333 aspects of dermatophyte infections in Southwest Iran. *Acta Dermatovenerologica Croatica :*
334 *ADC*, 19(1), 13–15.
- 335 73. Rastegar Lari, A., Akhlaghi, L., Falahati, M., & Alaghebandan, R. (2005).
336 Characteristics of dermatophytoses among children in an area south of Tehran, Iran. *Mycoses*,
337 48(1), 32–37.
- 338 74. Rezaei-Matchkolaei, A., Rafiei, A., Makimura, K., Gräser, Y., Gharghani, M., &
339 Sadeghi-Nejad, B. (2016). Epidemiological Aspects of Dermatophytosis in Khuzestan,
340 southwestern Iran, an Update. *Mycopathologia*, 181(7–8), 547–553.
- 341 75. Sahin, I., Oksuz, S., Kaya, D., Sencan, I., & Çetinkaya, R. (2004). Dermatophytes in
342 the rural area of Duzce, Turkey. *Mycoses*, 47(11–12), 470–474.
- 343 76. Salari, S., Ayatollahi Mousavi, S. A., Hadizadeh, S., & Izadi, A. (2017). Epidemiology
344 of dermatomycoses in Kerman province, southeast of Iran: A 10-years retrospective study
345 (2004–2014). *Microbial Pathogenesis*, 110, 561–567.
- 346 77. SANTOS Jairo Ivo dos, N. C. M. W. D. C. P. R. N. B. P. C. M. P. (1997). Some
347 aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianópolis, Santa Catarina,
348 Brazil. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39, 137–140.

- 349 78. Sberna, F., Farella, V., Geti, V., Tavíti, F., Agostini, G., Vannini, P., ... Difonzo, E.
350 M. (1993). Epidemiology of the dermatophytoses in the Florence area of Italy: 1985-1990.
351 *Mycopathologia*, 122(3), 153–162.
- 352 79. Sentamil Selvi, G., Kamalam, A., Ajithados, K., Janaki, C., & Thambiah, A. S. (1999).
353 Clinical and mycological features of dermatophytosis in renal transplant recipients. *Mycoses*,
354 42(1–2), 75–78.
- 355 80. Sentamilselvi, G., Kamalam, A., Ajithadas, K., Janaki, C., & Thambiah, A. S. (1997).
356 Scenario of chronic dermatophytosis: an Indian study. *Mycopathologia*, 140(3), 129–135.
- 357 81. Silva-Rocha, W. P., de Azevedo, M. F., & Chaves, G. M. (2017). Epidemiology and
358 fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med*, 27(1),
359 57–64.
- 360 82. Silveira-Gomes, F., Oliveira, E. F. de, Nepomuceno, L. B., Pimentel, R. F., Marques-
361 da-Silva, S. H., & Mesquita-da-Costa, M. (2013). Dermatophytosis diagnosed at the Evandro
362 Chagas Institute, Pará, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 443–446.
- 363 83. Simonnet, C., Berger, F., & Gantier, J.-C. (2011). Epidemiology of superficial fungal
364 diseases in French Guiana: a three-year retrospective analysis. *Medical Mycology*, 49(6), 1–4.
- 365 84. Singh, D., Patel, D. C., Rogers, K., Wood, N., Riley, D., & Morris, A. J. (2003).
366 Epidemiology of dermatophyte infection in Auckland, New Zealand. *Australasian Journal of*
367 *Dermatology*, 44(4), 263–266.
- 368 85. Tan, H.-H. (2005). Superficial Fungal Infections Seen at the National Skin Centre,
369 Singapore. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 46(2), 77–80.
- 370 86. Tao-Xiang, N., Zhi-Cheng, L., Sao-Mao, W., & Wen-Zhu, L. (2005). Analysis of
371 Dermatophytoses in Lanzhou District of Northwestern China. *Mycopathologia*, 160(4), 281–
372 284.
- 373 87. Tsoumani, M., Jelastopulu, E., Bartzavali, C., Vamvakopoulou, S., Dimitracopoulos,
374 G., Anastassiou, E. D., & Christofidou, M. (2011). Changes of Dermatophytoses in
375 Southwestern Greece: An 18-Year Survey. *Mycopathologia*, 172(1), 63–67.
- 376 88. Vella Zahra, L., Gatt, P., Boffa, M. J., Borg, E., Mifsud, E., Scerri, L., ... Pace, J. L.
377 (2003). Characteristics of superficial mycoses in Malta. *International Journal of Dermatology*,
378 42(4), 265–271.
- 379 89. Vena, G. A., Chieco, P., Posa, F., Garofalo, A., Bosco, A., & Cassano, N. (2012).
380 Epidemiology of dermatophytoses: retrospective analysis from 2005 to 2010 and comparison
381 with previous data from 1975. *New Microbiol*, 35(2), 207–213. Retrieved from
- 382 90. Vidotto, V., Garcia, R., Ponce, L.-M., Valverde, M., & Bruatto, M. (2009).
383 Dermatophytoses in Gusco (Peru). *Mycoses*, 34(3–4), 183–186.

- 384 91. VISHNU, S. et al. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment.
385 African Journal of Microbiology Research, v. 9, n. 19, p. 1286–1293, 2015.
- 386 92. Welsh, O., Welsh, E., Ocampo-Candiani, J., Gomez, M., & Vera-Cabrera, L. (2006).
387 Dermatophytoses in Monterrey, Mexico. *Mycoses*, 49(2), 119–123.
- 388 93. Woldeamanuel, Y., Leekassa, R., Chryssanthou, E., Mengistu, Y., & Petrini, B.
389 (2006). Clinico-mycological Profile of Dermatophytosis in a Reference Centre for Leprosy
390 and Dermatological Diseases in Addis Ababa. *Mycopathologia*, 161(3), 167–172.
- 391 94. Yehia, M. A., El-Ammawi, T. S., Al-Mazidi, K. M., Abu El-Ela, M. A., & Al-Ajmi,
392 H. S. (2010). The Spectrum of Fungal Infections with a Special Reference to
393 Dermatophytoses in the Capital Area of Kuwait During 2000–2005: A Retrospective
394 Analysis. *Mycopathologia*, 169(4), 241–246.
- 395 95. Zaki, S. M., Ibrahim, N., Aoyama, K., Shetaia, Y. M., Abdel-Ghany, K., & Mikami,
396 Y. (2009). Dermatophyte Infections in Cairo, Egypt. *Mycopathologia*, 167(3), 133–137.
- 397 96. Zamani, S., Sadeghi, G., Yazdinia, F., Moosa, H., Pazooki, A., Ghafarinia, Z.,
398 Razzaghi-Abyaneh, M. (2016). Epidemiological trends of dermatophytosis in Tehran, Iran: A
399 five-year retrospective study. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(4), 351–358.
- 400 97. ZHAN P1, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow JB, Gerrits van den Ende B, Brankovics B,
401 Menken SBJ, Mei H, Bao W, Lv G, Liu W, de Hoog GS. Phylogeny of dermatophyte with
402 genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*.
403 *Studies in Mycology* 89: 153–175, 2018.
- 404 98. ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide.
405 *Mycopathologia*, v. 182, n. 1, p. 1–10, 2016.
- 406

407 **Appendix 1** - Data Collection Instrument by the authors.

408

DATA COLLECTION INSTRUMENT	
A. Identification	
1. Title: 2. Magazine: 3. Authors: 4. Idiom: 5. Country of Study: 6. Year of publication:	City:
B. Institution headquarters of the Study	
1. Type of Institution:	<input type="checkbox"/> Tertiary Hospital name: <input type="checkbox"/> Reference laboratory name: <input type="checkbox"/> Medical Center Medical Center <input type="checkbox"/> Others:
C. Methodological Aspects	
1. Purpose of the study:	
2. About the Study	2.1. Kind of study: 2.2. Duration of the study:
3. Sample Identification:	<input type="checkbox"/> Direct Examination <input type="checkbox"/> Culture <input type="checkbox"/> Morphology <input type="checkbox"/> Biochemical test <input type="checkbox"/> Molecular tool <input type="checkbox"/> Others:
4. About Population of study:	4.1. Size: 4.2. Type of lesions studied 4.3. Concomitant disease
D. Results of the Study	
1. About Sample	1.1. Population affected by dermatophytosis 1.1.a Total of dermatophytes 1.1.b Distribution by population groups 1.1.c Distribution by species 1.1.d Distribution by injury
E. Methodological scoring system used to rate studies reviewed (Loney 1998)	
	<input type="checkbox"/> 1. Random sample or whole population <input type="checkbox"/> 2. Unbiased sampling frame (i.e. census data) <input type="checkbox"/> 3. Adequate sample size (>300 subjects) <input type="checkbox"/> 4. Measures were the standard <input type="checkbox"/> 5. Outcomes measured by unbiased assessors <input type="checkbox"/> 6. Adequate response rate (70%), refusers <input type="checkbox"/> 7. Confidence intervals, subgroup analysis <input type="checkbox"/> 8. Study subjects described Total

409

410

411

412

6. CONCLUSÃO

Todas as espécies de dermatófitos testadas apresentaram isolados com resistência aos antifúngicos, principalmente a Anfotericina B, Fluconazol, Miconazol e Nistatina.

O ensaio RFLP demonstrou a diversidade genética nos dermatófitos *T. tonsurans* e *T. interdigitale*.

A correlação da variabilidade genética com a resistência aos antifúngicos necessita de um estudo especificando os genes de resistência para serem mais precisos.

A revisão sistemática permitiu concluir que a espécie *T. rubrum* tem distribuição ampla e é a mais prevalente no mundo, seguido por *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* e *Trichophyton interdigitale*. As espécies cosmopolitas de dermatófitos são os principais agentes causadores dessa doença no mundo, e a parte da população com doença imunossupressora, ou outros fatores de predisposição, é a mais suscetível à dermatofitose crônica.

7. REFERÊNCIAS

AUGUSTO, J. et al. Superficial mycoses in the City of Manaus / AM between March. v. 81, n. 3, p. 238–243, 2006.

BORMAN, A. M., CAMPBELL, C. K., FRASER, M., & JOHNSON, E. M. (2007). Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology*, 45(2), 131–141.

BRILHANTE, R. S. et al. Epidemiologia e ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como importante patógeno emergente da *Tinea capitis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 5, p. 417–425, 2000.

CAFARCHIA, C. et al. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, v. 20, p. 336–51, dez. 2013.

CHEPCHIRCHIR, A.; BII, C.; NDINYA-ACHOLA, J. O. Dermatophyte infections in primary school children in Kibera slums of Nairobi. *East African Medical Journal*, v. 86, n. 2, p. 59–68, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous, CLSI, 2002. (Approved Standard M38-A)

CORTEZ, A. C. A. et al. Frequency and an etiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas, Brazil. *Revista iberoamericana de micologia*, v. 29, n. 4, p. 223–6, 2012.

COSTA, T. R. et al. Etiologia e epidemiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil Etiology and epidemiology in dermatophytosis in Goiânia, State of Goiás, Brazil. v. 32, n. 4, p. 367–371, 1999.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, p. 1–27, 25 out. 2017.

FELL, J.W. Rapid identification of yeast species using three primers in polymerase chain reaction. *Molecular marine biology and biotechnology*. 1993

DE HOOG, G. S., GUARRO, J., GENÉ, J., AHMED, S., AL-HATMI, A.M.S., FIGUERAS, M.J., VITALE, R.G. *Atlas of Clinical Fungi*. 2017.

GRÄSER, Y. et al. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 56, n. 8, p. 1058–1065, 2007.

GRUMBT, M.; MONOD, M.; STAIB, P. Genetic advances in dermatophytes. *FEMS Microbiology Letters*, v. 320, n. 2, p. 79–86, 2011.

HAYETTE, M. P.; SACHELI, R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. *Current Fungal Infection Reports*, v. 9, n. 3, p. 164–179, 2015.

SIDRIM, J. C. & B. MOREIRA, J. L. “Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica,” Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

KASZUBIAK, A. et al. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 4, n. 3, p. 179–186, 2004.

Korabecna, M. The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA Gene): Its Biological Meaning and Application in Medical Mycology. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 2007.

KUMAR S., STECHER G., LI M., KNYAZ C., AND TAMURA K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**:1547-1549.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M. & TAKAHASHI DE MELO, N. – Tratado de Micologia médica; Prefácio: Bertrand Dupont. 9. ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LAKSHMIPATHY, D.T. and KANNABIRAN, K. (2010) Review on Dermatophytosis: Pathogenesis and Treatment. *Natural Science*, 2, 726-731. KASZUBIAK et al., 2004

MARTINEZ-ROSSI, N. M.; PERES, N. T. A.; ROSSI, A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia*, v. 166, n. 5–6, p. 369–83, 2008. *Medlin et al* 1988

MEDLIN, L., ELWOOD, H. J., STICKEL, S., & SOGIN, M. L. (1988). The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), 491–499.

NIGAM, P.K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. *Our Dermatology Online*, v. 6, n. 2, p. 212–221, 14 abr. 2015.

NWEZE, E. I. Dermatophytoses in domesticated animals. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 2, p. 94–99, 2011.

PERSINOTI, G.F., et al. Whole-Genome Analysis Illustrates Global Clonal Population Structure of the Ubiquitous Dermatophyte Pathogen *Trichophyton rubrum*. *Genetics*, Vol. 208, 1657–1669. 2018

PIRES, C. A. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. *Anais brasileiros de dermatologia*, v. 89, n. 2, p. 259–64, 2014.
SEEBACHER et al., 2008

SALEHI, Z., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., & RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2018). Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates, 12–15.

SHEEHAN, D.J., HITCHCOCK, C.A., SIBLEY, C.M. Current and Emerging Azole Antifungal Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v 12(1): 40–79, 1999.

SINGH, G., KUMAR, P., JOSHI, S.C. Treatment of dermatophytosis by a new antifungal agent ‘apigenin’. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*. v 57, 497–506, 2014.

TAMURA K. AND NEI M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.

VISHNU, S. et al. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. *African Journal of Microbiology Research*, v. 9, n. 19, p. 1286–1293, 2015.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 8, n. 0893–8512 (Print), p. 240–259, 1995. WHITE, T.B.; LEE, 1990

WELSH, O., WELSH, E., OCAMPO-CANDIANI, J., GOMEZ, M., & VERA-CABRERA, L. (2006). Dermatophytoses in Monterrey, México. *Mycoses*, 49(2), 119–123.

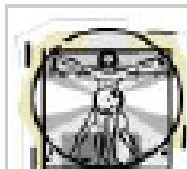
WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc, 1999.

ZAMANI, S., SADEGHI, G., YAZDINIA, F., MOOSA, H., PAZOOKI, A., GHAFARINIA, Z., RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2016). Epidemiological trends of dermatophytosis in Tehran, Iran: A five-year retrospective study. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(4), 351–358.

ZHAN P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow JB, Gerrits van den Ende B, Brankovics B, Menken SBJ, Mei H, Bao W, Lv G, Liu W, de Hoog GS.. Phylogeny of dermatophyte with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. *Studies in Mycology* 89: 153–175, 2018.

ZHAN, P.; LIU, W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia*, v. 182, n. 1, p. 1–10, 2016.

ANEXO I - Parecer de Aprovação do CEP



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo etio-epidemiológico e molecular dos dermatófitos causadores de dermatofitoses em pessoas atendidas em Serviços Públicos de Micologia de Manaus/AM

Pesquisador: ANI BEATRIZ JACKISCH MATSUURA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45590015.3.0000.5020

Instituição Proponente: CENTRO DE PESQUISAS LEONIDAS E MARIA DEANE - FUNDACAO

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.134.336

Data da Relatoria: 01/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se da resposta do estudo observacional, descritivo transversal e prospectivo. O projeto pertence à Grande Área do Conhecimento (CNPq) Grande Área 2. Ciências Biológicas e Grande Área 4. Ciências da Saúde. A pesquisadora responsável é a Dra. Ani Beatriz Jackisch Matsuura do do Instituto Leonidas e Maria Deane – ILMDFiocruz. O projeto tem financiamento da FAPEAM.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Realizar um estudo da problemática das dermatofitoses no estado do Amazonas determinando a etioepidemiologia e caracterização dos dermatófitos para dar subsídios para prevenção e controle desse problema de saúde pública.

Objetivo Secundário:

- Determinar a etio-epidemiologia das dermatofitoses que acometem as pessoas atendidas na FMT-HVD;
- Identificar as fontes de infecção das dermatofitoses;
- Determinar o perfil e os fatores associados aos pacientes com dermatofitose;
- Estudar o perfil de sensibilidade a antifúngicos dos isolados de dermatófitos;

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

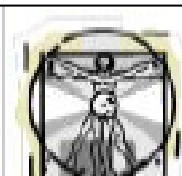
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.134.338

- Determinar o relacionamento filogenético dos isolados de dermatófitos ambientais e clínicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora responsável:

Riscos:

Nessa proposta de pesquisa serão inclusos os pacientes que procurarem o Serviço de Micologia da FMTHVD devido o encaminhamento médico para realização de exame micológico a fim de confirmar a suspeita de dermatofitose, não sendo necessária a realização de uma nova coleta de material biológico do paciente. Será utilizado o fungo isolado do material coletado para realização do exame solicitado pelo médico. O

paciente será convidado a participar do projeto e posterior assinatura do TCLE durante a coleta de material para realização do exame micológico. Esses pacientes serão entrevistados e questionados sobre a possibilidade de uma investigação da fonte de infecção ambiental e se caso a lesão tiver ocorrido em sua residência, se este paciente permitirá a presença do pesquisador em visita ao local para a realização de coleta de material ambiental. Os riscos que poderão surgir serão: (1) desconforto durante a entrevista, ao responder perguntas pessoais - será minimizado pelo entrevistador que será treinado para garantir ao máximo o sigilo dos participantes, além disso os questionamentos serão feitos em um ambiente individualizado, não expondo ao público a fim de evitar constrangimentos e deixando a pessoa à vontade para se negar a responder algumas perguntas; (2) desconforto durante a realização da coleta de material para realização de exame micológico que será realizado através de raspagem do local - o paciente poderá sentir um leve desconforto e/ou ardor na região que será minimizado com a utilização de materiais esterilizados para cada paciente, utilização de técnicas de assepsia no momento da coleta a fim de evitar possíveis infecções e realização de coleta com pessoal treinado a fim de minimizar possíveis desconfortos. Qualquer risco não previsto decorrente da participação na pesquisa, será minimizado pelo pesquisador.

Benefícios:

Esse trabalho contribuirá com maiores informações para a compreensão a respeito da epidemiologia desses fungos e possíveis fatores associados a sua infecção, a distribuição desses fungos na cidade de Manaus, sua importância como agente causador de micose em seres humanos e do perfil de sensibilidade à antifúngicos utilizados rotineiramente no tratamento destas micoses, permitindo uma melhor conduta terapêutica frente a estas infecções.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.154.338

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional, descritivo transversal e prospectivo de detecção de casos. Serão incluídos no estudo as pessoas que procurarem o Serviço de Micologia da FMT-HVD com encaminhamento médico para realização de exame micológico a fim de confirmar a suspeita de dermatofitose e que aceitem participar da pesquisa, durante o período de 12 meses. Cada paciente irá responder a um questionário onde serão considerados os dados demográficos, clínicos e epidemiológicos. Serão consideradas crianças os indivíduos com idade 12 anos. Dados como gênero, doenças de base, espécies isoladas, entre outros, serão analisados no presente estudo para determinar os fatores associados e o perfil das pessoas acometidas pelas dermatofitoses. Esses pacientes (ou os seus responsáveis) serão questionados também se há suspeita de como podem ter adquirido a dermatofitose. Em casa positivo, e se autorizado, será realizada uma visita ao local indicado, para coleta de amostras do ambiente e/ou animal, conforme indicação do paciente. Isolamento clínico. O isolamento clínico dos dermatófitos dos pacientes, será realizado no Serviço de Micologia da FMT-HVD conforme metodologia de rotina empregada. Os dermatófitos isolados serão encaminhados para o Laboratório de Biodiversidade em Saúde/Micologia do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz para os estudos de variabilidade genética e perfil de sensibilidade à Antifúngicos.

O Orçamento Financeiro está detalhado, contando com o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, tendo sido apensado a Declaração de Financiamento da FAPEAM no arquivo 030. DECLARAÇÃO - Ani Beatriz Jackisch Matsuura - PROEP.pdf, de 25/05/2015 09:40:52.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: ADEQUADA. Assinada pela pesquisadora responsável e pelo Diretor Substituto do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/Fiocruz Amazônia, DR. Felipe Gomes Naveca.

Termo de Anuência: ADEQUADO. Em arquivo "termo de anuencia FMT.pdf", de 25/05/2015 09:40:03, foi apresentado o Termo de Anuência da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado, assinada pelo Diretor de Ensino e Pesquisa DR. Marcus Vinicius Guimarães de Lacerda.

Instrumentos de Coleta de Dados: ADEQUADO. A pesquisadora optou por retirar as questões sobre drogas ilícitas nesta versão do questionário.

TCLE: ADEQUADOS. As pendências existentes nas versões anteriores foram corrigidas nas versões atuais do TCLE para adulto, Termo de Assentimento e TCLE para pais/responsáveis.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

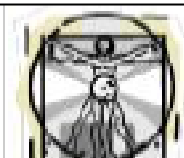
UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE
DO AMAZONAS - FUA (UFAM)



Continuação do Parecer: 1.134.338

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto apresenta relevância social e científica, e nesta versão atende às exigências Resolução 466/2012-CNS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

MANAUS, 01 de Julho de 2015

Assinado por:

Eliana Maria Pereira da Fonseca
(Coordenador)

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-5130

Fax: (92)3305-5130

E-mail: cep@ufam.edu.br

ANEXO II - INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS

DATA COLLECTION INSTRUMENT	
A. Identification	
1. Title: 2. Magazine: 3. Authors: 4. Idiom: 5. Country of Study: 6. Year of publication:	City:
B. Institution headquarters of the Study	
1. Type of Institution:	<input type="checkbox"/> Tertiary Hospital name: <input type="checkbox"/> Reference laboratory name: <input type="checkbox"/> Medical Center Medical Center <input type="checkbox"/> Others:
C. Methodological Aspects	
1. Purpose of the study:	
2. About the Study	2.1. Kind of study: 2.2. Duration of the study:
3. Sample Identification:	<input type="checkbox"/> Direct Examination <input type="checkbox"/> Culture <input type="checkbox"/> Morphology <input type="checkbox"/> Biochemical test <input type="checkbox"/> Molecular tool <input type="checkbox"/> Others:
4. About Population of study:	4.1. Size: 4.2. Type of lesions studied 4.3. Concomitant disease
D. Results of the Study	
1. About Sample	1.1. Population affected by dermatophytosis 1.1.a Total of dermatophytes 1.1.b Distribution by population groups 1.1.c Distribution by species 1.1.d Distribution by injury
E. Methodological scoring system used to rate studies reviewed (Loney 1998)	
	<input type="checkbox"/> 1. Random sample or whole population <input type="checkbox"/> 2. Unbiased sampling frame (i.e. census data) <input type="checkbox"/> 3. Adequate sample size (>300 subjects) <input type="checkbox"/> 4. Measures were the standard <input type="checkbox"/> 5. Outcomes measured by unbiased assessors <input type="checkbox"/> 6. Adequate response rate (70%), refusers <input type="checkbox"/> 7. Confidence intervals, subgroup analysis <input type="checkbox"/> 8. Study subjects described Total