



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES DE *Trichophyton* COM BASE EM
REGIÕES DE GENES ORTÓLOGOS E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

Recife

2024

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES DE *Trichophyton* COM BASE EM
REGIÕES DE GENES ORTÓLOGOS E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biologia de Fungos.
Área de concentração: Micologia Básica

Orientador (a): Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Oliveira, Tatiana Felix de.

Taxonomia e filogenia de espécies de *Trichophyton* com base em regiões de genes ortólogos e determinação do perfil de susceptibilidade a antifúngicos / Tatiana Felix de Oliveira. - Recife, 2024.

81f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, 2024.

Orientação: Oliane Maria Correia Magalhães.

Inclui referências e apêndices.

1. Dermatófitos; 2. Morfologia; 3. Identificação molecular;
4. Antifúngicos. I. Magalhães, Oliane Maria Correia. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ESPÉCIES DE *Trichophyton* COM BASE EM
REGIÕES DE GENES ORTÓLOGOS E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Biologia de Fungos. Área de concentração: Micologia Básica.

Aprovado em: 21/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dra. Rejane Pereira Neves (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Guilherme Maranhão Chaves (Examinador Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN

Dra. Maria Daniela Silva Buonafina-Paz (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Dr. Cícero Pinheiro Inácio (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sem o seu cuidado e proteção eu não conseguiria conquistar meus objetivos. O processo de passar por uma pandemia, com todos os medos que precisaram ser enfrentados e precisando realizar os experimentos de doutorado não foi nada fácil, agradeço a Deus por ter me guiado e protegido, devo tudo que sou e todas as minhas conquistas à Ele.

Agradeço aos meus pais Mônica Felix e Jair Rodrigues, que sempre me apoiam e me dão suporte em tudo que preciso, obrigada por TUDO, eu amo vocês!

Agradeço aos amigos que fazem parte da minha vida, eles tornam tudo mais leve.

Agradeço às minhas amigas e companheiras de laboratório, Adryelle Alves e Maria Audilene Freitas que estiveram sempre presentes nos conselhos e conversas para fazer com que um dia tão cansativo passasse depressa.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório (Bruna Rodrigues, Franz Assis, Daniela Buonafina, Melyna Leite, Cícero Inácio) por cada ensinamento, auxílio durante os trabalhos de bancada e por todas as conversas.

Agradeço a minha orientadora Oliane Magalhães por todo o aprendizado, suporte e auxílio durante esses anos de mestrado e doutorado. Ela fez tudo acontecer da forma mais leve possível, serei eternamente grata pela oportunidade que me foi dada.

Agradeço a todos os professores da Pós-Graduação em Biologia de Fungos por todo ensinamento durante esses anos, em especial a professora Rejane Neves e o professor Armando Marsden.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos por todo suporte e oportunidade. Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco.

Agradeço à CAPES pelo auxílio financeiro para realização de todo trabalho.

RESUMO

Trichophyton é um gênero pertencente ao grupo de fungos dermatófitos, agentes das dermatofitoses, infecções fúngicas comuns em todo o mundo. A identificação de espécies de *Trichophyton* utilizando técnicas de biologia molecular é de suma importância para o esclarecimento da filogenia e das relações dentro da família Arthrodermataceae. Os objetivos deste trabalho foram analisar a heterogeneidade de espécies de *Trichophyton* depositadas na Micoteca URM através de análises morfofisiológicas, análise molecular e estudos filogenéticos, além de determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica. Foram utilizadas 61 cepas, as quais foram caracterizadas através de métodos clássicos de identificação, além de métodos moleculares e filogenéticos, bem como a avaliação do perfil de suscetibilidade antifúngica. Nos estudos moleculares, as regiões β -tubulina e ITS do rDNA são genes eficazes para determinação da espécie. Após as análises moleculares, as cepas pertenciam as seguintes espécies: *Trichophyton concentricum*, *T. mentagrophytes*, *T. quinckeanum*, *T. rubrum* e *T. tonsurans*. O genótipo II de *T. mentagrophytes* foi o único relatado a partir das análises filogenéticas. No teste de suscetibilidade, o menor valor de CIM foi de 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para itraconazol e 0,17 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para terbinafina. Todas as cepas de *Trichophyton* utilizadas neste estudo obtiveram padrões semelhantes de suscetibilidade a itraconazol e terbinafina. O estudo taxonômico e de suscetibilidade antifúngica de uma coleção de cepas de *Trichophyton* é importante para o monitoramento das características fenotípicas e filogenéticas das cepas, além do acompanhamento dos padrões de suscetibilidade antifúngica de *Trichophyton* spp., sendo importante para um maior controle da resistência antifúngica em dermatófitos, além de auxiliar em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: dermatófitos, morfologia, identificação molecular, antifúngicos

ABSTRACT

Trichophyton is a genus belonging to the group of dermatophyte fungi, agents of dermatophytosis, fungal infections common throughout the world. The identification of *Trichophyton* species using molecular biology techniques is of utmost importance for clarifying the phylogeny and relationships within the Arthrodermataceae family. The objectives of this work were to analyze the heterogeneity of *Trichophyton* species deposited in the URM Micoteca through morphophysiological analyses, phylogenetic studies and determine the antifungal susceptibility profile. 61 strains were used, which were characterized using classical identification methods, in addition to molecular and phylogenetic methods, as well as antifungal susceptibility. In molecular studies, the β -tubulin and ITS regions of rDNA are effective genes for species determination. After molecular analyses, the strains belonged to the following species: *Trichophyton concentricum*, *T. mentagrophytes*, *T. quinckeanum*, *T. rubrum* and *T. tonsurans*. Genotype II of *T. mentagrophytes* was the only one reported from phylogenetic analyses. In the susceptibility test, the lowest MIC value was 0.04 mg/mL for itraconazole and 0.17 μ g/mL for terbinafine. All *Trichophyton* strains used in this study showed similar patterns of susceptibility to itraconazole and terbinafine. The taxonomic and antifungal susceptibility study of a collection of *Trichophyton* strains is important for monitoring the phenotypic and phylogenetic characteristics of the strains, in addition to monitoring the antifungal susceptibility patterns of *Trichophyton* spp., being important for greater control of antifungal resistance in dermatophytes, in addition to assisting in epidemiological studies.

Keywords: dermatophytes, morphology, molecular identification, antifungals.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 OBJETIVOS..... | 14 |
| Geral..... | 14 |
| Específicos..... | 14 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 15 |
| 3.1 Coleções de culturas..... | 15 |
| 3.2 Dermatófitos | 16 |
| 3.3 Taxonomia dos dermatófitos..... | 16 |
| 3.4 Caracterização de dermatófitos | 20 |
| 3.4.1. Caracterização morfofisiológica | 20 |
| 3.4.2 Caracterização molecular | 22 |
| Complexo <i>Trichophyton mentagrophytes</i> Takashio, 1977 | 24 |
| <i>Trichophyton benhamiae</i> Ajello & Cheng, 1967 | 25 |
| <i>Trichophyton erinacei</i> J.M.B. Sm. & Marples, 1966 | 25 |
| <i>Trichophyton interdigitale</i> Priestley, 1917 | 26 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes</i> Blanchard, 1896..... | 28 |
| <i>Trichophyton equinum</i> Matruchot e Dassonville, 1898..... | 29 |
| <i>Trichophyton quinckeanum</i> Quincke, 1886 | 30 |
| Complexo <i>Trichophyton rubrum</i> Graser et al. 2000 | 31 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> Sabouraud, 1911 | 32 |
| <i>Trichophyton schoenleinii</i> Robert Remak, 1837 | 33 |
| <i>Trichophyton simii</i> Pinoy, 1912 | 33 |
| <i>Trichophyton soudanense</i> Joyeux, 1912 | 34 |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> Malmsten, 1845 | 35 |
| <i>Trichophyton violaceum</i> Sabouraud, 1902 | 37 |
| 3.5 Dermatofitoses | 37 |
| 3.6 Epidemiologia | 39 |
| 3.7 Diagnóstico..... | 42 |
| 3.8 Susceptibilidade antifúngica e tratamento | 45 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 48 |

| | |
|--|-----------|
| 4.1 Obtenção das cepas..... | 48 |
| 4.2 Reativação..... | 48 |
| 4.3 Análise morfológica | 48 |
| 4.4 Análise fisiológica..... | 48 |
| 4.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento | 49 |
| 4.6 Análises filogenéticas | 50 |
| 4.7 Teste de susceptibilidade antifúngica | 50 |
| 4.8 Análise estatística | 51 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 6 CONCLUSÕES | 68 |
| REFERÊNCIAS | 69 |
| APÊNDICE A – Figura 8 | 78 |
| APÊNDICE B - Figura 9 | 78 |

1 INTRODUÇÃO

Dermatófitos constituem um grupo único, altamente especializado e inter-relacionado de fungos filamentosos pertencentes ao filo Ascomycota, classe Onygenales e família Arthrodermataceae (Moskaluk & VandeWoude, 2022). Esses fungos compartilham uma capacidade peculiar de degradar e crescer no tecido queratinizado, causando dermatofitoses (Mirhendi et al., 2015). Esse grupo de fungos é classificado em sete gêneros, nomeadamente *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizia*, *Paraphyton* e *Trichophyton*, de acordo com a taxonomia mais recente (De Hoog et al., 2017; Haghani et al., 2023).

Até a década de 1990, a taxonomia dos dermatófitos era complexa gerando muitas dúvidas quanto a separação de espécies e gêneros, principalmente do gênero *Trichophyton*, devido a alta heterogeneidade fenotípica entre as espécies (Dabrowska; Dworecka-Kaszak, 2014).

Nos últimos anos, a utilização de ferramentas moleculares, tem apontado um progresso considerável na identificação e classificação destes fungos, como também tem contribuído significativamente para avanços na sistemática, taxonomia, ecologia, epidemiologia, com variação de espécies de acordo com a localização geográfica e a migração populacional ao longo do tempo, e entendimento dos processos evolutivos (Putignani et al., 2010; Cafarchia et al., 2013; Koc et al., 2017; Maraki; Mavromanolaki, 2016).

Filogeneticamente, as espécies do gênero *Trichophyton* compreendem um grupo com baixa variação genética, combinada com uma alta diversidade fenotípica (Abastabar et al., 2014). As definições de espécies moleculares nem sempre coincidem com os conceitos existentes, que são guiados por princípios ecológicos e clínicos (Zhan et al., 2018).

Desde 2010, o sequenciamento de DNA e a sistemática molecular geraram novos conceitos de espécies. Este avanço causou uma redução no número de táxons até então reconhecidos e, por outro lado, levou à descoberta de espécies crípticas e novas. No entanto, a definição de fronteiras taxonômicas de algumas espécies ainda é discutida, por exemplo, complexos de espécies de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (Abastabar et al., 2014; Zhan et al., 2018).

Desde a década de 1990 quando foram realizados os primeiros estudos com técnicas moleculares envolvendo dermatófitos, vários marcadores foram aplicados em estudos filogenéticos para estabelecer os limites de espécies, com intuito de possibilitar a separação de complexos envolvendo esses patógenos. Assim, os primeiros estudos moleculares com representantes deste grupo utilizaram como base a região ITS (Internal Transcribed Spacers) do rDNA, permitindo um avanço em sua taxonomia (Garces et al., 2016; Makimura et al., 1998; Pérez-Rodriguez et al., 2023), seguido por outros genes, tais como LSU (Partial Large Subunit), β-tubulina (BT2), quitina sintase 1 (CHS1), DNA topoisomerase II (TOP-II) e fator de elongação da tradução 1-α (Tef-1α), os quais foram utilizados com intuito de facilitar a identificação dos agentes etiológicos associados a dermatofitoses (Abastabar et al., 2014; Ahmadi et al., 2016; de Hoog et al., 2017). Estudos apontam o gene calmodulina como um bom marcador para análise genética de dermatófitos (Ahmadi et al., 2016).

Devido ao grande número de casos de dermatofitoses no mundo, houve um aumento do uso de medicamentos antifúngicos, muitas vezes por períodos prolongados, e de modo indiscriminado, levando ao reconhecimento do fenômeno de resistência antifúngica (Salehi; Shams-Ghahfarokh; Razzaghi-Abyaneh, 2018). As coleções de culturas são acervos importantes que prestam serviços de identificação, preservação, além de análise das potencialidades biotecnológicas dos fungos depositados. A Micoteca URM preserva cerca de 8000 culturas de fungos, atendendo pesquisadores de Pernambuco e demais estados do Brasil, além de estudiosos de outros países.

A identificação correta de espécies de dermatófitos é importante para os estudos taxonômicos e para os testes de suscetibilidade, que é essencial para definir o tratamento correto das dermatofitoses. O teste de suscetibilidade antifúngica com dermatófitos é uma ferramenta útil para gerenciar pacientes com diferentes formas clínicas de dermatofitoses. As infecções por dermatófitos impõem um gasto econômico considerável aos sistemas de

saúde, uma vez que são gastos mais de 800 milhões de dólares/ano, excluindo custos indiretos relacionados com testes/procedimentos médicos desnecessários e tratamento inadequado antes de um diagnóstico ser estabelecido (Siopi et al., 2021). As principais estratégias terapêuticas para dermatofitoses são o tratamento sistêmico e tópico com alilamina e triazóis à base de terbinafina e itraconazol (Haghani et al., 2023). É importante a realização cada vez mais frequente de testes de suscetibilidade antifúngica para auxiliar no tratamento destas infecções (Hur et al., 2018; Salehi; Shams-Ghahfarokhi; Razzaghi-Abyaneh, 2018). Diante do exposto, as análises morfofisiológicas, moleculares e filogenéticas são importantes para o estudo de espécies de dermatófitos depositadas em coleções de culturas para esclarecer problemática da sua filogenia, auxiliando na confirmação da heterogeneidade das cepas e em estudos epidemiológicos.

2 OBJETIVOS

Geral

Confirmar a heterogeneidade de espécies de *Trichophyton* mantidas na coleção de culturas Micoteca URM através de estudos filogenéticos e análises morfológicas, com intuito de contribuir com a revisão taxonômica do gênero, bem como avaliar o perfil de suscetibilidade antifúngica.

Específicos

- Revisar a identificação das culturas das espécies de *Trichophyton* depositadas na coleção de culturas Micoteca URM, auxiliando no conhecimento taxonômico do gênero;
- Caracterizar através de análises fenotípicas culturas de *Trichophyton* mantidas na coleção de culturas;
- Caracterizar através de análises moleculares e avaliar regiões gênicas apropriadas para estudos filogenéticos de cepas de *Trichophyton*;
- Determinar o perfil de suscetibilidade de todas as cepas utilizando os antifúngicos terbinafina e itraconazol.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Coleções de culturas

Coleções de culturas são centros de conservação que tem a função de coletar microrganismos relevantes para estudos científicos e aplicações tecnológicas. As coleções de culturas de microrganismos apresentam contribuição de extrema importância para a preservação, manutenção e suprimento de culturas autenticadas aos pesquisadores. Além de garantir um estrito controle de qualidade para a aquisição e depósito em seus bancos (Abreu & Tutunji, 2004).

Elas tem atuado na integração da comunidade científica, desenvolvendo tecnologias inovadoras para coletar, gerenciar, integrar, analisar e compreender diversos microrganismos (Abreu & Tutunji, 2004). A maneira mais eficiente de conservar microrganismos é a preservação em coleções, para assim garantir a sua pureza durante períodos prolongados de tempo, conservando suas propriedades morfológicas.

A Coleção de Culturas Micoteca URM do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco é uma coleção de referência e foi fundada em 1954 pelo Professor Augusto Chaves Batista. A Micoteca URM está cadastrada na PROPESQI/UFPE como Laboratório Multiusuário de Pesquisa (LaMP). Atualmente, o acervo consta de aproximadamente 8.000 culturas de fungos, sendo cerca de 1.300 leveduras e 6.700 fungos filamentosos, todas identificadas ao nível de espécie e mantidas em duplicata em cada método de preservação. O acervo consta de aproximadamente 201 espécies de leveduras e cerca de 1.200 de fungos filamentosos, pertencentes aos Oomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota e Deuteromycota (Fungos anamorfos). Além de receber amostras de fungos para fazer parte do acervo, a Micoteca URM atende a pedidos de fornecimento de amostras, isolamento e identificação de fungos e, treinamento de estudantes e profissionais na área de taxonomia de fungos. Estes pedidos são procedentes de instituições de ensino e/ou pesquisa, nacionais e internacionais; de laboratórios que utilizam amostras de fungos em testes para fabricação de medicamentos e dos que realizam diagnóstico de micoses; e da comunidade em geral (<https://ufpe.br/micoteca>).

3.2 Dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos queratinifílicos que produzem protease e queratinase os quais degradam a queratina, levando à colonização, invasão e infecção do estrato córneo da pele, fios de cabelo e unhas. Esses fungos podem causar infecções mais graves em hospedeiros imunocomprometidos através da penetração em tecidos. Os mesmos representam uma família intimamente relacionada e altamente conservada de fungos, constituindo um grupo único e individualizado (Sem et al., 2020).

Remak em 1835 observou pela primeira vez estruturas microscópicas peculiares semelhantes a hastes e brotos em crostas de lesões favicas. Este afirmou que não reconheceu as estruturas como fúngicas e creditou esse reconhecimento a Schoenlein, que descreveu sua natureza micótica em 1839. No entanto, Remak estabeleceu que o agente etiológico do favus era infeccioso, cultivado em fatias de maçã, e validamente descreveu-o como *Achorion schoenleinii*, em homenagem ao mentor de sua descoberta. O verdadeiro fundador da dermatomicologia foi David Gruby com base nas suas descobertas de 1841 a 1844, descrevendo o causador do favus, tanto clinicamente como em detalhes microscópicos de lesões das crostas e estabeleceu a natureza contagiosa da doença (Weitzman & Summerbell, 1995).

Taxonomicamente, os dermatófitos pertencem a sete gêneros, na ordem Onygenales e família Arthrodermataceae (Suh; Grosso; Carrion, 2018). É considerado um dos grupos mais antigos de microrganismos que foram reconhecidos como agentes de micoses em humanos, sendo descritas mais de 50 espécies (Cruz et al., 2019). Destas espécies, aproximadamente 20 pertencem aos três gêneros mais reconhecidos e prevalentes no mundo; *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (Araya; Tesfaye; Fente, 2020).

Estes fungos podem estar associados a seres humanos (antropofílicos) e outros animais (zoofílicos) como seu habitat natural, enquanto o terceiro grupo ocorre no solo (geofílicos) (De Hoog et al., 2017).

3.3 Taxonomia dos dermatófitos

Historicamente, mais de 300 nomes foram definidos em algum momento para as 52 espécies de dermatófitos que existem de acordo com os últimos estudos taxonômicos (Baert et al., 2019). Podemos inferir que os métodos tradicionais utilizados para

sistemática de fungos com base em macro e micromorfologia em meios de cultura, características fisiológicas e biológicas e nicho ecológico não são acurados para identificação de dermatófitos ao nível específico ou compreensão suas relações. Características fenotípicas podem variar dependendo das condições ambientais. O mesmo genótipo pode ter diferentes formas morfológicas e características fisiológicas, e diferentes cepas da mesma espécie podem ter características diferentes no mesmo meio de cultura (Brasch & Glaser 2019). Ou seja, há problemas com definição e caracterização de dermatófitos que são relevantes para revisão filogenética (Rezaei-Matehkolaei et al., 2014).

Desde meados do século XIX, a taxonomia dos dermatófitos foi amplamente investigada e baseava-se principalmente em sintomas clínicos e características morfológicas *in vitro*. Uma vez que esta classificação era baseada em fenótipo, mutantes ou morfotipos de espécies únicas eram frequentemente confundidos com espécies separadas. Ainda, devido à falta de cepas de referência, muitas espécies foram descritas separadamente por vários pesquisadores independentes que introduziram muitos táxons que posteriormente foram tratados como sinônimos (Baert et al., 2019).

Segundo Kushwaha; Guarro (2000), a organização dos dados para a distinção dos táxons destes fungos constitui uma tarefa difícil, pois requer informações tanto da fase sexual ou assexual, sendo que, na prática clínica, as espécies agentes etiológicas das dermatofitoses são todas reconhecidamente a fase assexual.

Para esclarecer as relações evolutivas entre os dermatófitos, técnicas baseadas em biologia molecular começaram a ser aplicadas desde o início de 1980 (de Hoog et al., 2017), e apesar da sua importância médica, há poucos estudos sobre a variabilidade intraespecífica e interespecífica de *Trichophyton* e outros dermatófitos, assim como abordando os aspectos filogenéticos utilizando sequências de DNA (Zheng et al., 2020).

Na abordagem filogenética, os dermatófitos compreendem um grupo heterogêneo, com baixa variabilidade genética e contrastando com alta diversidade fenotípica (Mirhendi et al., 2014). Descritos desde 1839, existem mudanças constantes na classificação e modificações incisivas na taxonomia de dermatófitos (Blasch & Glaser, 2019).

Para definir uma melhor posição da taxonomia de dermatófitos, de acordo com sua filogenia, vários gêneros foram reintroduzidos, além de *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Como resultado, um número menor de nomes de dermatófitos foi aceito, o que pode simplificar o diagnóstico de rotina de dermatófitos. No entanto, para vários

grupos de espécies intimamente relacionadas, a delimitação específica continua sendo um desafio. Esses complexos de espécies precisam de análises mais aprofundadas com base em maior número de cepas. Com o avanço da abordagem molecular, foi possível inferir que *T. mentagrophytes* é um complexo de espécies antropofílicas e zoofílicas com diferentes fases sexuais, como *Arthroderma vanbreuseghemii*, *A. benhamiae* e *A. simii*, (Ahmadi et al., 2016).

Estudos filogenéticos revelaram uma divisão entre espécies antropofílicas e geofílicas de *Trichophyton*, sugerindo que a ecologia é um fator particularmente forte entre os dermatófitos. Portanto, o solo pode ter fornecido um nicho ecológico precoce para todas as espécies de dermatófitos antes da adaptação a hospedeiros, incluindo humanos e outros animais; esse argumento é suportado pelo fato de que o gênero *Microsporum*, bem como as espécies zoofílicas e antropofílicas de *Trichophyton*, evoluíram a partir de um membro geofílico de *Trichophyton* (Ahmadi et al., 2016).

De acordo com a antiga proposta de classificação de dermatófitos, que foi posteriormente atualizada por De Hoog et al. (2017), baseada no sequenciamento de diferentes genes, as espécies anteriormente foram agrupadas em oito gêneros: *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Paraphyton*, *Lophophyton* e *Ctenomyces*, sendo 16 espécies de *Trichophyton*, uma de *Epidermophyton*, nove de *Nannizzia*, três de *Microsporum*, uma de *Lophophyton*, 21 de *Arthroderma* e uma de *Ctenomyces*. De Hoog et al. (2017) atualizaram o status taxonômico dos dermatófitos para um nível aceitável de concordância entre os micologistas; no entanto, o estudo focou na definição das principais tendências taxonômicas dos dermatófitos e deve ser reforçado e complementado com investigações mais detalhadas.

A análise filogenética usando diferentes marcadores moleculares já foi capaz de esclarecer grande parte da taxonomia dos dermatófitos (Baert et al., 2019). A árvore filogenética dos dermatófitos compreende o gênero derivado *Trichophyton* e gêneros basais, com quantidade significativa de representantes geofílicos. Segundo Shamsizadeh et al., (2020) o principal consenso é que a diversidade de *Trichophyton* está organizada em três categorias: geofílica, antropofílica e zoofílica.

O conceito de espécies geofílicas, antropofílicas e zoofílicas foi melhor estabelecido por Jensen & Arendrup (2012). As espécies geofílicas são dispersas dos outros táxons e localizadas na posição ancestral da árvore filogenética, espécies zoofílicas são encontradas espalhadas pelo meio da árvore, enquanto as espécies antropofílicas

podem ser encontradas em clados derivados. É de grande importância saber que a morfologia dessas espécies não corresponde à topologia da família, ou seja, algumas espécies que podem ser encontradas em clados ancestrais são morfologicamente próximas à espécies antropofílicas encontradas em uma posição derivada na filogenia. Além disso, foi estabelecida uma plataforma para a interpretação da nomenclatura do pleomorfo e pseudônimos, que para *T. rubrum* e os complexos de *T. mentagrophytes* têm sido difíceis de delinear e podem dificultar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico específicos para as espécies (Jensen & Arendrup, 2012).

Estudos confirmam que o complexo *T. mentagrophytes* é composto por quatro espécies: i. Zoófilo *T. mentagrophytes* stricto sensu; ii. Zoófilo *T. erinacei*; iii. *Trichophyton* anamorfo de *A. benhamiae* (zoofílico) e iv. cepas antropofílicas e zoofílicas de *T. interdigitale*. Com base na classificação, cepas antropofílicas de *T. mentagrophytes* devem ser rotuladas como *T. interdigitale* (Salehi et al., 2018). Consequentemente, vários estudos recentes se concentraram no problema de limites de espécies em táxons intimamente relacionados, incluindo *T. tonsurans* e *T. equinum*, *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* (Shamsizadeh et al., 2020).

Estudos confirmam que sequências da região ITS do rDNA fornecem resolução filogenética suficiente para apoiar as diferentes linhagens do gênero *Trichophyton* (Packeu et al., 2019). O gene da calmodulina expresso em todas as células eucarióticas, mostra-se altamente conservado tanto funcionalmente quanto estruturalmente, e a proteína codificada desempenha um papel crucial no desenvolvimento da proliferação, motilidade e ciclo celular. O alvo tem sido bem utilizado em análises filogenéticas e identificação de espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, mas alguns estudos sugerem que a calmodulina não é útil para discriminação entre algumas espécies de *Trichophyton* (Ahmadi et al., 2016). De acordo com outros estudos, o gene Fator de Alongamento de Tradução (TEF-1 α) foi considerado como alternativa ao rDNA mostrando alto nível de taxa de variação entre as espécies; além do gene β -tubulina (BT2) que foi considerado taxonomicamente valioso para o estudo sistemático de fungos dermatófitos (Abarca et al., 2016; Salehi et al., 2018).

O esclarecimento da taxonomia deste grupo é crucial para a correta identificação em análises de rotina e permitir estudos epidemiológicos detalhados.

3.4 Caracterização de dermatófitos

3.4.1. Caracterização morfofisiológica

As cepas de dermatófitos podem ser identificadas em nível de gênero/espécie através de métodos fenotípicos, com base nas características da colônia, estruturas microscópicas e testes bioquímicos como padrões de crescimento em meios contendo diferentes fontes de nutrientes e teste de enzimas. Durante muitos anos estes foram considerados padrão ouro para identificação, contudo não são mais, isoladamente, considerados satisfatórios para identificação de várias espécies de dermatófitos. Estes métodos clássicos para diferenciar dermatófitos são baseados na avaliação de sua morfologia macroscópica e microscópica e na observação de propriedades fisiológicas (Brasch, 2004).

Em 1934, Chester Emmons modernizou o esquema taxonômico de Sabouraud e estabeleceu a classificação dos dermatófitos com base na morfologia dos esporos e estruturas acessórias (Graser; Scott; Summerbeel, 2008). As características micromorfológicas das espécies do gênero *Trichophyton* que são mais observadas são a topografia da colônia que pode ser plana ou cerebriforme, a cor da colônia que pode ser branca, bege, cinza, amarelada, podendo ser também na cor marrom-avermelhada, dentre outras. O reverso pode ter colorações variadas como bege, amarelado, marrom, vermelho ou rosa-púrpura, violeta, entre outras. O micélio pode ser escasso ou não, o aspecto das colônias (pulverulentas ou algodonosas), a presença ou ausência de microconídios e as suas formas, que podem ser globosos, esféricos, piriformes, de formas variadas, podendo ser maiores ou menores, presença ou ausência de filamentos em espiral, a presença ou ausência de macroconídios, que geralmente são multisepitados, podem ter forma de charuto ou grandes em forma de tacos (Ates et al., 2008; Frías-De-León et al., 2020).

Os dermatófitos apresentam características morfológicas semelhantes e bastante variáveis, os testes fisiológicos foram descritos para auxiliar na identificação. Esses testes podem ser aplicados em situações em que as técnicas morfológicas não conseguem fornecer uma identificação adequada. Os testes fisiológicos usuais incluem as exigências nutricionais, como por exemplo, a prova Ágar-caseína e o teste da perfuração do pêlo, os testes de assimilação de carboidratos e as atividades enzimáticas, sendo a prova da urease mais utilizada (Sidrim & Rocha, 2004). Para verificar a atividade de diversas

enzimas normalmente são utilizadas técnicas de difusão em ágar com o uso de meios sólidos, sendo os resultados expressados pela formação de halos, resultantes da hidrólise dos substratos específicos ou pela mudança de cor do indicador contido no meio de cultura (Price et al., 1982).

O teste de urease é bastante utilizado na identificação dos dermatófitos, sendo particularmente útil na diferenciação de espécies do complexo *T. mentagrophytes* (urease positiva) das demais espécies de *Trichophyton*, sendo um método rápido e viável de separar principalmente as espécies *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (Philpot, 1967). Esse teste é processado em meio de ágar Christensen, e identifica a presença ou ausência da enzima urease que é produzida por algumas espécies de fungos (Sidrim & Moreira, 1999; Sidrim & Rocha, 2004). O teste é baseado na capacidade de determinadas espécies de dermatófitos produzirem a enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio (Cabañas, 2001).

O teste de assimilação de carboidratos, também denominado auxonograma, consiste na capacidade que uma espécie de fungo apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato, fornecido como única fonte de carbono. O teste é realizado em meio sólido acrescido da suspensão do microrganismo a ser testado. Os seguintes carboidratos podem ser fornecidos ao meio: insulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melobiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose. As espécies do gênero *Trichophyton* apresentam um perfil de assimilação diferente e a leitura é feita após 14 dias, mediante visualização de halos de crescimento que se formam ao redor do carboidrato assimilado (Brilhante et al., 2005).

A prova de requerimentos vitamínicos também é utilizada na identificação, para diferenciação de cepas baseadas em exigências nutricionais. Os meios de cultura utilizados são enriquecidos com ácido nicotínico, tiamina, histidina e inositol, sendo utilizada a caseína como base do meio, em que é realizada uma quantificação subjetiva e comparativa do crescimento fúngico (Sidrim & Moreira, 1999; Sidrim & Rocha, 2004).

Estudos evidenciam a impossibilidade de diferenciar espécies de dermatófitos com base apenas em critérios morfológicos ou fisiológicos. Portanto, na taxonomia deste grupo de fungos a abordagem que fornece resultados acurados é a utilização de abordagem filogenética (Liu et al., 2013; Brasch & Glaser, 2019).

3.4.2 Caracterização molecular

A identificação inconsistente causada por variações fenotípicas entre cepas conduziu para o surgimento de numerosos métodos de identificação molecular com sensibilidade mais acurada e específica, baseados em características genéticas estáveis, visto que o código de barras do DNA é muito útil para uma determinação acurada (Ahmadi et al., 2016; Diongue et al, 2019). Um gene alvo com resolução adequada pode potencialmente melhorar a definição de espécies intimamente relacionadas ou aquelas com características morfológicas atípicas na cultura (Ahmadi et al., 2016).

Os primeiros estudos aplicando as técnicas moleculares utilizaram as subunidades pequenas (SSU) e grandes (LSU) do rDNA como marcadores. Gräser et al. (2000) aplicaram a região ITS do rDNA mais variável e conseguiram resolver a problemática taxonômica de grande número de espécies, assim, regiões do rDNA provaram ser úteis como um método padrão ouro na identificação e análise filogenética (Ahmadi et al., 2016; de Hoog et al., 2017)

Este sistema molecular foi confirmado em estudos posteriores e com diferentes marcadores moleculares como BT2 e TEF-1 α . β -tubulina é uma proteína globular monomérica envolvida na geração de microfilamentos e recentemente tem sido usada com sucesso para delinear espécies de dermatófitos e em outros grupos de fungos. O lócus inclui alguns íntrons, que são conhecidos por serem bons estimadores para distinção de espécies estreitamente relacionadas (Rezaei-Matehkolaee et al., 2014).

Existem diferentes graus de variabilidade no DNA. Algumas regiões da informação genética são muito conservadas, ou seja, espécies diferentes possuem regiões idênticas, em outras, as regiões são altamente variáveis e diferem entre indivíduos da mesma espécie. Os genes ribossômicos (18S e 28S) são para diferenciar esse grupo de fungos que não são suficientemente variáveis. Com base em genes mais variáveis, como ITS, no entanto, todas as espécies conhecidas podem ser diferenciadas, às vezes apenas um ou dois, polimorfismos de sequência podem ser encontrados nessa região entre algumas espécies, ou seja, essas regiões variáveis provaram ser úteis na resolução de parentescos taxonômicos, sendo amplamente utilizadas na identificação a nível de espécie dos dermatófitos (Kupsch & Graser, 2019).

Técnicas baseadas na Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) aumentaram a sensibilidade, especificidade e velocidade do diagnóstico (Kupsch & Graser, 2019).

Análise filogenética e identificação de dermatófitos com base no sequenciamento da região ITS do rDNA provaram ser úteis como um método padrão-ouro (Jensen & Arendrup, 2012; Ahmadi et al., 2016). A região nuclear do rDNA tem sido muito vantajosa em estudos filogenéticos porque é multilocus e contém genes altamente conservados, como 18S, 5,8S e 28S, como as regiões espaçadoras transcritas internas 1 e 2 (ITS1 e ITS2) que são cruciais ao examinar organismos taxonomicamente relacionados. As regiões 18S e 28S muitas vezes abrigam íntrons inseridos em posições altamente conservadas, fornecendo mais informações sobre esta região (Pérez-Rodríguez et al., 2023). Pode-se inferir que além da região ITS, o marcador BT2 é bastante utilizado para construir uma filogenia de dermatófitos, sendo importantes para avaliar variações intra e interespecíficas de dermatófitos. Além disso, a região BT2 nos mostra uma árvore com topologia semelhante à obtida com o marcador ITS (Pérez-Rodríguez et al., 2023).

Os seguintes fragmentos de DNA foram observados como os principais marcadores genéticos dos dermatófitos: DNA ribossômico (rDNA), quitina sintase 1 (CHS1), DNA topoímerase II (TOP-II), BT2, TEF-1 α (Ahmadi et al., 2016).

Os métodos moleculares atuais para fins específicos de espécies têm como alvo a região do RNA ribossômico (abrangendo 18S, ITS1, 5.8S, ITS2 e 26S) devido à alta resolução de poder desta região. Outra vantagem da região é a sua natureza de ter elementos repetitivos que, quando usados como alvo de PCR no diagnóstico melhora a sensibilidade do teste (Jensen & Arendrup, 2012).

Embora a abordagem molecular tenha sido capaz de resolver os principais traços da evolução dos fungos dermatófitos pode haver falha nos detalhes, como na elucidação dos complexos envolvendo as espécies, devido à heterogeneidade fenotípica e semelhança entre os genótipos desse grupo. Pequenas ambiguidades de sequenciamento ou dados faltantes neste grande conjunto de dados podem desfocar as pequenas diferenças entre as espécies emergidas recentemente. Portanto, novos progressos no diagnóstico molecular da dermatofitose requerem investigação de outros fatores moleculares. Além disso, a definição de fronteiras taxonômicas de algumas espécies ainda permanece discutível, por exemplo, complexos de espécies de *T. mentagrophytes* (Mirhendi et al., 2015).

Pode-se dizer que as abordagens genotípicas são úteis para resolver problemas na taxonomia de dermatófitos, além de auxiliar na diferenciação das cepas (Ramaraj et al., 2017). Os métodos moleculares possuem grande importância pois são importantes na determinação de novas espécies (Jensen & Arendrup, 2012).

Complexo Trichophyton mentagrophytes Takashio, 1977

Trichophyton mentagrophytes foi considerado um complexo de espécies em 1977 por Takashio, pelo fato de que as espécies agrupadas dentro do complexo possuem uma alta similaridade genética (Oyarzo; Choappa; Duarte, 2019). O termo "mentagrophytes" foi criado por Gruby, em 1842, para designar o fungo com um parasitismo por ectotrix (esporos formando uma bainha ao redor do cabelo).

O complexo *T. mentagrophytes* consiste em vários anamorfos e três formas sexuais (*Arthroderma vanbreuseghemii*, *A. benhamiae* e *A. simii*). *Trichophyton mentagrophytes* representa um complexo genético incluindo mais de um teleomorfismo (Beguin et al 2012). As espécies do complexo podem ser diferenciadas com base na análise de sequências multigênicas de ITS, BT2 e TEF1 (de Hoog et al., 2017).

Pchelin et al. (2016) descrevem mudanças frequentes na nomenclatura do complexo de *T. mentagrophytes*, inicialmente, a forma antropofílica foi conhecida como *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* e a forma zoofílica como *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*.

Dentro do complexo *T. mentagrophytes* inúmeras variações na morfologia da colônia são observadas como o aspecto aveludado ou cotonoso, podendo ser colônias cerebriformes ou crescer de forma plana, coloração podendo variar do branco ao amarelado ou creme, com a pigmentação do reverso podendo estar presente se tornando marrom ou até mesmo ausente. As características microscópicas típicas que envolve o complexo *T. mentagrophytes* são a presença de numerosos microconídios globosos, cilíndricos ou alongados, alguns macroconídios e hifas em espiral. Há espécies que não apresentam microconídios. Podem apresentar corpos nodulares, clamidosporos, micélio em raquete, hifas semelhantes a chifre também podem ser observadas (Oyeka, 2000).

As espécies do complexo *T. mentagrophytes* são cosmopolitas e ocupam o segundo lugar em frequências entre os isolados dos dermatófitos, após o complexo *T. rubrum*. Esse complexo inclui espécies zoofílicas e antropofílicas. No Brasil, não existem trabalhos que classifiquem os membros desse complexo e em vários estudos de âmbito internacional, a classificação morfológica é definida como complexo *T. mentagrophytes* (Oyarzo; Choappa; Duarte, 2019).

Atualmente, no entanto, apenas cinco espécies são consideradas: *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *T. erinacei*, *T. quinckeanum* e *T. benhamiae*, bem como

nove genótipos diferentes de *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* associados à origem geográfica e a fonte de infecção. Essas espécies diferem no que diz respeito às suas preferências ecológicas (Thakur & Kalsi, 2019).

Trichophyton benhamiae Ajello & Cheng, 1967

Trichophyton benhamiae foi descrito pela primeira vez por Ajello & Cheng, em 1967. Nos últimos anos, com a taxonomia de dermatófitos baseada no sequenciamento da região do DNA ribossômico, *A. benhamiae* deixou de fazer parte do complexo *T. mentagrophytes*; foi reconhecida como uma espécie, *T. benhamiae*, do complexo (Uhrlaß et al., 2018).

É um dermatófito zoofílico que pode causar *tinea* em humanos e animais. Os porquinhos-da-índia são os principais portadores, e outros animais pequenos são ocasionalmente uma fonte de infecção. Devido ao aumento da variedade de animais, a infecção por *T. benhamiae* está aumentando. Casos causados pela infecção por *T. benhamiae* foram relatados em vários países, como Japão, Alemanha ou Suíça. Na Alemanha, é o patógeno mais prevalente que causa dermatofitose zoofílica, especialmente em crianças (Sabou et al., 2017).

O sequenciamento da região ITS é recomendado para a identificação precisa deste dermatófito (Sabou et al., 2017). As culturas são cultivadas em SDA, mas podem apresentar uma maior esporulação no meio PDA (Potato Dextrose Ágar) à temperatura de +/- 28°C, com tempo de incubação de 14 dias. Dois fenótipos foram descritos para *T. benhamiae*: amarelo e branco. No fenótipo amarelo as cepas são felpudas, com micélio pregueado, reverso amarelo alaranjado e taxa de crescimento lenta. Esporulação é pobre, com raros microconídios e sem macroconídios ou hifas espirais. As cepas de fenótipo branco são pulverulentas a flocosas, com reverso amarelo, laranja ou marrom e taxa de crescimento rápido. Os microconídios são numerosos, esféricos a clavados (2 x 3µm); os macroconídios estão presentes, de paredes lisas e finas, clavados e em forma de charuto; hifas espirais estão ocasionalmente presentes (Tan et al., 2020).

Trichophyton erinacei J.M.B. Sm. & Marples, 1966

Trichophyton erinacei foi descrito em 1966 por J.M.B. Sm. & Marples. É um membro do complexo *T. mentagrophytes*, um dermatófito zoonótico sendo um patógeno humano raramente isolado. É o dermatófito mais comum isolado em ouriços, com taxas de infecção de 20 a 47%. A manifestação clínica mais usual é inflamatória, com erupções pruriginosas na forma de pústulas em uma base eritematosa (Phaitoonwattanakij et al., 2019).

Em muitos casos, os ouriços podem ser portadores assintomáticos deste fungo e apresenta seu potencial para transmissão zoonótica. No entanto, a via de transmissão aos seres humanos muitas vezes não é clara, e algumas outras fontes de infecção cruzada indireta entre ouriços e humanos foram relatadas. O isolamento de *T. erinacei* foi relatado em outras espécies de animais, especialmente em cães de caça em países onde os ouriços estão presentes (Kromer et al., 2018).

Com as diferentes alterações de nomenclatura propostas, o agente etiológico da micose em ouriços foi descrito como *T. erinacei* var. *erinacei*, *T. erinacei*, *Arthroderma benhamiae* var. *erinacei* e *A. benhamiae*, dependendo do conceito considerado da espécie. Durante as últimas décadas, foram feitos progressos na sistemática moderna de dermatófitos e finalmente *T. erinacei* foi proposto como uma espécie distinta por Padhye e Charmichael (Abarca et al., 2017). Com base na região ITS, *T. erinacei* é uma espécie próxima, mas separada de *A. benhamiae* (Abarca et al., 2017).

A falta de consenso na definição de espécies de *T. erinacei* pode causar confusão na identificação de isolados clínicos, pois a mesma sequência pode ser identificada de maneira diferente, dependendo do banco de dados utilizado (Abarca et al., 2016). O sequenciamento da região ITS é realizado para definição e identificação da espécie (Kim et al., 2018).

Em meio SDA, à temperatura de +/- 28°C, com 14 dias de incubação, as colônias possuem crescimento rápido, geralmente brancas, pulverulentas, irradiando, áreas granulares, reverso da colônia normalmente amarelo brilhante (“limão”); microconídios alongados em forma de lágrima (2,5 x 4µm), macroconídios grandes claviformes multiszeptados (Kramer et al., 2018).

Trichophyton interdigitale Priestley, 1917

Trichophyton interdigitale foi descrito por Priestley, em 1917. É uma espécie estritamente antropofílica que pertence ao complexo *T. mentagrophytes*, que são frequentemente isoladas de *tinea unguium* e *tinea pedis* em todo o mundo (Hiruma et al., 2019). As cepas de *T. interdigitale* são responsáveis por ser a segunda causa mais frequente de infecções fúngicas superficiais em várias partes do corpo humano (Drira et al., 2014). Na prática clínica é frequente que os isolados antropofílicos aveludados obtidos a partir de seres humanos, encontrados principalmente em casos de *tinea unguium* e *tinea pedis* sejam nomeados de *T. interdigitale* (Zheng et al., 2020).

As variedades antropofílicas de *T. mentagrophytes*, bem como várias linhagens zoofilicas que foram previamente classificadas como *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* ou *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, não são geneticamente distinguíveis de *T. interdigitale* e foram, portanto, coletivamente conhecidas como *T. interdigitale* (Nenoff; Herrmann; Graser, 2007).

A identificação e o delineamento dos dermatófitos dessa espécie ainda permanecem difíceis, principalmente devido à variação fenotípica entre os isolados. *Trichophyton interdigitale* pode mostrar ampla variabilidade em suas características fenotípicas, incluindo a presença ou ausência de corpos ornamentais (hifas espirais) e o número e tamanho de macroconídios e microconídios. Essa espécie também demonstrou possuir polimorfismo genético (Frias-de-Léon et al., 2020).

Em muitos periódicos, a nomenclatura de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* é usada de forma intercambiável. No entanto, a distinção entre as duas espécies é bastante problemática devido a casos conhecidos de transmissão antroponótica de infecções por isolados de *T. mentagrophytes* e a ausência de correspondência direta entre a origem das linhagens, seus genótipos, características morfológicas e clínicas. Alguns estudos apoiados por procedimentos moleculares indicaram que os genótipos ainda podem estar correlacionados com quadros clínicos, localizações geográficas e resistência antifúngica. As regiões gênicas ITS e BT2 são usadas para definição das cepas (Pchelin et al., 2016).

Não obstante, a prevalência real dessas duas espécies intimamente relacionadas não é conhecida, além disso, a tipagem molecular de dermatófitos está disponível em poucos laboratórios em todo o mundo (Ahmadi et al., 2016).

As colônias dessas cepas geralmente se apresentam em meio SDA, incubadas a \pm 28°C por 14 dias como brancas, algodonosas ou com o crescimento granular, o reverso podendo variar do amarelado ao marrom-amarelado; apresentando microconídios

geralmente esféricos ($3 \times 4\mu\text{m}$), podendo ser semelhantes à cachos de uva; geralmente com os macroconídios grandes em forma de tacos. Além disso, *T. interdigitale*, produz colônias semelhantes às de *T. mentagrophytes*, dificultando ainda mais a identificação (Zhang et al., 2019).

Trichophyton mentagrophytes Blanchard, 1896

Trichophyton mentagrophytes foi descrito por Blanchard, em 1896. É um importante patógeno dermatofítico zoonótico, que causa infecção cutânea grave em humanos e outros animais em todo o mundo (Zhang et al., 2017). Na prática clínica e classificação atual, é comum que os isolados com o aspecto pulverulento, que também podem ser encontrados em casos clínicos que não sejam infecções de unhas e pés, como *tinea corporis* humana, além de dermatofitoses em animais, independentemente de sua origem, são categorizados como *T. mentagrophytes* (zoofilicos) (Zheng et al., 2020). Nos animais, a prevalência de *T. mentagrophytes* é alta, e o fungo geralmente causa infecções cutâneas graves (Zhang et al., 2014).

Trichophyton mentagrophytes e sua ramificação clonal [*T. interdigitale*] são excepcionais entre outras espécies de *Trichophyton* por possuírem um número significativo de genótipos da região ITS e, juntas, representam 34% da diversidade de gêneros (Taghipour et al., 2019).

As cepas de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* representam uma quantidade significativa de casos de dermatofitoses em todo o mundo. Esses dois dermatófitos formam um complexo de espécies e possuem vários genótipos da região ITS, permitindo identificação simultânea de espécies e tipificação de linhagens, ou seja, podemos inferir que a reação em cadeia da polimerase (PCR) não pode diferenciar as duas espécies, mas é possível com o sequenciamento de ITS do DNA fúngico (Taghipour et al., 2019).

Portanto, a tipificação de linhagens moleculares e a identificação de espécies podem ser realizadas pelas mesmas sequências de DNA. As diferenças nas fontes epidemiológicas e nos quadros clínicos entre genótipos particulares fornecem a base para o delineamento das espécies (Pchelin et al., 2016).

As colônias geralmente se apresentam em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), à temperatura de $\pm 28^\circ\text{C}$, com 14 dias de incubação como pulverulentas a flocosas, de

coloração creme a amarelada, com reverso podendo apresentar coloração amarelada ou marrom. Os microconídios são esféricos, sésseis, dispostos em cachos densos semelhantes a uvas ou ao longo das hifas ($3 \times 4\mu\text{m}$). As hifas espirais geralmente estão presentes. Os macroconídios possuem de 3 a 8 septos, lisos e de paredes finas, em forma de charuto (Ates et al., 2008; Ramaraj et al., 2017).

Essa estratégia morfológica (características macro e micromorfológicas) são insuficientes e inadequadas para diferenciar *T. mentagrophytes* das demais espécies que podem causar infecção em humanos. Portanto, para garantir a precisão da identificação, recomenda-se o uso de métodos moleculares combinado com análises morfológicas (Frías-De-León et al., 2020).

Trichophyton equinum Matruchot e Dassonville, 1898

Trichophyton equinum foi descrito por Matruchot e Dassonville, em 1898 e mais tarde redescrito por Gedoelst, em 1902. É um dermatófito zoófilo e geralmente responsável por infecções em cavalos. A prevalência em humanos é muito baixa e geralmente pode afetar veterinários (Gnat et al., 2019).

Embora seja uma espécie zoofílica, foi revelado que é filogeneticamente relacionado à espécie antropofílica *T. tonsurans*. Além disso, a proposta de introdução de um nome sinônimo para essas duas espécies foi justificada pela incapacidade de diferenciá-las com base em sequências da região ITS. Em contrapartida, apesar das semelhanças genéticas dessas duas espécies de dermatófitos, seus nichos ecológicos e a infecciosidade são bem distintos. Ademais, justifica-se considerar seu status taxonômico separado, uma vez que o tratamento e estratégias preventivas de infecções causadas por essas espécies são diferentes (Kandemir et al., 2019)

Rezaei-Matehkolaeei et al. (2012) demonstraram que as variações significativas interespecíficas entre *T. tonsurans* e *T. equinum* encontradas nas sequências de TEF1, ITS e BT2 são eficazes na diferenciação apropriada desses isolados.

Cultivadas em meio SDA, à temperatura de +/- 28°C, incubadas durante 14 dias, as colônias são suavemente flocosas de coloração creme ou bege, que pode se transformar numa pigmentação marrom avermelhada, especialmente na borda. O reverso geralmente

apresenta uma pigmentação de amarelo a alaranjado. Os microconídios podem ser ovóides a piriformes (3 x 4 μ m) (Woodgyer, 2004).

Trichophyton quinckeanum Quincke, 1886

Trichophyton quinckeanum foi descrito por Heinrich Irenäus Quincke em 1886. Ele foi o primeiro a descrever o microrganismo responsável por causar *favus* em animais não humanos, que era conhecido como *Achorion quinckeanum*. É um patógeno zoofílico, contudo as cepas de *T. quinckeanum* são isoladas de crianças e adultos, provenientes de lesões de *tinea corporis* e *tinea cruris*, principalmente. As fontes de infecções incluem pequenos roedores (ratos), cavalos e, notavelmente comum, gatos. A transmissão provavelmente se origina de roedores (camundongos) e atinge os seres humanos principalmente através de gatos (Uhrlaß et al., 2018).

Anteriormente referida apenas como subespécie (*T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*) *T. quinckeanum* constitui uma espécie distinta de acordo com a taxonomia atualizada dos dermatófitos. Camundongos e camelos são considerados seus reservatórios naturais, supõe-se que *T. quinckeanum* ocorra preferencialmente no Oriente Médio e relacionado às espécies zoofílicas. Há uma semelhança morfológica entre *T. quinckeanum* e *T. mentagrophytes*, assim, diferenciar as duas espécies é um desafio (Nenoff; Hermann; Graser; 2007).

Este dermatófito é considerado raro, com relatos muito esporádicos no mundo. Do ponto de vista taxonômico, os dois binômios (*T. quinckeanum*/ *T. schoenleinii*) sempre foram considerados como espécies diferentes, os isolados que representam esses dois táxons têm realmente diferentes sequências de ITS rDNA, que parecem ser específicos para cada um deles, sendo assim, a região ITS é a mais utilizada na identificação das cepas. Deve-se mencionar que existe uma inserção e eliminação de apenas 2 pares de bases entre *T. quinckeanum* e seu “parente” mais próximo, *T. schoenleinii*, assim estão separados filogeneticamente. São dois fungos patogênicos distintos, que provavelmente compartilham um grupo sapróbio com ancestral comum da espécie geofílica, a fase sexual *Arthroderma simii* (Beguin et al., 2012).

Quando cultivadas em meio SDA, à temperatura de +/- 28°C, incubadas durante 14 dias, as colônias de *T. quinckeanum* são caracterizadas por possuírem superfície granular,

quase aveludada, brancas, podendo originar elevações, enquanto o reverso geralmente pode desenvolver uma cor marrom-vermelho a vermelho-vinho. Subculturas podem exibir coloração roxa. Produz numerosos microconídios piriformes alongados (3 x 5 μ m) e às vezes macroconídios, que são multiseptados (3-8 septos), paredes finas, bem como clavados ou em forma de charuto. Hifas espirais são formadas em colônias mais antigas (Nenoff; Herrmann; Graser, 2007).

Complexo Trichophyton rubrum Graser et al. 2000

O complexo de espécies de *Trichophyton rubrum* foi validado por Graser et al. em 2000 e compreende fungos dermatofíticos antropofílicos comumente encontrados com distribuição mundial, sendo responsáveis pela maioria das dermatofitoses. Os membros do complexo geralmente têm fenótipos distintos na cultura e causam diferentes sintomas, apesar da alta semelhança do genoma, por essa similaridade genética foram incluídos no mesmo complexo (Su et al., 2019). Eram conhecidos anteriormente sob vários nomes tais como *T. circonvolutum*, *T. fischeri*, *T. fluviomuniense*, *T. glabrum*, *T. gourvili*, *T. kanei*, *T. kuryangei*, *T. megninii*, *T. pedis*, *T. raubitschekii*, *T. rodhainii*, *T. soudanense*, *T. violaceum* e *T. yaoundei*. No entanto, Gräser et al. (2000) notaram que as distâncias moleculares entre os táxons de dermatófitos antropofílicos eram surpreendentemente baixas e, por esse motivo, grande parte desses nomes eram sinônimos de *T. rubrum* ou *T. violaceum*, pois não havia variabilidade do DNA das cepas estudadas.

A validade dos táxons em torno do complexo para distinguir as espécies foi avaliada por uma combinação de métodos fenotípicos e moleculares. Baseado nos resultados do seqüenciamento multilocus, de Hoog et al. (2017) apresentaram uma visão geral, indicando que na filogenia, *T. violaceum* é bem semelhante geneticamente de *T. rubrum*. Gräser et al. (2000) avaliaram todos os táxons com material da amostra tipo existente próximo de *T. rubrum* por morfologia, métodos fisiológicos e moleculares, incluindo sequenciamento através da região ITS, e confirmaram apenas *T. rubrum* e *T. violaceum* como espécies aceitas no complexo. Todavia, dados mais atuais mostram a existência de três espécies no complexo *T. rubrum* (*T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. soudanense*) (Grigoryan et al., 2018).

As colônias do complexo *T. rubrum*, no meio SDA, à temperatura de +/- 28°C com 14 dias de incubação em seu isolamento primário geralmente são cotonosas e brancas, tornando-se aveludadas, com o reverso apresentando pigmentação de avermelhada a rosa-púrpura ou marrom. Algumas colônias podem apresentar coloração violeta forte, como as da espécie *T. violaceum*. Muitas vezes, a coloração no início do crescimento é amarela, escurecendo gradativamente até se tornar vermelha. Os microconídios geralmente são piriformes (2,5 x 4µm), clavados, estando dispostos ao longo das hifas ou em cachos. A esporulação pode ser rara ou abundante, dependendo da espécie. Geralmente, os cultivos primários produzem raros macroconídios (Yo et al., 2016).

Trichophyton rubrum Sabouraud, 1911

Trichophyton rubrum foi descrito em 1911 por Sabouraud. É um representante típico de fungos antropofílicos, agente etiológico da maioria das dermatofitoses em seres humanos (69,5% dos casos), e pelas infecções de *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea inguinalis*, *tinea manuum*, *tinea unguium* e *tinea pedis*. É a espécie predominante em lesões na pele e infecções de unhas em vários países do mundo, principalmente na Europa. Em adição às infecções superficiais, esta espécie também pode ser responsável por algumas infecções dérmicas profundas em pacientes imunocomprometidos, conduzindo a estudos baseados em mecanismos de patogênese para esclarecer essas infecções. A disponibilidade de dados de sequência de outros dermatófitos pode ajudar a delinear a relação evolutiva entre espécies clonais e caracterizar a sua patogenicidade individual (Zheng et al., 2020). O sequenciamento da região ITS é o mais realizado para identificação das cepas desta espécie (Su et al., 2019).

Em meio SDA, à +/- 28°C, com 14 dias de incubação, suas colônias possuem um rápido crescimento e esporulação abundante. Geralmente são brancas, algodonosas, com o reverso em tons escuros, como um rosa-púrpura, avermelhado ou marrom, esses tons mais escuros são possivelmente associados a maior atividade metabólica, levando a maior produção de amônio e pH alcalino Apresentam microconídios piriformes (2,5 x 4 µm), clavados em torno das hifas, podem apresentar macroconídios septados que lembram um charuto, mas são facilmente ausentes após repetidas subculturas, portanto, esse traço fenotípico tem valor limitado (Su et al., 2019).

Trichophyton schoenleinii Robert Remak, 1837

Trichophyton schoenleinii foi descrito em 1837 por Robert Remak. É um dermatófito antropofílico, que geralmente causa *tinea favosa*, um tipo de dermatofitose conhecido por formar escutúula amarela ao redor dos folículos capilares, sendo o único tipo de *tinea capitidis* que os pacientes podem manter durante toda a vida adulta. Esse tipo de doença costumava ser altamente prevalente em todo o mundo e levou a graves problemas sociais, mas declinou drasticamente e agora quase foi erradicada em grande parte do mundo. A infecção é relatada esporadicamente em partes da Europa Oriental, África e Ásia, em áreas menos desenvolvidas (Iwasa et al., 2019).

Poucos estudos forneceram dados sobre epidemiologia molecular e perfis deste fungo devido à sua prevalência limitada após os anos 50. Nos séculos 19 e 20, *T. schoenleinii* foi amplamente difundida na Eurásia, norte da África e nas Américas, como agente etiológico predominante da *tinea capitidis* (Li et al., 2013). O sequenciamento da região ITS é realizado para identificação das cepas da espécie (Iwasa et al., 2019).

Em meio SDA, à 28°C, com 14 dias de incubação, as cepas possuem colônias úmidas, cerebriformes, com crescimento lento. O verso e reverso da cultura mostram uma coloração cinza-amarelado a branco. Caracterizadas por possuírem hifas inchadas e semelhantes a chifres, não apresentando microconídios e macroconídios (Gao et al., 2018).

Trichophyton simii Pinoy, 1912

Trichophyton simii foi descrito por Pinoy em 1912. Anteriormente era designada como *Epidermophyton simii*, sendo posteriormente reduzida à sinonímia com *T. mentagrophytes*, e reconhecida 25 anos depois como uma espécie separada. É um dermatófito zoófilico onde causa lesões de dermatofitoses em animais como macacos, vacas, aves, guiné, babuínos, cães e gatos, podendo ocorrer no solo e raramente causar lesão em humanos (Boehringer et al., 1998).

A incidência de dermatofitoses devido ao *T. simii* é geralmente considerada limitada a áreas endêmicas, particularmente uma área da Índia. O patógeno também foi relatado na América do Sul, Europa e Oriente Médio. Esse microrganismo zoófilico pode

ser ocasionalmente recuperado de pacientes com *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea inguinalis* e *tinea unguium* (Beguin et al., 2013).

Contudo, a alta similaridade entre as características morfológicas de isolados atípicos de *T. simii* e de outros dermatófitos como *T. interdigitale* e *Arthroderma benhamiae* podem levar à identificação incorreta em muitos casos (Oyarzo et al., 2020). Para identificação precisa das cepas a região gênica ITS é utilizada para o sequenciamento (Ansari et al., 2016).

Quando cultivadas em meio SDA, à 28°C, com incubação de 14 dias, as suas colônias tem crescimento relativamente lento e geralmente apresentam coloração branca ou creme, com superfície plana que pode ser levantada no centro e características pulverulentas difundidas nas margens. O reverso pode apresentar cor de palha e com alguns dias ficar um tom de roxo claro ou rosada. Ocorrem microconídios piriformes (2-3 x 2-4 µm) e macroconídios lisos cilíndricos clavados, com 3 a 7 septos (Ansari et al., 2016).

Trichophyton soudanense Joyeux, 1912

Trichophyton soudanense foi descrito pela primeira vez por Joyeux em 1912. É um dermatófito antropofílico com uma área de distribuição principalmente na África. É considerado um dermatófito altamente contagioso exclusivamente de pessoa para pessoa (Albanese et al., 1995).

A origem geográfica das cepas é difícil rastrear devido ao aumento das viagens e migração de seres humanos. Desconsiderando os isolados dos países ocidentais, verificou-se que *T. rubrum* e *T. violaceum* têm distribuição global, enquanto *T. soudanense* é limitado à África. Contudo, uma prevalência crescente desses patógenos foi relatada em países europeus, incluindo a Itália (Grigoryan et al., 2018).

Trichophyton soudanense é geneticamente semelhante a *T. violaceum*, no entanto, fenotipicamente os patógenos diferem claramente (Nenoff et al., 2018). De Hoog et al. (2017) apoiaram *T. soudanense* como espécie e apresentaram uma cultura tipo, mas também observaram que as espécies podem ser indistinguíveis de *T. violaceum*. Ambas espécies compartilham os mesmos sítios predominantes de isolamento, ou seja, couro cabeludo e cabelos, mas apresentam diferenças pronunciadas na morfologia e mostram

diferentes distribuições geográficas. *Trichophyton violaceum* é relatado como um dos principais agentes causais de *tinea capitis* no Oriente Médio e nos países da África Oriental, *T. soudanense* é predominantemente observado nos países da África Ocidental, como Mali e Senegal. Juntamente com a migração humana, as duas espécies também são responsáveis por surtos de *tinea capitis* em vários países europeus. Particularmente, o status de *T. soudanense* como possível sinônimo de *T. violaceum* foi bastante debatido (Packeu et al., 2019).

Recentemente, Zhang et al. (2019) observaram que diferenças moleculares entre essas espécies eram surpreendentemente pequenas. Contudo, permanece o fato de que existe variação na predileção clínica, alterações morfológicas características, origem geográfica e marcadores microssatélites, enquanto a análise filogenética sugere que as relações entre essas espécies são mais complexas.

Os estudos filogenéticos com base nos dados de sequência da região ITS mostram as diferenças entre, *T. rubrum*, *T. violaceum* e *T. soudanense*. Baseado no sequenciamento do gene TEF1- α , há uma distinção entre *T. soudanense* e *T. violaceum*; em contraste, não é possível diferenciar *T. soudanense* e *T. rubrum*, apenas com o sequenciamento da região gênica ITS (Nenoff et al., 2018). Sendo assim, ainda são necessários mais estudos para elucidar alguns pontos da taxonomia desse complexo. Outras espécies frequentes do gênero não estão classificadas dentro de complexos, como *T. tonsurans*, *T. equinum*, *T. schoenleinii* e *T. simii* (Diongue et al., 2016).

Cultivadas em meio SDA, à 28°C, com 14 dias de incubação, as colônias geralmente são aveludadas, com coloração laranja-amarelada intensa, verrucosas, com hifas radiantes periféricas, o reverso na coloração laranja-amarelado e verrucoso. É comum a presença dos ramos em forma de cruz que se entrelaçam em feixes de hifas, o que dá às colônias a aparência de uma coroa radiante. Na microscopia é possível observar microconídios piriformes alongados (2,5 x 4 µm), macroconídios septados podem ou não serem encontrados (Grigoryan et al., 2018).

Trichophyton tonsurans Malmsten, 1845

Trichophyton tonsurans foi descrito pela primeira vez por Malmsten em 1845. É um fungo antropofílico emergente que é transmitido de pessoa para pessoa por contato

direto ou indiretamente através de fômites, sendo a principal localização de infecção o couro cabeludo, conhecido como o principal organismo causador de *tinea capitis*. É altamente infeccioso, com um tratamento difícil, mas provoca apenas respostas inflamatórias leves (Hiruma; Ogawa; Hiruma, 2015).

Descrito inicialmente como uma espécie típica dos países da bacia do Mediterrâneo, como Espanha, Portugal, sul da França, Itália e Grécia; hoje, no entanto, é considerado um microrganismo de distribuição mundial, sendo frequente nos EUA, Canadá e o México como agente da *tinea capitis*. Além disso, é o patógeno mais comum no Reino Unido e considerado como um patógeno emergente em várias regiões do mundo, causando surtos de dermatofitoses (Zheng et al., 2020). É considerado o principal organismo causador de *tinea corporis* e *tinea capitis* na Europa Ocidental (Sato et al., 2019).

Na América Central e na América do Sul, isolamentos frequentes têm sido descritos nos últimos anos, principalmente em crianças. No Chile, desde 2012 a circulação deste agente provavelmente tem sido influenciada por um aumento da imigração nos últimos anos (Cruz et al., 2019).

As regiões NTS do rDNA ou IGS são frequentemente usadas para rastrear infecções e identificar fontes comuns de infecção causadas por *T. tonsurans*, sendo a região ITS sequenciada para identificação das cepas (Sakata et al., 2018).

As características das colônias dessa espécie são bastante variáveis; cultivada em meio SDA, à temperatura de 28°C, com incubação de 14 dias, sua topografia é aveludada a pulverulenta, sulco radial ou irregular, de cor branca a acinzentada, às vezes com um centro verde-oliva ou rosa; a superfície central pode ser elevada ou umbilicada; o reverso pode ser na cor vermelho-mogno, marrom avermelhado, amarelo ou marrom e às vezes pode difundir um pigmento avermelhado escuro no meio. Em microscopia, microconídios abundantes de tamanho variável, sésseis ou em pedúnculos curtos que são produzidos em grande número, às vezes globosos e também piriformes (2,5-3,5 x 4-4,5µm). Os macroconídios, quando presentes, são variáveis, com septos transversais contendo de 2 a 6 septos, cilíndricos ou em forma de charuto; clamidospores terminais e intercalados são abundantes (Mochizuki et al., 2013).

Trichophyton violaceum Sabouraud, 1902

Trichophyton violaceum foi descrito pela primeira vez por Sabouraud em 1902. É um dermatófito antropofílico, endêmico na África e recentemente um emergente patógeno na Europa, sendo o principal agente causador da *tinea capitis*. É um organismo em expansão devido aos recentes casos na Europa (Wiegand et al., 2016).

A maioria dos nomes de espécies no complexo *T. rubrum* foi posteriormente introduzido para descrever variações fenotípicas, ou seja, as espécies do complexo apresentam grandes diferenças fenotípicas, assim foram separadas principalmente devido à essa diversidade. Entretanto, a diferença entre os locais de infecção preferidos e a diferença morfológica concomitante entre *T. rubrum* e *T. violaceum* permaneceram despertando curiosidade (Packeu et al., 2019). Os genes ITS e BT2 geralmente são sequenciados para definição e identificação da espécie (Zhan et al., 2018).

Em meio SDA, à 28°C, com 14 dias de incubação as colônias de *T. violaceum* possuem crescimento muito lento, ceroso, amontoado, possuindo coloração violeta bem forte. As culturas frequentemente se tornam pleomórficas, formando setores brancos, as hifas de *T. violaceum* são amplas, tortuosas e distorcidas, sem esporulação e com conídios semelhantes a clamidosporos em culturas mais antigas. possuindo raros microconídios piriformes (2,5 x 4 µm) em algumas culturas (Morales et al., 2019).

3.5 Dermatofitoses

As dermatofitoses são doenças de importância global, sendo a micose superficial mais difundida, causada por fungos queratinolíticos patogênicos chamados dermatófitos com relevância na micologia médica humana e veterinária. As dermatofitoses são geralmente chamadas popularmente de “tinhas”, termo que se originou da expressão em latim *tineas*, nomenclatura introduzida ainda no primeiro século D.C por médicos da escola de Galeno para referir lesões do couro cabeludo, incluindo a do tipo *favosa*, uma *tinea* inflamatória do couro cabeludo que já havia sido descrita por Celsus e denominada de kerion celsi (Kwon-Chung; Bennett, 1992; Zaitz et al., 1998; Lacaz et al., 2002).

As dermatofitoses são classificadas de acordo com o sítio anatômico comprometido pela lesão, sendo *tinea capiti* (couro cabeludo), *tinea faciei* (face), *tinea corporis* (corpo),

tinea cruris (virilha), *tinea pedis* (pé), *tinea unguium* (unha), *tinea barbae* (barba) e *tinea manuum* (mão) (Baranová et al., 2018).

Nas últimas duas décadas, foi constatado um aumento na incidência de dermatofitoses em humanos como resultado de problemas socioeconômicos, viagens internacionais em larga escala, imigração a países tropicais, e contato com animais, principalmente de estimação. A idade avançada, uso de medicamentos imunossupressores, agentes citotóxicos e quimioterapias são fatores predisponentes para o aumento da morbidade das dermatofitoses em humanos. Outros fatores podem ser relacionados ao estilo de vida, ocupação ou condição imunológica. A literatura mostra que a prevalência de infecções fúngicas varia de acordo com a localização geográfica, condições ambientais, fatores culturais e socioeconômicos (Baranová et al., 2018).

As reações a uma infecção dermatófita podem variar de leve a grave como consequência das reações do hospedeiro aos produtos metabólicos do fungo, a virulência da cepa, a localização anatômica da infecção e fatores ambientais locais (Kustark, 1989; Wagner; Sohnle, 1995). A infecção por uma espécie geofílica geralmente é altamente inflamatória, mas rapidamente resolvida, uma infecção por um zoófilo é moderadamente inflamatória e autolimitada, enquanto os dermatófitos antropofílicos causam infecções não inflamatórias e crônicas (Baert et al., 2019).

Aproximadamente 20–25% da população mundial (em torno de 1,7 bilhão) é afetada por micose superficial com preponderância de dermatofitoses, principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Dermatofitose é uma das doenças infecciosas humanas transmissíveis mais comuns, causando considerável destruição irreversível à pele, cabelos e unhas, causando morbidade considerável, se não forem diagnosticados e tratados rapidamente (Gawdzik et al., 2019; Sanguino; Jarros; Negri, 2019). *Trichophyton rubrum* seguido por *T. interdigitale* foram descritas como as espécies predominantes isoladas nos casos de dermatofitoses em todo o mundo (Brown et al., 2012).

Devido à natureza zoonótica de algumas dermatofitoses, uma abordagem interdisciplinar, envolvendo dermatologistas, pediatras, médicos da atenção básica e veterinários, é fundamental para reduzir sua propagação. Seu controle requer identificação adequada de agentes etiológicos e sua prevalência para a prescrição de tratamento, principalmente devido à sua natureza crônica. A via de infecção é vital para a terapia antifúngica específica e para a prevenção de uma maior disseminação ao ser humano e/ou outros animais (Andrade & Rossi, 2019).

As apresentações clínicas das dermatofitoses, como alopecia multifocal, descamação e lesões circulares são frequentemente semelhantes às de outras doenças de pele, o que torna o curso do tratamento altamente incerto. Consequentemente, o isolamento e identificação de dermatófitos envolvidos nas dermatofitoses são essenciais para prescrever tratamentos específicos para cada espécie. Além disso, infecções por fungos não dermatófitos podem não responder à terapia padrão usada para dermatofitoses. Vários fungos não dermatófitos foram isolados, como agentes infecciosos únicos em muitos casos com manifestações clínicas semelhantes as dermatofitoses que não respondeu aos múltiplos tratamentos com terbinafina e itraconazol (Begum et al., 2020).

Epidemias e surtos em larga escala de dermatofitoses inflamatória devido a *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* ocorreram entre as tropas americanas no Vietnã durante 1966-1969. A fonte dessa epidemia foi atribuída aos ratos presos perto dos alojamentos do exército. As recentes epidemias e surtos foram causados pelo genótipo VIII de *T. mentagrophytes*, na Índia, que tem sido relatados por Nenoff e cols. e dois artigos mencionaram infecção genital devido ao genótipo VII de *T. mentagrophytes* da Suíça e da Alemanha (Costa et al., 2002).

As epidemias de dermatofitoses atuais em diferentes regiões geográficas do mundo são devidas ao complexo *T. mentagrophytes* e *M. canis*. Até recentemente, pensava-se que as espécies antropofílicas são responsáveis pela maior parte das epidemias, mas às vezes os humanos infectados por zoófilos permanecem com a infecção, levando a pequenos surtos e epidemias autolimitantes. Em alguns dos surtos, pessoa a pessoa (antropofílica) a transmissão foi implicada por contato direto ou por fomites contaminados (Baert et al., 2019).

3.6 Epidemiologia

A incidência de dermatofitoses tem aumentado em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. A *tinea capitis*, uma infecção do couro cabeludo, é uma das dermatofitoses mais comuns e representa um importante problema de saúde pública entre crianças, principalmente na África e nas regiões do Caribe. As estatísticas epidemiológicas para os dermatófitos são difíceis, pois os esquemas taxonômicos estão mudando constantemente (Salehi et al., 2018). Por exemplo, as epidemias anteriores geralmente eram devidas a dermatófitos antropofílicos e hoje em dia, os dermatófitos zoófilos também são responsáveis por muitos surtos (Araya; Tesfaye; Gente, 2020).

Antes de 1985, o patógeno dominante de *tinea capititis* era *T. schoenleinii*; depois disso, houve uma mudança de dominância antrofílica a zoofílica na maioria das áreas da China, e o patógeno dominante se tornou *Microsporum canis* (Brilhante et al., 2000). Na província de Guangdong, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. violaceum* foram os mais comuns patógenos responsáveis a *tinea capititis* entre 2004 e 2014 (Silva et al., 2019). *Trichophyton tonsurans* é o patógeno mais comum nos Estados Unidos, no Canadá e no Reino Unido, enquanto na China era uma causa rara e foi relatado pela última vez em Guangdong em 2007 (Salci et al., 2011).

A distribuição desses fungos varia consideravelmente, dependendo dos fatores epidemiológicos e da área geográfica. *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* são distribuídas em todo o mundo. Outras espécies têm uma restrição geográfica parcial, como *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. tonsurans* estão mais distribuídas na Eurásia e na África; *T. soudanense*, distribuída na África (Thakur & Kalsi, 2019).

Cada país possui espécies características, com prevalência e formas clínicas de apresentação que podem apresentar variações ao longo do tempo. A literatura cita alguns fatores como os principais responsáveis por essas variações na epidemiologia dos dermatófitos, como a localização geográfica, assistência médica, imigração, clima (temperatura, umidade, vento), superlotação, cultura de higiene ambiental, conscientização sobre dermatófitos, idade dos indivíduos, higiene e condições socioeconômicas. Crianças com faixa etária entre 4 e 16 anos de idade correm um maior risco devido ao maior contato com fontes diferentes e à quantidade inadequada de ácidos graxos inibidores de fungos que são sintetizados, assim predispõe-os a infecções dermatofíticas (Araya; Tesfaye; Fente, 2020). Podemos inferir que as diferenças na distribuição de casos positivos de dermatofitoses entre ambos os sexos são variáveis em todo o mundo (Silva-Rocha; de Azevedo; Chaves, 2017).

No Chile, nas últimas décadas, mudanças foram constatadas, tanto em frequência como nas apresentações clínicas de infecções causadas pelo gênero *Microsporum* e *Epidermophyton*. Entre as espécies de *Trichophyton*, *T. rubrum* é a mais frequente nas diferentes dermatofitoses relatadas na maioria dos países, incluindo o Chile; no entanto, *T. tonsurans* é considerado um agente emergente em várias regiões do mundo, principalmente em países da África. Na América do Sul, a circulação desse agente foi descrita em vários países, nas dermatofitoses de crianças e adultos (Gawdzik et al., 2019).

Na maioria dos surtos, a principal localização é no couro cabeludo, mas há estudos que o local mais frequente é a face, seguido pelos membros superiores e couro cabeludo. A seletividade com que diferentes espécies de dermatófitos afetam as estruturas queratinizadas é devido ao fato da presença de queratinases e enzimas proteolíticas específicos para cada um deles. Em um estudo europeu analisando a epidemiologia de micose superficial, observou-se que *T. rubrum* foi a espécie frequentemente isolada (Silva-Rocha; de Azevedo; Chaves, 2017).

Em alguns países da América do Sul como na Argentina, o sítio anatômico mais frequente é a unha, seguido do couro cabeludo e *T. rubrum* é relatada como a espécie mais frequentemente isolada (Mazza et al., 2017). Estudos realizados na África, Ásia e América do Sul descrevem uma alta incidência de onicomicoses causadas por dermatófitos em pacientes acima de 50 anos (Silva-Rocha; de Azevedo; Chaves, 2017).

Na região Nordeste do Brasil foi realizado um estudo em que a pele glabra foi o sítio anatômico mais frequente no acometimento de lesões, seguido do couro cabeludo, assim como *T. rubrum* foi a espécie patogênica mais prevalente, seguido de *T. tonsurans*; *T. rubrum* se apresentou como mais frequente também na região Sul do Brasil, seguido de *T. interdigitale* (Silva-Rocha; de Azevedo; Chaves, 2017). Podemos inferir que temos uma epidemiologia diferente nas dermatofitoses em estudos realizados nas regiões Sul e Sudeste do Brasil. Na região Nordeste, diferente das regiões Sul e Sudeste observou-se alta incidência de *T. tonsurans*, demonstrando claramente peculiaridades em termos de agentes etiológicos da distribuição das dermatofitoses em uma grande da população do país (Brilhante et al., 2000).

Devemos considerar que quando uma espécie é introduzida em uma população anteriormente não exposta a esse agente, pode causar infecções com manifestações raras ou previamente conhecidas. O diagnóstico etiológico das dermatofitoses muitas vezes é complexo, dificultando na orientação para o tratamento antifúngico e estudos epidemiológicos (Silva et al., 2018).

Devido a constantes mudanças demográficas, migrações e modificações na qualidade de vida das populações, é necessário determinar prováveis alterações na frequência de dermatófitos e outras espécies de importância clínica que podem ser introduzidas em uma região e afetar a população em geral (Cruz et al., 2019).

Por volta dos anos de 2017 e 2018, a Índia testemunhou uma mudança na epidemiologia dos dermatófitos. Anteriormente, *T. rubrum* era considerada a espécie

predominante. Em meados dos anos de 2014 e 2015 *T. mentagrophytes* foi relatada como uma tendência crescente em vários estados do norte da Índia, podendo ser devido ao caso da existência de muitos roedores e macacos, que podem ser possivelmente associados como fonte ou agentes para a disseminação da infecção por *T. mentagrophytes* (Thakur e Kalsi, 2019).

A distribuição das espécies patogênicas e os locais anatômicos predominantes de infecção mudam com o tempo devido aumento da migração e mudanças no estilo de vida, bem como varia entre continentes, zona climática, faixas etárias. Condições socioeconômicas melhoradas, envelhecimento da população e assistência médica com acesso a medicamentos antimicrobianos, antifúngicos e imunossupressores contribuiu para uma lenta, mas inevitável mudança na epidemiologia. A ocorrência de uma vasta gama de dermatomicoses destaca a importância do monitoramento das mudanças em curso na epidemiologia (Gawdzik et al., 2019).

A maioria dos estudos sobre epidemiologia de dermatófitos foram baseados em métodos fenotípicos e tradicionalmente, a instabilidade taxonômica entre os dermatófitos dificultavam a análise de dados sobre todos os aspectos das infecções de alguns isolados. Os fungos não dermatófitos estão emergindo como importantes causas de dermatofitoses, justificando a necessidade de mais estudos epidemiológicos intensivos com conceitos em saúde pública (Gawdzik et al., 2019).

3.7 Diagnóstico

Classicamente, o diagnóstico das dermatofitoses é baseado em investigação de dados clínicos e métodos laboratoriais para detecção, em espécimes biológicas, de estruturas fúngicas ao exame direto e identificação do agente etiológico em meio de cultura (Brilhante et al., 2005).

O isolamento seguido pela identificação de dermatófitos das amostras clínicas foi considerado um método padrão ouro para fins de diagnóstico, mesmo as cepas demorando muito tempo para crescer em cultura e esporular (Begum et al., 2020). Um dos principais desafios com o diagnóstico da cultura é que as características morfológicas dos fungos, essenciais para a identificação das espécies, nem sempre são evidentes e que a

diferenciação em particular de espécies estreitamente relacionadas como *T. tonsurans*, *T. interdigitale* e *T. mentagrophytes* é bastante difícil (Kupsch & Graser, 2019).

O diagnóstico convencional das dermatofitoses envolve as técnicas facilmente disponíveis como o crescimento em cultura e identificação morfológica do fungo ou a detecção de estruturas fúngicas pela microscopia direta de amostras clínicas. Embora o diagnóstico por cultura e microscopia do material biológico seja adequado para isolados recentes, é difícil manter e reproduzir a referência das cepas para padronização devido à rápida degeneração das culturas. A microscopia direta da cultura tem alta sensibilidade, mas falha em fornecer identificação de gênero ou espécie (Jesen & Arendrup, 2012). Além disso, essas técnicas convencionais demandam muito tempo para chegar a um diagnóstico, e a precisão dos resultados depende do conhecimento da equipe profissional. O isolamento desses fungos na cultura requer várias semanas até esporular sendo muitas vezes complicado devido ao crescimento de fungos contaminantes normalmente presentes na pele (Mochizuki; Takeda; Anzawa, 2016).

Um outro problema quanto à limitação da microscopia direta é que, sendo relativamente inespecífico, pode detectar a presença de hifas, mas não consegue diferenciar entre as espécies de dermatófitos ou de fungos não dermatófitos. Além disso, a identificação de dermatófitos baseada na cultura é limitada por uma alta taxa de falsos-negativos, em um número considerável de casos (5–15%). Uma outra desvantagem é a dificuldade de identificação devido a similaridades morfológicas entre diferentes espécies ou polimorfismos mostrados pelos dermatófitos, o que requer técnicas sensíveis para o diagnóstico (Zanardi et al., 2008).

Os fatores como semelhanças morfológicas entre espécies fúngicas e esporulação limitada ou falta de esporulação torna a maioria dos dermatófitos não identificados pelos métodos convencionais clássicos (Peres et al., 2010).

Devido à demora no diagnóstico e baixa acurácia na identificação de dermatófitos pelos métodos convencionais, as técnicas moleculares foram introduzidas no diagnóstico, as quais propiciam identificação precisa e rápida dos dermatófitos para administração de terapia antifúngica específica, reduzindo os custos relacionados ao tratamento realizado de forma empírica, que evite a automedicação inespecífica e sem prescrição médica (Tartor; Hashem; Enany, 2019).

O diagnóstico rápido reduz os inconvenientes causados à pacientes devido ao atraso no diagnóstico e ao tratamento prolongado. Com uma única molécula inicial em uma

amplificação por PCR com 30 ciclos, aproximadamente 0,5 bilhões de cópias de DNA são criadas. Esse exponencial de duplicação torna a PCR uma tecnologia extremamente sensível para identificação do agente, a partir da cultura (Kupsch & Graser, 2019).

Assim, como os ensaios de PCR modernos tem demonstrado sensibilidade e especificidade muito mais altas no diagnóstico das dermatofitoses em relação aos métodos convencionais, os pesquisadores se tornaram severamente pessimistas em relação ao status de padrão ouro dado aos métodos convencionais (Santos; Coelho; Nappi, 2002).

Um rápido diagnóstico e identificação precisa de dermatófitos ajudam no manejo bem-sucedido das dermatofitoses. A identificação de dermatófitos ao nível específico determina a escolha dos antifúngicos mais adequados para o tratamento e ajuda a rastrear fontes de infecção, ajudando evitar a reinfecção, investigação e controle de epidemias (Ebrahimi et al., 2019).

As técnicas moleculares avançadas empregadas no diagnóstico das dermatofitoses são PCR convencional ou PCR em tempo real (RT-PCR) para DNA extraído de amostras clínicas. Em geral, os métodos de PCR em tempo real são mais rápidos, com uma menor contaminação e principalmente mais caro, enquanto os métodos convencionais de PCR incluem a etapa pós-PCR separada e, portanto, são mais complexos e demoram mais para serem executados. São também mais suscetíveis à contaminação, mas com um menor custo. Mesmo após a aplicação dos agentes antifúngicos tópicos, a PCR tem a capacidade de identificar células não viáveis com ácidos nucléicos intactos (Abastabar et al., 2013).

Além dos métodos baseados em ácidos nucléicos para detecção de dermatófitos diretamente da amostra clínica, existem outros métodos que podem ser empregados para obter a identificação de dermatófitos, superando assim as limitações da identificação fenotípica (Sharma et al., 2017).

Como a maioria das infecções fúngicas é causada por dermatófitos, sua detecção rápida e sensível é de grande importância. Os métodos de diagnóstico molecular oferecem uma identificação significativa mais rápida das dermatofitoses em torno de 24h-72h. Na maioria dos casos, fornecem a identificação direta de espécies, a partir da cultura do fungo para tratamento direcionado, afim de evitar antifúngicos desnecessários para o tratamento, além da toxicidade, auxiliando também nas finalidades epidemiológicas (Gordon et al., 2016).

Os métodos de diagnóstico molecular estão se tornando amplamente acessíveis com uma alta sensibilidade, especificidade e tempos de resposta superiores aos métodos convencionais (Drira et al., 2014).

Embora todos os métodos moleculares de diagnóstico de dermatófitos sejam muito sensíveis comparados aos métodos convencionais, eles mostram diferenças consideráveis em sensibilidade e especificidade entre si. Assim, há a necessidade de desenhos de estudos que não só comparem ensaios moleculares com diagnósticos convencionais, mas também faça uma comparação entre diferentes diagnósticos moleculares para desenvolver uma abordagem molecular ideal, rápida, econômica e que envolva um menor esforço técnico para diagnóstico confiável das dermatofitoses (Begum et al., 2020).

3.8 Susceptibilidade antifúngica e tratamento

Para orientar a escolha do tratamento de um agente antifúngico apropriado, o Comitê Clínico e Laboratory Standards Institute (CLSI) introduziu diretrizes para o teste de suscetibilidade antifúngica (AFST) para dermatófitos. Pontos de interrupção clínicos (CBPs), que são baseados em informações derivadas de estudos clínicos, ajudam na previsão da resposta para tratamento. No entanto, dependem de vários fatores, como CIM (Concentração Inibitória Mínima) do medicamento e resultado do tratamento em estudos clínicos. Até o momento não há pontos de interrupção clínicos estabelecidos para espécies de *Trichophyton* (Shaw et al., 2020). A falta de pontos de corte clínicos e/ou valores de corte epidemiológicos (ECOFF) dificulta a aplicação clínica de dados de concentração inibitória mínima obtidos de vários métodos não padronizados (Siopi et al., 2021).

O tratamento das dermatofitoses foi aprimorado consideravelmente nas últimas décadas, após a introdução de antifúngicos orais, como azólicos e anfotericina B. No entanto, esses medicamentos têm sucesso limitado porque os fungos frequentemente desenvolvem resistência aos medicamentos, resultando em recorrência quando aplicados em várias formulações, principalmente tópicas (Song et al., 2018).

Por muitos anos, a griseofulvina foi o único agente antidermatofítico sistêmico aprovado, contudo, este não é amplamente utilizado devido a resistência dos isolados de dermatófitos à griseofulvina, bem como à existência de cepas com níveis mínimos elevados de concentração inibitória (Singh et al., 2019).

Antifúngicos orais e tópicos estão disponíveis para o tratamento das dermatofitoses; os tratamentos orais com itraconazol e terbinafina são mais eficazes, mas mostram efeitos colaterais adversos, principalmente se o tratamento for por um período prolongado. Por outro lado, antifúngicos tópicos como alilaminas e azólicos, incluindo spray, pomada, pó, creme, são principalmente recomendados para aplicações limitadas e lesões superficiais, bem como para pacientes do sexo feminino durante a gravidez e lactação. As formulações orais são bem toleradas e são usadas como suporte para tratamento sistêmico (Song et al., 2018; Pinto et al., 2019).

Com algumas exceções, os medicamentos antifúngicos comumente usados para tratar as dermatofitoses visam a via biossintética do ergosterol. Imidazólicos como econazol e triazóis como o itraconazol inibem a lanosterol 14 α - desmetilase, o que leva ao acúmulo de precursores de esterol resultando na alteração da estrutura e função da membrana plasmática. Por outro lado, alilaminas como a terbinafina são inibidores da esqualeno epoxidase (SQLE), uma enzima chave na via biossintética do ergosterol. Esta inibição resulta no acúmulo de esqualeno, que é tóxico para os fungos (Yamada et al., 2017). A terbinafina, é o medicamento de primeira linha utilizado em infecções por *Trichophyton* spp. devido ao seu efeito clínico estável e baixa taxa de recorrência, podendo ser administrado por via oral e tópica (Bortoluzzi et al., 2023; Haghani et al., 2023).

Os antifúngicos imidazólicos (cetoconazol, miconazol) e triazólicos (fluconazol, itraconazol) foram usados para tratamento das dermatofitoses por muitas décadas e ainda são comumente usados, contudo foi relatada resistência de cepas de espécies de *Trichophyton* aos azólicos; dentre os azólicos, cetoconazol, itraconazol, sertaconazol e clotrimazol ainda apresentam uma boa atividade *in vitro*, mas não são utilizados em lesões extensas, para as quais terbinafina é a terapêutica de escolha (Rudramurthy et al., 2018). Além disso, a eficácia terapêutica também pode ser reduzida porque as infecções geralmente estão associadas a alta recorrência (Lima et al., 2017).

Azólicos estão entre os agentes antifúngicos mais comumente usados e a exposição repetida a esses medicamentos foi descrita como responsável pelo aumento de dermatófitos resistentes aos azólicos (Begum & Kumar, 2020).

O tratamento usado para *tineas* causadas por *T. mentagrophytes* lato sensu é, em geral, eficaz contra todos os membros do complexo, itraconazol e terbinafina são usados no tratamento dessas infecções que são causadas principalmente por cepas de *T. interdigitale* e *T. rubrum* há mais de 20 anos. No entanto, foi relatado um aumento no

número de casos causados por cepas de *T. interdigitale* resistentes à terbinafina, que é o farmaco de escolha (Frías-De-León et al., 2020). Para as dermatofitoses causadas por isolados do complexo *T. rubrum*, os azólicos itraconazol e voriconazol apresentaram boa atividade em alguns estudos, quando comparados aos outros azólicos (Intra et al., 2019).

Atualmente, a terbinafina tem sido amplamente utilizada na terapia de infecções por dermatófitos, sendo considerado o agente antifúngico mais eficaz nas dermatofitoses causadas por espécies de *Trichophyton* (Yamada et al., 2017; Rudramurthy et al., 2018). No entanto, apesar de terem sido raramente relatadas recaída e falha no tratamento, a literatura mostra que um número de isolados clínicos tem sido resistente a esse antifúngico (Yamada et al., 2017; Rudramurthy et al., 2018). Agentes antifúngicos como griseofulvina e derivados azólicos podem ter pouco uso no tratamento de dermatofitoses como resultado do desenvolvimento de resistência antifúngica, duração prolongada do tratamento e efeitos colaterais (Pereira; Mendes; Lima, 2013).

A automedicação desenfreada com combinações inadequadas de medicamentos levou à resistência e à falha frequente do tratamento. A tendência crescente de resistência entre os dermatófitos, leva a respostas ineficazes e recidivas frequentes, sendo este motivo de grande preocupação; a resistência tem sido atribuída a tratamentos inadequados com cremes combinados a esteróides, dosagens inadequadas de antifúngicos e mudanças no estilo de vida (Singh et al., 2019). Pode-se afirmar que a atividade antifúngica é variável, devido à fraca adesão ao tratamento pelo paciente, diminuição da captação de drogas, biodisponibilidade de medicamentos, alterações fenotípicas e genotípicas responsáveis pelos mecanismos de resistência (Intra et al., 2019).

A resistência de infecções dermatofíticas aos antifúngicos tem sido relatada (Singh et al., 2019). A resistência antifúngica em muitos fungos também é mediada pela super expressão de genes que codificam transportadores multidrogas. Apesar da disponibilidade de agentes antifúngicos eficazes contra os dermatófitos, a incidência de infecções, reinfecção e falhas no tratamento estão aumentando (Yamada et al., 2017).

Para alcançar um tratamento adequado e melhor prognóstico, além de estudos epidemiológicos, é importante realizar a identificação do fungo em nível específico para que a sensibilidade aos antifúngicos seja realizada, sendo importante pois ajuda a determinar a escolha de medicamentos para dermatofitoses (Singh et al., 2019; Frías-De-León et al., 2020).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das cepas

Foram obtidas 61 cepas da coleção de culturas URM sediada na Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil. Sendo 11 cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, 26 de *Trichophyton rubrum*, 23 de *Trichophyton tonsurans* e uma de *Trichophyton concentricum*. Essas cepas estavam preservadas principalmente sob óleo mineral (Sherf, 1943) e água (Castellani, 1939). As cepas foram reativadas de acordo com as instruções da URM e cultivadas em placas de Petri contendo Sabouraud Dextrose Agar (SDA). As cepas utilizadas neste estudo foram obtidas de uma variedade diversificada de substratos no Brasil.

4.2 Reativação

As culturas preservadas foram reativadas com a transferência de um fragmento para caldo glicosado e mantidas à temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, após oito dias de crescimento, os fungos foram transferidos para o meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) contido em tubos de ensaio, mantidos na mesma temperatura para estudos quanto à pureza e autenticação taxonômica.

4.3 Análise morfológica

Para as análises macro e micromorfológicas das 61 cepas de *Trichophyton*, as culturas foram cultivadas em SDA e incubadas a 28°C e 37°C por 14 dias. A cor, a aparência e a pigmentação das colônias foram registradas. O exame microscópico foi feito usando colônias cultivadas em SDA, e as lâminas foram preparadas usando lactofenol de algodão azul para visualização de micélios e estruturas reprodutivas.

4.4 Análise fisiológica

Para determinação das características fisiológicas foram observadas a atividade ureásica. O meio de ágar de ureia foi preparado com base de ágar de ureia (Oxoid, Hampshire, Reino Unido). O meio foi autoclavado e resfriado a 50°C e 50 mL de solução de uréia a 40% (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) foram adicionados assepticamente ao meio esterilizado. Culturas de *Trichophyton* foram inoculadas em tubos esterilizados e

incubadas a 28 °C. As reações de cor foram registradas após cinco dias. Os tubos amarelo e rosa foram classificados como negativos e positivos, respectivamente.

Para a prova da caseína, teste de requerimentos vitamínicos, culturas de *Trichophyton* foram inicialmente suspensas em solução salina 0,85%, e a concentração final comparada com o padrão de turbidez 2 McFarland. Dessa suspensão, 2 mL foram distribuídos na superfície do meio ágar caseína base em placas de Petri e incubados durante 14 dias a 28 °C no escuro. Após o período de incubação, foi feita uma verificação comparativa com base no crescimento fúngico e classificado como maior (4+) e menor (1+) de acordo com o tamanho da colônia.

4.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

Colônias cultivadas em SDA por 14 dias a 28°C foram usadas para extração de DNA seguindo o protocolo do fabricante para o Wizard Genomic DNA Purification Kit. Os primers ITS1/ITS4 (White; Bruns; Taylor, 1990) e Bt2a/Bt2b (Glass & Donaldson, 1995) foram usados para amplificar a região ITS rDNA e parte do gene TUB2 das cepas, respectivamente.

As amplificações (análises de PCR) foram executadas utilizando a enzima Go Taq Master Mix (6,25 µL), os primers (0,5 µL), água livre de nuclease (4,25 µL) e as amostras de DNA (1 µL) totalizando um volume de 12,5 µL. Para os ciclos de amplificação as condições foram as seguintes: 6 min de pré-incubação inicial a 94°C, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, consistindo na desnaturação; logo após, o anelamento a 58°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados sendo utilizada a enzima Exosap illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e posteriormente sequenciados na plataforma de sequenciamento do LABCEN/CCB, na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). As instruções do fabricante para o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 foram usadas para o sequenciamento do amplicon usando os mesmos conjuntos de primers. A montagem e edição das sequências foram realizadas e posteriormente depositadas no GenBank.

4.6 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas utilizando as regiões ITS e beta-tubulina 2-exon (TUB2) com 61 cepas URM de *Trichophyton* e 18 sequências de referência, três de cada uma das seguintes espécies: *T. rubrum*, *T. quinckeanum*, *T. concentricum*, *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*, e duas sequências de referência do grupo externo: *Nannizzia gypsea* (CBS 146.66) e *Epidermophyton floccosum* (CBS 457.65). As sequências foram editadas utilizando o software MEGA v.11.

A análise filogenética foi realizada utilizando o método Neighbour-Joining com o modelo Kimura de 2 parâmetros, distribuição gama (G) ou opções de taxa uniforme e 1000 réplicas de bootstrap. As distâncias entre pares foram estimadas utilizando a abordagem de Máxima Verossimilhança Composta e foram eliminadas as posições com menos de 95% de cobertura do local, ou seja, aquelas com menos de 5% de lacunas de alinhamento. Foram permitidas bases ambíguas em qualquer posição (opção de exclusão parcial) ou todos os sítios foram utilizados na análise (usando a opção todos os sítios). A topologia com o valor de log-verossimilhança superior foi selecionada.

4.7 Teste de susceptibilidade antifúngica

O teste de susceptibilidade *in vitro* das cepas de *Trichophyton* à terbinafina e ao itraconazol foi realizado pela técnica de microdiluição em caldo seguindo o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Para o teste, as culturas de *Trichophyton* foram cultivadas no meio Batata Dextrose Ágar (BDA) durante 21 dias à 35°C. As concentrações finais dos antifúngicos variaram de 0,03 a 16 µg/mL. As suspensões de esporos de fungos foram realizadas em 5mL de salina juntamente com *tween* 20%, em seguida foram padronizadas no espectrofotômetro a 530nm, na escala 0,5 de McFarland com 65-75% de transmitância. As diluições dos fármacos foram preparadas de acordo com as condições descritas no documento M38-A2 do CLSI. As suspensões dos conídios padronizadas foram diluídas em meio RPMI 1640. Todas as cepas foram expostas a diferentes concentrações de drogas antifúngicas em placas de microtitulação de fundo chato com 96 poços. As microplacas inoculadas foram incubadas em 35°C e avaliadas visualmente quanto ao crescimento do fungo até 96 horas após a exposição. A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi definida como a concentração necessária para inibir o crescimento da colônia em 50% para itraconazol e 100% para terbinafina em comparação com o grupo controle.

Os intervalos e as médias geométricas (GMs) das CIMs foram determinados para cada espécie e fármaco, após 96h de incubação a 35°C (Gnat et al., 2020). Todos os experimentos de cada linhagem foram realizados em triplicata independentes em dias diferentes.

4.8 Análise estatística

Os dados foram analisados usando Jamovi v1.6 (<https://www.jamovi.org>). As distribuições de CIMs entre as cepas foram comparadas usando o teste t de amostras pareadas e o teste Shapiro-Wilk; as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em um valor $P \leq 0,05$ (bicaudal).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No estudo, 15 cepas que estavam classificadas na coleção de culturas Micoteca URM após a análise molecular foram reclassificadas (Tabela 1). Três cepas estavam descritas como *Trichophyton mentagrophytes* (uma foi renomeada como *T. quinckeanum* e duas como *T. rubrum*); uma cepa estava nomeada como *T. rubrum*, após a análise molecular foi renomeada para *T. mentagrophytes*; de 11 cepas que estavam descritas como *T. tonsurans*, quatro delas, na realidade, eram *T. mentagrophytes* e sete eram *T. rubrum*, que puderam ser confirmados após o nosso estudo molecular.

No presente estudo, a grande maioria das cepas utilizadas no estudo que estavam depositadas na Micoteca URM foram isoladas de escamas epidérmicas de várias partes do corpo incluindo pés, mãos, virilha, além do isolamento das unhas e do couro cabeludo, como podemos observar na Tabela 1. Das 61 cepas analisadas, 60 foram obtidas de material coletado de humanos e apenas uma do solo. Espécies de *Trichophyton* podem ser encontradas em associação com couro cabeludo, escamas epidérmicas de várias partes do corpo, unhas e meio ambiente. De acordo com Silva-Rocha, Azevedo & Chaves (2017) a seletividade com que espécies de dermatófitos acometem diferentes estruturas queratinizadas se deve à presença de queratinases e enzimas proteolíticas específicas.

O estudo de Mercer & Stewart (2018) relata que as escamas epidérmicas da pele, unhas e couro cabeludo são as partes do corpo mais afetadas pelas dermatofitoses, principalmente por serem mais vulneráveis e terem contato mais fácil com objetos, pessoas e outros animais infectados. Essa pesquisa está em concordância com o nosso estudo em que as partes do corpo mais prevalentes foram as escamas epidérmicas de diferentes regiões do corpo e o couro cabeludo.

O estudo de Brilhante et al. (2000) cita que esses sítios anatômicos são variáveis em relação à distribuição geográfica da cepa, idade, sexo e imunologia do hospedeiro. No Brasil, os estudos existentes mostram que os sítios anatômicos afetados variam de acordo com cada região geográfica e idade do indivíduo, apesar de poucos estudos epidemiológicos recentes no país, como mostram alguns dos estudos realizados como os de (Brilhante et al. (2000), Damázio et al. (2007), Couto, Nascimento & Neves (2013), da Silva et al. (2018) e Silva et al. (2021). Por exemplo, as crianças são mais infectadas no couro cabeludo e acredita-se que seja devido ao contato com outras crianças na escola,

além da contribuição do fator imunológico nessa idade e dos maus hábitos de higiene (Da Silva et al., 2018). Na população adulta, observa-se alta incidência de casos de dermatofitose nos pés e unhas, conforme citado no estudo de Rezende et al. (2009), em que relata que a *Tinea pedis* ocorre em cerca de 70% dos adultos, fato que pode ser explicado devido ao clima quente e úmido associado ao hábito de vida de cada população (Damázio et al., 2007; Couto, Nascimento & Neves, 2013).

Tabela 1 - Cepas de *Trichophyton* usadas no estudo e números de acesso de sequências no GenBank

| URM | ID atual | ID anterior | Fonte/Substrato | Cidade | Ano de depósito | Número de acesso no GenBank | Número de acesso no GenBank | |
|-----|----------|--------------------------|--------------------------|----------------|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|----------|
| | | | | | | | ITS | TUB2 |
| | | | | | | | | |
| 1. | 699 | <i>T. concentricum</i> | <i>T. concentricum</i> | - | EUA | 1965 | OR088194 | OR078922 |
| 2. | 5538 | <i>T. quinckeum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | - | - | 2007 | OR088176 | OR078904 |
| 3. | 450 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea corporis | Recife/PE | 1955 | OR088180 | OR078908 |
| 4. | 700 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 1956 | OR088182 | OR078910 |
| 5. | 771 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 1957 | OR088161 | OR078889 |
| 6. | 2669 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. rubrum</i> | - | Recife/PE | 1982 | OR088196 | OR078924 |
| 7. | 4156 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea pedis | São Paulo/SP | 1999 | OR088167 | OR078895 |
| 8. | 4157 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea pedis | Recife/PE | 1999 | OR088192 | OR078920 |
| 9. | 4422 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2002 | OR088156 | OR078884 |
| 10. | 4945 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088183 | OR078911 |
| 11. | 5431 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea corporis | Bonito/AL | 2007 | OR088158 | OR078886 |
| 12. | 5432 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2007 | OR088155 | OR078883 |
| 13. | 5541 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | - | Recife/PE | 2007 | OR088141 | OR078869 |
| 14. | 6211 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea unguium | Recife/PE | 2010 | OR088184 | OR078912 |
| 15. | 6272 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2010 | OR088157 | OR078885 |
| 16. | 6772 | <i>T. mentagrophytes</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2010 | OR088168 | OR078896 |
| 17. | 471 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | - | Recife/PE | 1956 | OR088152 | OR078880 |
| 18. | 719 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | - | Recife/PE | 1956 | OR088195 | OR078923 |
| 19. | 2875 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | solo | São Paulo/SP | 1985 | OR088142 | OR078870 |
| 20. | 3239 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. mentagrophytes</i> | tinea capitis | Recife/PE | 1992 | OR088159 | OR078887 |
| 21. | 4194 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 1999 | OR088143 | OR078871 |
| 22. | 4195 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 1999 | OR088190 | OR078918 |

| | | | | | | | | |
|------------|------|------------------|---------------------|----------------|-----------|------|----------|----------|
| 23. | 4726 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea pedis | Recife/PE | 2003 | OR088173 | OR078901 |
| 24. | 4727 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2003 | OR088197 | OR078925 |
| 25. | 4730 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea manuum | Recife/PE | 2003 | OR088144 | OR078872 |
| 26. | 4735 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088186 | OR078914 |
| 27. | 4159 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea cruris | Recife/PE | 1999 | OR088191 | OR078919 |
| 28. | 4257 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2000 | OR088189 | OR078917 |
| 29. | 4258 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea pedis | Bonito/AL | 2000 | OR088175 | OR078903 |
| 30. | 4569 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea unguium | Recife/PE | 2002 | OR088187 | OR078915 |
| 31. | 4738 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088193 | OR078921 |
| 32. | 5143 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2005 | OR088146 | OR078874 |
| 33. | 5144 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea cruris | Recife/PE | 2005 | OR088147 | OR078875 |
| 34. | 5145 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea cruris | Recife/PE | 2005 | OR088169 | OR078897 |
| 35. | 5307 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2006 | OR088150 | OR078878 |
| 36. | 5413 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2007 | OR088174 | OR078902 |
| 37. | 5505 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2007 | OR088185 | OR078913 |
| 38. | 5543 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2007 | OR088148 | OR078876 |
| 39. | 5544 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2007 | OR088166 | OR078894 |
| 40. | 5558 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea unguium | Recife/PE | 2007 | OR088160 | OR078888 |
| 41. | 5904 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2008 | OR088165 | OR078893 |
| 42. | 5905 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2009 | OR088149 | OR078877 |
| 43. | 5906 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2009 | OR088151 | OR078879 |
| 44. | 5907 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2009 | OR088153 | OR078881 |
| 45. | 5908 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2009 | OR088172 | OR078900 |
| 46. | 6206 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2010 | OR088145 | OR078873 |
| 47. | 6212 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea cruris | Recife/PE | 2010 | OR088198 | OR078926 |
| 48. | 6213 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2010 | OR088170 | OR078898 |
| 49. | 6752 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. tonsurans</i> | Rim | Recife/PE | 2012 | OR088199 | OR078927 |

| | | | | transplantado | | | | |
|-----|------|---------------------|---------------------|----------------------|-----------|------|----------|----------|
| 50. | 6753 | <i>T. rubrum</i> | <i>T. rubrum</i> | Rim transplantado | Recife/PE | 2012 | OR088154 | OR078882 |
| 51. | 4737 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea unguium | Recife/PE | 2004 | OR088188 | OR078916 |
| 52. | 4741 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea cruris | Recife/PE | 2004 | OR088181 | OR078909 |
| 53. | 4743 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088162 | OR078890 |
| 54. | 4744 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088200 | OR078928 |
| 55. | 4944 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088164 | OR078892 |
| 56. | 4946 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea corporis | Recife/PE | 2004 | OR088201 | OR078929 |
| 57. | 4947 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2004 | OR088171 | OR078899 |
| 58. | 4948 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea unguium | Recife/PE | 2004 | OR088163 | OR078891 |
| 59. | 4963 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2005 | OR088179 | OR078907 |
| 60. | 4965 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2005 | OR088177 | OR078905 |
| 61. | 4967 | <i>T. tonsurans</i> | <i>T. tonsurans</i> | tinea capitis | Recife/PE | 2005 | OR088178 | OR078906 |

Com relação à morfologia das colônias, as cepas de *Trichophyton mentagrophytes* apresentaram colônias planas com aspecto algodonoso, algumas sem pigmentação ou com pigmentação creme a marrom produzidas em meio. Na micromorfologia, apresentaram hifas hialinas, numerosos microconídios globosos a subesféricos e piriformes ($3 \times 4 \mu\text{m}$) e macroconídios ocasionalmente observados em algumas culturas. Nenhum crescimento foi observado a 37°C .

A cepa de *Trichophyton quinckeanum* apresentou colônia plana com coloração branca, aspecto algodonoso e pigmento amarronzado produzido no meio. Microconídios subesféricos ($3 \times 5 \mu\text{m}$) foram ocasionalmente observados. Nenhum crescimento foi observado a 37°C .

As cepas de *Trichophyton rubrum* apresentaram colônias planas, exibindo coloração branca, cinza e creme, aspecto algodonoso e pulverulento, com pigmento rosa-avermelhado e marrom produzido em meio. Na micromorfologia apresentando hifas hialinas, microconídios piriformes dispostos ao longo das hifas ($2,5 \times 4 \mu\text{m}$). O crescimento foi observado a 37°C .

As cepas de *Trichophyton tonsurans* apresentaram colônias planas, exibindo coloração branca, aspecto algodonoso, algumas cepas não produziram pigmento e outras produziram um pigmento marrom-amarelado a marrom em meio. As características microscópicas eram hifas hialinas, numerosos microconídios globosos e esféricos ($3-3,5 \times 5-5,5 \mu\text{m}$), poucas culturas produziram exclusivamente microconídios ou macroconídios piriformes. O crescimento foi observado a 37°C .

A cepa de *Trichophyton concentricum* apresentou colônia na cor branca, com aparência pulverulenta, e o reverso de cor creme. Microscopicamente apresentou microconídios globosos e subesféricos ($3 \times 4 \mu\text{m}$), que foram ocasionalmente observados. Nenhum crescimento foi observado a 37°C .

Com base em nosso estudo, foi possível observar mudanças na morfologia de colônias da mesma espécie (por exemplo, padrão de colônia, pigmentação e taxa de crescimento) (Tabela 2). Assim, pode-se entender que a diferenciação entre essas espécies de *Trichophyton* por meio do diagnóstico convencional é um obstáculo devido às variações fenotípicas entre suas cepas como também citam os estudos de Ziołkowska et al. (2015), Gnat et al. (2019) e Siopi et al. (2021).

Baseado no teste da urease, todas as cepas classificadas como *T. interdigitale*, *T. concentricum* e *T. quinckeanum* apresentaram resultado positivo, demonstrando a

capacidade de assimilar a uréia. Todas as 34 cepas de *T. rubrum* foram incapazes de assimilar uréia. Das nove cepas reclassificadas como *T. tonsurans*, seis apresentaram capacidade de urease positiva e três foram negativas. No teste de caseína, todas as cepas identificadas como *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. concentricum* e *T. quinckeanum* apresentaram padrão de crescimento 4+, enquanto seis cepas de *T. tonsurans* apresentaram padrão de crescimento 4+ e cinco apresentaram padrão de crescimento padrão 1+ (Tabela 2).

Podemos dizer que testes fisiológicos são usados para distinguir espécies relacionadas de dermatófitos. Cepas de *Trichophyton mentagrophytes* exibiram atividade de urease após quatro dias de incubação, enquanto cepas de *T. rubrum* foram negativas para o teste de urease. O teste da urease foi eficaz para separar cepas de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*; no entanto, não foi possível separar as cepas de *T. tonsurans*; estando os nossos resultados de acordo com o estudo de Sidrim et al. (2013). Culturas de *T. tonsurans* apresentaram diferenças no resultado quanto ao teste da urease; consequentemente, o teste não é uma ferramenta eficaz para identificar cepas dessa espécie. Nossos resultados indicam o teste da urease na distinção entre cepas de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. O teste da caseína mostrou que esta característica fisiológica não permitiu diferenciar nenhuma das cepas deste estudo; portanto, não sendo viável para cepas de *Trichophyton*. Em discordância com o relato de Sidrim et al. (2013) que infere que o teste da caseína permite diferenciar cepas de *T. tonsurans*.

Tabela 2 - Caracterização morfofisiológica das cepas de *Trichophyton*

| | URM | ID atual | Colônias verso/reverso/aspecto/diâmetro | Conídios | Fisiologia |
|-----|------|------------------------------------|--|-----------------------|-----------------------------------|
| | | | | | urease/caseína/crescimento a 37°C |
| 1. | 699 | <i>Trichophyton concentricum</i> | branca/creme/pulverulenta/3,5cm | globoso e subesférico | positivo/4+/negativo |
| 2. | 5538 | <i>Trichophyton quinckeanum</i> | branca/creme/cotonosa/5,5cm | subesférico | positivo/4+/negativo |
| 3. | 450 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 4. | 700 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarelada/cotonosa/4,7cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 5. | 771 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4,2cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 6. | 2669 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4,3cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 7. | 4156 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4cm | globoso e subesférico | positivo/4+/negativo |
| 8. | 4157 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 9. | 4422 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/cotonosa/4cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 10. | 4945 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarela/cotonosa/5,1cm | globoso e subesférico | positivo/4+/negativo |
| 11. | 5431 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/creme/pulverulenta/3,7cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 12. | 5432 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarela/cotonosa/4cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 13. | 5541 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarela/cotonosa/4,5cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 14. | 6211 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarela/cotonosa/5,5cm | globoso e piriforme | positivo/4+/negativo |
| 15. | 6272 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarronzada/cotonosa/4,3cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| 16. | 6772 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | branca/amarela/cotonosa/7cm | globoso | positivo/4+/negativo |
| | | | branca/creme/cotonosa/5,5cm | globoso e subesférico | positivo/4+/negativo |
| 17. | 471 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/cotonosa/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 18. | 719 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/amarelada/pulverulenta/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |

| | | | | | |
|-----|------|----------------------------|---|-----------|----------------------|
| 19. | 2875 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/marrom/pulverulenta/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 20. | 3239 | <i>Trichophyton rubrum</i> | acinzentada/amarronzada/cotonosa/3,4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 21. | 4194 | <i>Trichophyton rubrum</i> | creme/vermelha/pulverulenta/5,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 22. | 4195 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/5,2cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 23. | 4726 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/marrom/pulverulenta/4,4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 24. | 4727 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/cotonosa/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 25. | 4730 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/creme/cotonosa/3 cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 26. | 4735 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/marrom/cotonosa/3,2 cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 27. | 4159 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,2cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 28. | 4257 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta /4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 29. | 4258 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,3cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 30. | 4569 | <i>Trichophyton rubrum</i> | acinzentada/rosa avermelhada/cotonosa/5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 31. | 4738 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 32. | 5143 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,2cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 33. | 5144 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/cotonosa/5,4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 34. | 5145 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 35. | 5307 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/4,8cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 36. | 5413 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 37. | 5505 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 38. | 5543 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 39. | 5544 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/marrom/cotonosa/3,7cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 40. | 5558 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/marrom/pulverulenta/4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 41. | 5904 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 42. | 5905 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/3,7cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 43. | 5906 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/cotonosa/3,5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 44. | 5907 | <i>Trichophyton rubrum</i> | acinzentada/vermelha/pulverulenta/3,2cm | piriforme | negativo/4+/positivo |

| | | | | | |
|-----|------|-------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------|
| 45. | 5908 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/3cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 46. | 6206 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/4,7cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 47. | 6212 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/4cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 48. | 6213 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/5,3cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 49. | 6752 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/vermelha/pulverulenta/5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 50. | 6753 | <i>Trichophyton rubrum</i> | branca/rosa avermelhada/pulverulenta/5cm | piriforme | negativo/4+/positivo |
| 51. | 4737 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/amarronzada/cotonosa/4,5 cm | esférico e piriforme | negativo/4+/positivo |
| 52. | 4741 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/ amarelada/cotonosa/4,7cm | esférico e piriforme | negativo/4+/positivo |
| 53. | 4743 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/marrom/cotonosa/5cm | esférico e piriforme | negativo/4+/positivo |
| 54. | 4744 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/marrom/pulverulenta/4cm | esférico e piriforme | positivo/1+/positivo |
| 55. | 4944 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/creme/cotonosa/3,2cm | esférico e piriforme | positivo/1+/positivo |
| 56. | 4946 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/marrom/cotonosa/3,7cm | esférico, piriforme globoso | negativo /4+/positivo |
| 57. | 4947 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/marrom/cotonosa/7cm | esférico e piriforme | positivo/4+/negativo |
| 58. | 4948 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/creme/cotonosa/3,5cm | esférico e piriforme | negativo/4+/positivo |
| 59. | 4963 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/ marrom /cotonosa/3cm | esférico e piriforme | negativo/1+/positivo |
| 60. | 4965 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/ creme /cotonosa/3,7cm | esférico e piriforme | positivo/1+/positivo |
| 61. | 4967 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | branca/ marrom /cotonosa/3,9cm | esférico e piriforme | negativo/1+/positivo |

Figura 1 - Macromorfologia de *Trichophyton mentagrophytes*: colônia branca algodonosa com o reverso na coloração creme. Micromorfologia de *Trichophyton mentagrophytes*: presença de microconídios globosos.



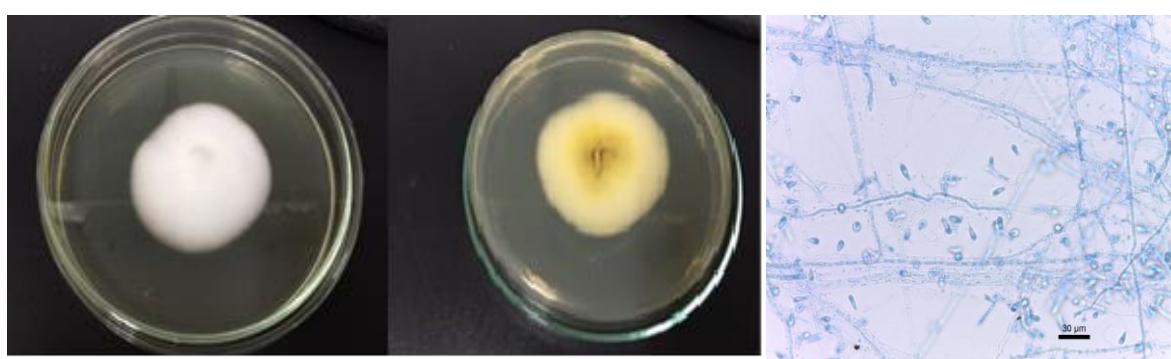
Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Figura 2 - Macromorfologia de *Trichophyton rubrum*: colônia branca algodonosa com o reverso na coloração marrom. Micromorfologia de *Trichophyton rubrum*: presença de numerosos microconídios piriformes



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Figura 3 - Macromorfologia de *Trichophyton tonsurans*: colônia branca algodonosa com o reverso amarronzado no centro. Micromorfologia de *Trichophyton tonsurans*: presença de microconídios de formas variadas.



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Figura 4 - Macromorfologia de *Trichophyton quinckeanum*: colônia branca algodonosa com reverso creme. Micromorfologia de *Trichophyton quinckeanum*: presença de raros microconídios subsféricos.



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Figura 5 - Macromorfologia de *Trichophyton concentricum*: colônia branca algodonosa com o reverso amarronzado no centro. Micromorfologia de *Trichophyton concentricum*: presença de raros microconídios globosos e subsféricos



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Com base em nossa análise filogenética usando sequências concatenadas das regiões ITS e TUB2 dos 61 isolados de *Trichophyton* de nosso estudo, as cepas analisadas foram agrupadas em cinco espécies: *T. rubrum* (34 cepas), *T. quinckeanum* (1 cepa), *T. concentricum* (1 cepa), *T. tonsurans* (11 cepas) e *T. mentagrophytes* (14 cepas) (Figura 6).

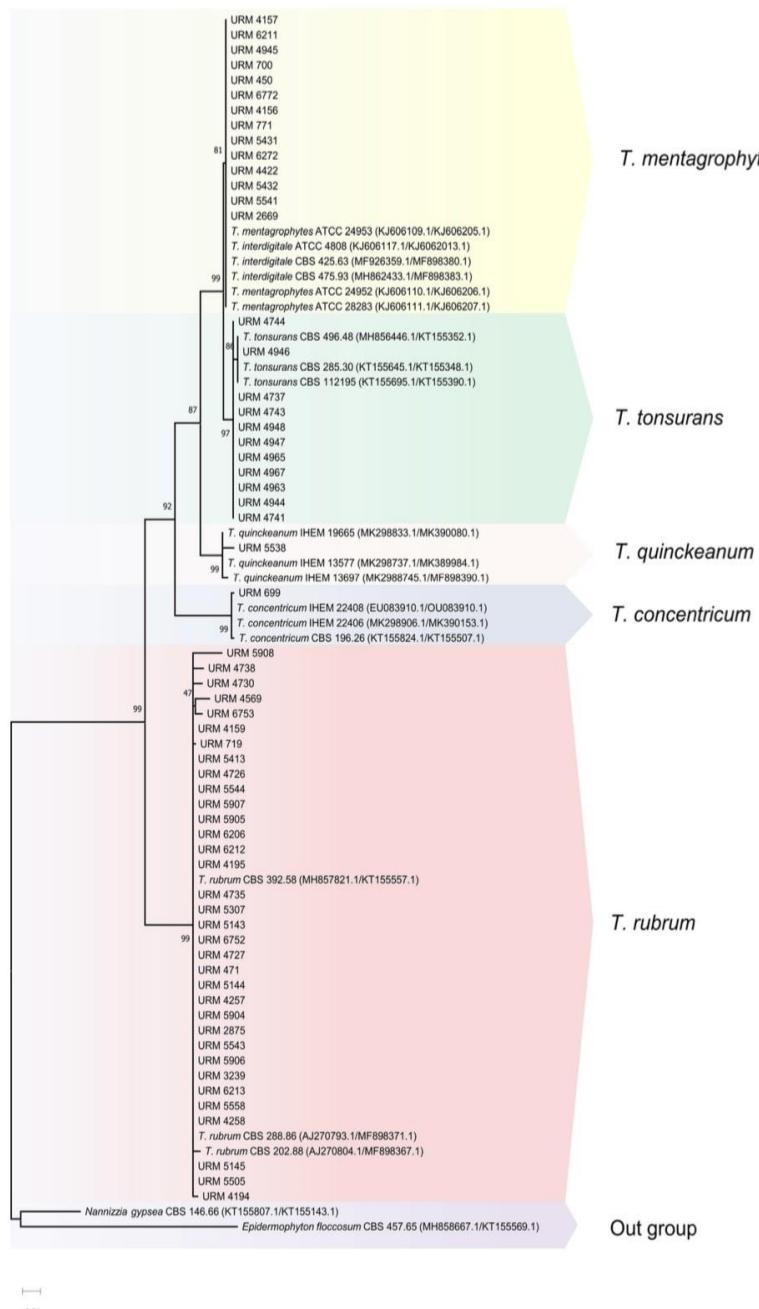
A análise das sequências ITS e TUB2 foram cruciais para separar as espécies/cepas de *Trichophyton* aqui estudadas, sendo ITS o marcador mais informativo. De acordo com Taghipour et al. (2019), o complexo *Trichophyton mentagrophytes* demonstrou abranger diferentes genótipos, para identificar esses genótipos em nossas amostras de fungos, uma análise filogenética de ITS foi realizada usando o software MEGA 11 (Figura 7).

Nesta análise, nossas sequências foram comparadas com as de referência, descritas por Taghipour et al. (2019), Tang et al. (2021) e Pashootan et al. (2022). A Figura 7 mostra que nossas cepas, foram agrupadas com os isolados dos genótipos descritos anteriormente como I, II, II*, III, III*, X, XII, XVII, XVIII, XXIV (nomeado em nossa filogenia como Genótipo VII).

A análise de ITS nos revelou que a distribuição dos genótipos (Tipos) descritos anteriormente não é suportada pela distribuição dos ramos, podendo-se observar um arranjo não monofilético na distribuição dos "Tipos" dentro das diferentes sequências de *T. mentagrophytes* que foram utilizadas em nosso estudo, como podemos citar um exemplo, os "Tipos" III e XXIV presentes em dois ramos distintos.

Ademais, na figura 7 podemos observar que os ramos são formados por mais de um "Tipo" ou genótipo de *T. mentagrophytes*, impossibilitando a correta diferenciação desses genótipos. Devido a essa razão, optamos por descrever os ramos de nossa árvore com uma nova proposta de genótipos (genótipos I a VII) nomeados apenas dentro do complexo *Trichophyton mentagrophytes*, como mostra a topologia e análise dos ramos da árvore (Figura 7). Cinco sequências de referência de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* são usadas para confirmar o arranjo da árvore filogenética.

Figura 6 - Análise filogenética de 61 sequências de DNA concatenadas das regiões ITS e TUB2 de espécies de *Trichophyton* depositadas na coleção de culturas Micoteca URM (Pernambuco, Brasil). Os ramos são codificados por cores em uma escala para mostrar cinco espécies diferentes (*T. mentagrophytes*, *T. quinckeanum*, *T. tonsurans*, *T. concentricum* e *T. rubrum*). As espécies *Nannizzia gypsea* e *Epidermophyton floccosum* servem como grupo externo. 20 sequências de referência de ITS e TUB2 são nomeadas junto com seus números de acesso do Genbank (NCBI). A análise foi inferida usando o método de máxima verossimilhança e o Kimura Modelo de 2 parâmetros.



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Figura 7 - Análise filogenética de 14 sequências de rDNA ITS de *Trichophyton mentagrophytes* da coleção de culturas Micoteca URM (Pernambuco, Brasil), com 53 sequências de referência ITS do GenBank (NCBI) para os genótipos de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale*. Os ramos são codificados por cores com base nos genótipos para mostrar seis agrupamentos principais. As espécies *T. quinckeanum* (IHEM 13577), *T. concentricum* (IHEM 22408) e *T. tonsurans* (CBS 112195) servem como grupo externo. Sequências de referência de ITS (20 sequências) são nomeadas juntamente com seus números de acesso ao Genbank (NCBI). A análise foi inferida usando o método de máxima verossimilhança e o Kimura modelo de 2 parâmetros.



Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

A partir do teste de suscetibilidade antifúngica, todas as espécies/cepas de *Trichophyton* usadas neste estudo mostraram padrões semelhantes de suscetibilidade a itraconazol e terbinafina. Os valores de MG (média geométrica) de CIM ($\mu\text{g/mL}$) para todos os isolados utilizados neste estudo foram: terbinafina (0,51) e itraconazol (0,32) (Tabela 3). O itraconazol teve a maior atividade *in vitro* frente a todas as cepas; a média da CIM variou de 0,04 a 5,33 $\mu\text{g/mL}$. Para terbinafina, a média da CIM variou de 0,17 a 3,33 $\mu\text{g/mL}$.

A maior faixa de CIM foi medida para itraconazol, e o menor valor de CIM foi de 0,04 mg/mL para itraconazol e 0,17 $\mu\text{g/mL}$ para terbinafina. Valores elevados de CIM foram encontrados para algumas cepas: *T. tonsurans* URM 4743 e URM 4963 tiveram CIMS para terbinafina de 4 mg/mL, e a cepa de *T. rubrum* URM 5904 teve CIM para itraconazol de 4 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Nossos resultados indicaram que não existem diferenças estatisticamente significativas nos padrões de suscetibilidade antifúngica entre as espécies de *Trichophyton*.

De acordo com o estudo de Siopi et al. (2021) durante o tratamento da dermatofitose, os antifúngicos terbinafina e itraconazol são os agentes mais comumente usados. Em nosso estudo, a CIM mais baixa foi observada no itraconazol (0,03 $\mu\text{g/mL}$); entretanto, todas as cepas foram sensíveis ao itraconazol e à terbinafina. Embora as cepas de *Trichophyton* tenham apresentado valores de CIM ligeiramente mais altos para a terbinafina, esse antifúngico provou ser eficaz. Esses valores de CIM mais elevados merecem uma atenção devido ao fato de que cepas de *T. mentagrophytes* em países como Índia, Japão e Irã estão se mostrando resistentes à terbinafina, como relata o estudo de Fattahi et al. (2020), visto que as cepas do Brasil podem estar adquirindo também resistência aos antifúngicos.

Semelhante ao nosso estudo, o itraconazol e a terbinafina demonstraram eficácia *in vitro* como relataram também os estudos com testes *in vitro* de Adimi et al. (2013), Singh et al. (2018), Süß et al. (2019) e Magagnin et al. (2011). Em geral, os dois antifúngicos usados têm o maior efeito em comparação com outras drogas, como infere o estudo de Pashootan et al. (2022). Em estudos anteriores, como o de Intra et al. (2019) e o de Hiruma et al. (2016) cepas de *T. rubrum*, *T. interdigitale* e *T. tonsurans* também foram sensíveis ao itraconazol e à terbinafina, sendo esta última a droga mais ativa contra dermatófitos.

Em um estudo de Taghipour et al. (2019) que utilizou cepas do Irã, de 45 cepas de *T. mentagrophytes*, 5 (11,11%) foram resistentes à terbinafina. Todos os isolados de *T. mentagrophytes* resistentes à terbinafina em outros estudos pertenciam ao genótipo ITS tipo VIII, como no estudo de Pashootan et al. (2022), que utilizou cepas do Irã. No estudo de Magagnin et al. (2011), que foi realizado com cepas do Brasil (Porto Alegre), a CIM da terbinafina para as cepas variou de 0,03-2 µg/mL, inferior à apresentada em nosso estudo, que foi de 0,125-4 µg/mL. A variação da CIM do estudo de Rudramurthy et al. (2018) foi menor, variando de 2-4 µg/mL. Para o itraconazol, a variação foi menor, de 0,0625-0,125 µg/mL. No estudo de Bortoluzzi et al. (2023), *T. rubrum* apresentou valores de CIM de 4 mg/L para terbinafina e 0,12 mg/L para itraconazol.

Para o itraconazol, Magagnin et al. (2011) relataram a CIM variando de 0,06-1 µg/mL e nosso estudo uma CIM mais alta, de 0,03-4 µg/mL. Apesar das cepas apresentarem menores valores de CIM frente ao itraconazol, os dois antifúngicos possuem eficácia no tratamento das dermatofitoses, porém a terbinafina seria preferencialmente utilizada nos casos em que o tratamento sistêmico fosse necessário, ao contrário do itraconazol que sistemicamente causa mais efeitos adversos no organismo, de acordo os estudos de Hiruma et al. (2016), Hur et al. (2018), Salehi et al. (2018) e Siopi et al. (2021). Porém, como as dermatofitoses são lesões superficiais, as drogas são em sua grande maioria utilizadas topicalmente, onde o itraconazol pode ser uma alternativa viável devido ao seu custo benefício, como infere o estudo de Martinez-Rossi; Perez; Rossi, 2008.

Tabela 3 - Dados de suscetibilidade de espécies de *Trichophyton* frente aos agentes antifúngicos.

| Isolados/Antifúngicos | Intervalo da média | CIM50 | CIM100 | Média | Média Geométrica |
|---|--------------------|-------|--------|-------|------------------|
| <i>Trichophyton</i> (n=61) | | | | | |
| Terbinafina | 0,17-3,33 | | 0,17 | 0,82 | 0,51 |
| Itraconazol | 0,04-5,33 | 0,04 | | 0,36 | 0,32 |
| <i>Trichophyton rubrum</i> (n=34) | | | | | |
| Terbinafina | 0,17-3,33 | | 0,17 | 0,75 | 0,47 |
| Itraconazol | 0,05-5,33 | 0,05 | | 0,44 | 0,40 |
| <i>Trichophyton mentagrophytes*</i> (n=14) | | | | | |
| Terbinafina | 0,17-1,67 | | 0,17 | 0,47 | 0,34 |
| Itraconazol | 0,04-0,33 | 0,04 | | 0,17 | 0,14 |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> (n=11) | | | | | |
| Terbinafina | 0,21-3,33 | | 0,21 | 1,47 | 1,03 |

| | | | | |
|---|-----------|------|------|------|
| Itraconazol | 0,14-1,67 | 0,14 | 0,41 | 0,37 |
| <i>Trichophyton quinckeanum</i> (n=1) | | | | |
| Terbinafina | 0,25-1 | | 0,58 | 0,50 |
| Itraconazol | 0,13-0,25 | | 0,21 | 0,20 |
| <i>Trichophyton concentricum</i> (n=1) | | | | |
| Terbinafina | 0,25-1 | | 0,58 | 0,50 |
| Itraconazol | 0,13-0,25 | | 0,21 | 0,20 |

* Os isolados fúngicos foram identificados como *T. interdigitale* usando a ferramenta BLASTn do NCBI e *T. mentagrophytes* por análise filogenética da região ITS do rDNA.

Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

Tabela 4 - Perfil de suscetibilidade antifúngica de cepas de *Trichophyton* frente a terbinafina e itraconazol

| URM | Espécies | CIM | CIM |
|-----|----------|------------------------------------|---------------------------------|
| | | Terbinafina (0,03 – 16 µg/mL) | Itraconazol (0,03 - 16µg/mL) |
| 1. | 699 | <i>Trichophyton concentricum</i> | 0,5 µg/mL |
| 2. | 5538 | <i>Trichophyton quinckeanum</i> | 0,5 µg/mL |
| 3. | 450 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,5 µg/mL |
| 4. | 700 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 1 µg/mL |
| 5. | 771 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,25 µg/mL |
| 6. | 2669 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,25 µg/mL |
| 7. | 4156 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,5 µg/mL |
| 8. | 4157 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 1 µg/mL |
| 9. | 4422 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,125 µg/mL |
| 10. | 4945 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,5 µg/mL |
| 11. | 5431 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,125 µg/mL |
| 12. | 5432 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,25 µg/mL |
| 13. | 5541 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,125 µg/mL |
| 14. | 6211 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 0,5 µg/mL |
| 15. | 6272 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 2 µg/mL |
| 16. | 6772 | <i>Trichophyton mentagrophytes</i> | 2 µg/mL |
| 17. | 471 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 18. | 719 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 19. | 2875 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,25 µg/mL |
| 20. | 3239 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,125 µg/mL |
| 21. | 4194 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,25 µg/mL |
| 22. | 4195 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 23. | 4726 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 24. | 4727 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL |
| 25. | 4730 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,25 µg/mL |
| 26. | 4735 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 27. | 4159 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 28. | 4257 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 29. | 4258 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL |
| 30. | 4569 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 31. | 4738 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 32. | 5143 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 33. | 5144 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL |
| 34. | 5145 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,125 µg/mL |
| 35. | 5307 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 36. | 5413 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 37. | 5505 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL |
| 38. | 5543 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 2 µg/mL |
| 39. | 5544 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL |
| 40. | 5558 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,5 µg/mL |
| 41. | 5904 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 4 µg/mL |

| | | | | |
|------------|------|-------------------------------|-------------|-------------|
| 42. | 5905 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0.5 µg/mL | 0.06 µg/mL |
| 43. | 5906 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 44. | 5907 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 4 µg/mL | 0,06 µg/mL |
| 45. | 5908 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0.25 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 46. | 6206 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,25 µg/mL | 0,06 µg/mL |
| 47. | 6212 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,125 µg/mL | 0,06 µg/mL |
| 48. | 6213 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0,25 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 49. | 6752 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 1 µg/mL | 0.5 µg/mL |
| 50. | 6753 | <i>Trichophyton rubrum</i> | 0.5 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 51. | 4737 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 1 µg/mL | 0.5 µg/mL |
| 52. | 4741 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 2 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 53. | 4743 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 4 µg/mL | 1 µg/mL |
| 54. | 4744 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 2 µg/mL | 1 µg/mL |
| 55. | 4944 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 2 µg/mL | 0.25 µg/mL |
| 56. | 4946 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 2 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 57. | 4947 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 1 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 58. | 4948 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 0.25 µg/mL | 0.125 µg/mL |
| 59. | 4963 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 4 µg/mL | 0.03 µg/mL |
| 60. | 4965 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 0.25 µg/mL | 0.06 µg/mL |
| 61. | 4967 | <i>Trichophyton tonsurans</i> | 2 µg/mL | 0.03 µg/mL |

Fonte: Oliveira, T.F. (2022)

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Análises morfológicas podem não ser satisfatórias na identificação de cepas de *Trichophyton*, se utilizadas isoladas.
- As análises moleculares são ferramentas de acurácia na identificação de linhagens de espécies de *Trichophyton*.
- O resultado do teste de urease permanece eficaz para diferenciar cepas de *Trichophyton mentagrophytes* de cepas de *T. rubrum*, contudo não é conclusivo para cepas de *T. tonsurans*.
- O resultado do teste da caseína não permite diferenciar cepas de *Trichophyton*.
- No nosso estudo, a análise molecular da região ITS foi determinante na definição dos genótipos de linhagens de espécies de *Trichophyton*.
- A genotipagem pode aperfeiçoar as informações epidemiológicas.
- O gene ITS é mais informativo na identificação de cepas de *Trichophyton*.
- De acordo com a literatura, tem se observado o aumento da CIM *in vitro* em vários países, contudo no nosso estudo as CIMs foram baixas.
- As baixas concentrações inibitórias mínimas da terbinafina e do itraconazol podem nos direcionar para o tratamento das dermatofitoses, porém o itraconazol pode se tornar uma melhor escolha devido ao seu custo benefício, por ser um antifúngico mais acessível financeiramente para grande parte da população.
- O estudo do acervo de uma coleção de cepas de *Trichophyton* é fundamental para atualização taxonômica, compreensão da variação das características fenotípicas, moleculares e dos padrões de suscetibilidade antifúngica, bem como a formação de recursos humanos.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, M.L. et al. *Trichophyton erinacei* in pet hedgehogs in Spain: Occurrence and revision of its taxonomic status. **Medical Mycology**, v. 0, p. 1-9, jun. 2017.
- ABASTABAR, M. et al. A Molecular Epidemiological Survey of Clinically Important Dermatophytes in Iran Based on Specific RFLP Profiles of Betatubulin Gene. **Iranian Journal of Public Health**, v.42 (9), p. 1049-1057, sep. 2013.
- ABREU, M.M.V.; TUTUNJI, V.L. Implantação e manutenção da coleção de culturas de microrganismos do UniCEUB. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 2, p. 236-251.
- ADIMI, P.; HASHEMI, S.J.; MAHMOUDI, M.; MIRHENDI, H.; SHIDFAR, M.R.; EMMAMI, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; GRAMISHOAR, M.; KORDBACHEH, P. In-vitro activity of 10 antifungal agents against 320 dermatophyte strains using microdilution method in Tehran. **Iranian Journal Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 537-545, 2013.
- AHMADI, B. et al. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. **Medical Mycology**, v. 0, p. 1-15, jan. 2016.
- ALBANESE, G. et al. *Trichophyton soudanense* in Italy. **Mycoses**, v. 38, p. 229-230, 1995.
- ANDRADE, V., ROSSI, G.A.M. Dermatofitose em animais de companhia e sua importância para a Saúde Pública – Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 13(1), 2019.
- ANSARI, S. et al. A 9-Month-Old Girl from Iran with Extensive Erythematous Plaques Due to *Trichophyton simii*, a Zoophilic Dermatophyte. **Mycopathologia**, v. 181 (5-6), p. 451-455, jan. 2016.
- ARAYA, S., TESFAYE, B., FENTE, D. Epidemiology of Dermatophyte and Non Dermatophyte Fungi Infection in Ethiopia. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 291-297, 2020.
- ATES, A.; OZCAN, K.; ILKIT, M. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. **Medical Mycology**, v.46, n.8, p. 811-822, dec. 2008.
- BAERT, F. et al. Updating the Taxonomy of Dermatophytes of the BCCM/ IHEM Collection According to the New Standard: A Phylogenetic Approach. **Mycopathologia**, v. 185, p. 161-168, may. 2019.
- BARANOVÁ, Z. et al. Epidemiological and clinical aspects of dermatophytoses in eastern slovakia: a retrospective three-year study. **Central European Journal of Public Health**, v. 26, p. 72-75, dec. 2018.

BEGUIN, H. et al. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. **Medical Mycology**, v. 50, p. 871-882, nov. 2012.

BEGUIN, H. et al. Is *Trichophyton simii* endemic to the Indian subcontinent? **Medical Mycology**, v. 51, p. 444-448, may. 2013.

BEGUM, J. et al. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. **Journal of Basic Microbiology**, p. 1-11, jan. 2020.

BEGUM, J.; KUMAR, R. Prevalence of dermatophytosis in animals and antifungal susceptibility testing of isolated *Trichophyton* and *Microsporum* species. **Tropical Animal Health and Production**, v. 53(3), p. 1-8, 2020.

BITENCOURT, T.A. et al. HacA Governs Virulence Traits and Adaptive Stress Responses in *Trichophyton rubrum*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11 (193), feb. 2020.

BOEHRINGER, S. I. et al. *Trichophyton simii* in a "Caí" monkey (*Cebus apella*) colony in the province of Corrientes, Argentina. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15(4), p. 300-301, 1998.

BORTOLUZZI, P.; PRIGITANO, A.; SECHI, A.; BONESCHI, V.; GERMINIASI, F.; ESPOSTO, M.C.; ROMANÒ, L.; PAVAN, G.; MATINATO, C.; VERALDI, S.; MARZANO, A.V.; GRANCINI, A. Report of terbinafine resistant *Trichophyton* spp. in Italy: Clinical presentations, molecular identification, antifungal susceptibility testing and mutations in the squalene epoxidase gene. **Mycoses**, v. 66, p.680-687, 2023.

BRASCH, J. Standard and Recently Developed Methods for the Differentiation of Dermatophytes. **Hautarzt**, v. 55(2), p. 136-142, feb. 2004.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Epidemiology and ecology of dermatophytosis in fortaleza city: *Trichophyton tonsurans* as an important emergent pathogen of *Tinea capitis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 33(5), p. 417-425, 2000.

BRILHANTE, R. et al. Onycomycosis in Ceará (Northeast Brasil): epidemiological and laboratory aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n. 2, p. 131-135, 2005.

CABAÑES, J. Identificación de hongos dermatofitos. In: REMÁN, J., MANTÍN-MAZUELOS, E., CALVO, M. C. R. (Eds). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Wayne, **CLSI**, 2002. (Approved Standard M38-A).

COSTA, M. et al. Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiânia, GO, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35(1), p.19-22, 2002.

COUTO, F. M. M.; NASCIMENTO, S.; NEVES, R.P. Epidemiology and etiology of the dermatophytosis in Pernambuco, 2005-2010. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 45, p. 1-4, 2013.

- CRUZ, R. et al. Brote de tiña por *Trichophyton tonsurans* en una escuela básica de Valparaíso, Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 36(4), p. 513-517, apr. 2019.
- DAI, P. et al. ZafA Gene Is Important for *Trichophyton mentagrophytes* Growth and Pathogenicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20 (848), p. 1-15, feb. 2019.
- DAMÁZIO, P.M.; LACERDA, H.R.; FILHO, A.M.; MAGALHÃES, O.M.; NEVES, R.P. Epidemiologia, etiologia e formas clínicas das dermatofitoses em Pernambuco, 1995-2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, p. 484-486, 2007.
- DA SILVA, K.A.; GOMES, B.S.; MAGALHÃES, O.M.; FILHO, A.M. Diagnosed dermatophytosis etiology in patients at the Laboratory of Medical Mycology at the Center of Biosciences of the Federal University of Pernambuco, in 2014-2017. **Brazilian Journal of Clinical Analyses**, v. 50, p. 33-37, 2018.
- DE HOOG, G.S.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J.B.; FREEKE, J.; GÖKER, M.; et al. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, p. 5–31, 2017.
- DIONGUE, K. et al. Tinea unguium with *Microsporum langeronii* and *Trichophyton soudanense* revealing tinea capitis with *M. langeronii*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 26(4), p. 398-402, 2016.
- DIONGUE, K. et al. A Comparative Study on Phenotypic versus ITS-Based Molecular Identification of Dermatophytes Isolated in Dakar, Senegal. **International Journal of Microbiology**, p. 1-6, nov. 2019.
- DRIRA, I. et al. Highly Discriminatory Variable-Number Tandem-Repeat Markers for Genotyping of *Trichophyton interdigitale* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52(9), p. 3290-3296, sep. 2014.
- EBRAHIMI, M. Epidemiology of dermatophytosis in northeastern Iran; A subtropical region. **Current Medical Mycology**, v. 5(2), p. 16-21, 2019.
- FATTAHI, A.; SHIRVANI, F.; AYATOLLAHI, A.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; BADALI, H.; LOTFALI, E.; GHASEMI, R.; POURPAK, Z.; FIROOZ, A. Multidrug-resistant *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII in an Iranian family with generalized dermatophytosis: report of four cases and review of literature. **International Journal of Dermatology**, v. 60, p. 686-692, 2020.
- FRÍAS-DE-LEÓN, M.G. et al. Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. **International Journal of Medical Sciences**, v. 17(1), p.45-52, 2020.
- GAWDZIK, A. et al. Epidemiology of dermatomycoses in southwest Poland, years 2011–2016. **Advances in Dermatology and Allergology**, v. 5, p. 604-608, oct. 2019.

GAO, Y. et al. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility of *Trichophyton schoenleinii*, agent of tinea capitis favosa. **Mycoses**, v. 62, p. 466-474, dec. 2018.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Appl Environ Microbiol.** v. 61, p. 1323–1330, 1995.

GNAT, S.; NOWAKIEWICZ, A.; ŁAGOWSKI, D.; TROSCIANCZYK, A.; ZIEBA, P. Tinea corporis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from asymptomatic dogs to two siblings. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 57, p.171-180, 2019.

GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; OSIŃSKA, M.; KOPIŃSKI, L. Population differentiation, antifungal susceptibility, and host range of *Trichophyton mentagrophytes* isolates causing recalcitrant infections in humans and animals. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.** v. 39, p. 2099–2113, 2020.

GORDON, K.A.; MCIVER, C.; KIM, M.; MURRELL, D.F.; TAYLOR, P. Clinical application of molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. **Pathology**, v. 48, p. 720-726, 2016.

GRÄSER Y., SCOTT, J., SUMMERBELL, R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. **Mycopathologia**, v.166 (5-6), p.239-56, mar.2008.

GRIGORYAN, K. et al. Pediatric tinea capitis caused by *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton soudanense* in Rochester, Minnesota, United States. **International Journal of Dermatology**, 2018.

HAGHANI, I. et al. Potential Inhibitory Effect of Miltefosine against Terbinafine-Resistant *Trichophyton indotinea*. **Pathogens**, v. 12, p. 1-9, 2023.

HAINSWORTH, S.; HUBKA, V.; LAWRIE, A.C.; CARTER, D.; VANNIASINKAM, T.; GRANDO, D. Predominance of *Trichophyton interdigitale* Revealed in Podiatric Nail Dust Collections in Eastern Australia. **Mycopathologia**, v.185, p. 175-185, jul. 2019.

HEIDEMANN, S.; MONOD, M.; GRÄSER, Y. Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of *Trichophyton interdigitale* and other species of *T mentagrophytes* sensu lato. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 282-295, 2010.

HIRUMA, J. et al. Terbinafine-resistant strain of *Trichophyton interdigitale* strain isolated from a tinea pedis patient. **Journal of Dermatology**, p. 1-3, jan. 2019.

HIRUMA, J., OGAWA, Y., HIRUMA, M. *Trichophyton tonsurans* infection in Japan: Epidemiology, clinical features, diagnosis and infection control. **Journal of Dermatology**, v. 42, p. 245-249, 2015.

HIRUMA, J.; OKUBO, M.; KANO, R.; KUMAGAWA, M.; HIRUMA, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H.; TSUBOI, R. Mating Type Gene (MAT) and Itraconazole Susceptibility of *Trichophyton tonsurans* Strains Isolated in Japan. **Mycopathologia**, v. 181, p. 441-444, 2016.

HUR M. S.; PARK, M.; JUNG, W.H.; LEE, Y.W. Evaluation of drug susceptibility test for Efinaconazole compared with conventional antifungal agents. **Mycoses**, v. 62, p. 291-297, 2018.

INTRA, J. et al. In Vitro Activity of Antifungal Drugs Against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* spp. by E-Test Method and Non-supplemented Mueller–Hinton Agar Plates. **Mycopathologia**, v.184, p. 517-523, jul. 2019.

IWASA, K. et al. Revival of favus in Japan caused by *Trichophyton schoenleinii*. **Journal of Dermatology**, p. 1-4, jan. 2019.

KANDEMIR, H. et al. Polyphasic Discrimination of *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum* from Humans and Horses. **Mycopathologia**, v.185, p. 113-122, jul, 2019.

KANO, R.; KIMURA, U.; KAKURAI, M.; HIRUMA, J.; KAMATA, H.; SUGA, Y.; HARADA, K. *Trichophyton indotinea* sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. **Mycopathologia**, v. 185, p. 947-958, 2020.

KIM, J. et al. Tinea corporis due to *Trichophyton erinacei* Propably transmited from a hedgehog: The second case report from Japan. **Medical Mycology Journal**, v. 59(4), p. 77-79, 2018.

KLINGER, M.; THEILER, M.; BOSSHARD, P.P. Epidemiological and clinical aspects of *Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale* infections in the Zurich area: a retrospective study using genotyping. **Journal of the European Academy of Dermatology Venereology**, v.35, p. 1017-1025, 2021.

KROMER, C. et al. *Trichophyton erinacei* Transmitted to a Pregnant Woman from Her Pet Hedgehogs. **JAMA Dermatology**, v. 154(8), p. 967-968, 2018.

KUPSCH, C., GRASER, Y. Genomnachweis von Dermatophyten: Aktuelle Erkenntnisse aus dem Ringversuch. **Der Hautarzt**, v. 70, p. 627-637, jun. 2019.

KUSTARK, E. **Imunology of fungal diseases**. New York: Marcel Dekker, v.47, 1989.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. 1992. Dermatophytoses, p. 105-161. In K. J. KwonChung and J. E. Bennett (ed.), **Medical mycology-1992**. Lea; Febiger, Philadelphia, Pa.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micología Médica Lacaz**. 9a ed., São Paulo: Sarvier, 2002

LI, H. et al. Human pathogenic fungus *Trichophyton schoenleinii* activates the NLRP3 inflammasome. **Protein Cell**, v. 4(7), p. 529-538, 2013.

LIMA, M. et al. Investigation of the antifungal potential of linalool against clinical isolates of fluconazole resistant *Trichophyton rubrum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 669, p 1-8, 2017.

LIU, T. et al. Identification and characterisation of non-coding small RNAs in the pathogenic filamentous fungus *Trichophyton rubrum*. **BMC Genomics**, v. 14(931), p. 1-11, 2013.

MAGAGNIN, C.M.; STOPIGLIA, C.D.; VIEIRA, F.J.; HEIDRICH, D.; MACHADO, M.; VETORATTO, G.; LAMB, F.M.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal susceptibility profile of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 694-701, 2011.

MARTINEZ-ROSSI, N.M.; PERES, N.T.; ROSSI, A. Antifungal Resistance Mechanisms in Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, p.369-383, 2008.

MERCER, D.K.; STEWART, C.S. Keratin hydrolysis by dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 57(1), p. 13-22, 2018.

MOCHIZUKI, T. et al. Simple identification of *Trichophyton tonsurans* by chlamydospore-like structures produced in culture media. **The Journal of Dermatology**, v.40(12), p. 1027-1032, dec, 2013.

MOCHIZUKI, T., TAKEDA, K., ANZAWA, K. Molecular Markers Useful for Intraspecies Subtyping and Strain Differentiation of Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182 (1-2), p. 57-65, jul. 2016.

MORALES, E. G. et al. *Trichophyton violaceum*: An Emerging Pathogen in Southern Switzerland. **Dermatology**, p. 1-6, feb. 2019.

MOSKALUK, A.E.; VANDEWOODE, S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. **Pathogens** 2022, v. 11, p. 1-23, 2022.

NENOFF, P.; HERRMANN, J.; GRASER, Y. *Trichophyton mentagrophytes* sive *interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 5, p. 198-202, 2007.

NENOFF, P. et al. Tinea capitis und Onychomycose durch *Trichophyton soudanense*. **Der Hautarzt**, v. 69, p. 737-750, mar. 2018.

NENOFF, P.; VERMA, S.B.; VASANI, R.; BURMESTER, A.; HIPLER, U.C.; WITTIG, F.; KRÜGER, C.; NENOFF, K.; WIEGAND, C.; SARASWAT, A.; MADHU, R.; PANDA, S.; DAS, A.; KURA, M.; JAIN, A.; KOCH, D.; GRÄSER, Y., UHRLAß, S. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*-A molecular study. **Mycoses**, v. 62, p. 336-356, 2020.

OYARZO, P. V., CHOAPPA, R.C., DUARTE, E. A. Diferenciación morfológica y molecular por curvas de melting de alta resolución (HRMA) y secuenciación del complejo *Trichophyton mentagrophytes* en cepas humanas en Valparaíso, Chile. **Revista Argentina de Microbiología**, p. 1-8, may. 2020.

OYEKA, I. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.78, p. 60-65, dez. 2000.

PCHELIN, I. M. et al. Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. **Mycoses**, v. 59(9), p. 566-575, 2016.

PCHELIN, I. M. et al. Species boundaries in the *Trichophyton mentagrophytes* / *T. interdigitale* species complex. **Medical Mycology**, v. 0, p. 1-9, dec. 2018.

PACKEU, A. et al. Lineages Within the *Trichophyton rubrum* Complex. **Mycopathologia**, v. 185, p. 123-136, oct. 2019.

PASHOOTAN, N.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; NUSRATI, A.C.; SALEHI, Z.; ASMAR, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Phylogeny, Antifungal Susceptibility, and Point Mutations of SQLE Gene in Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Clinical Dermatophytosis. **Front Cell Infect Microbiol.**, v.12, p. 1-10, 2022.

PEREIRA, F.; MENDES, J.M.; LIMA, E. de O. Investigation on mechanism of antifungal activity of eugenol against *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v. 51, p. 507-513, jul. 2013.

PERES, N.T. de A. et al. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, 85(5): 657-667, 2010.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Phenotypic and Genotypic Identification of Dermatophytes from Mexico and Central American Countries. **Journal of Fungi**, v. 9, p. 1-17, 2023.

PHAITOONWATTANAKIJ, S. et al. *Trichophyton erinacei* Onychomycosis: The First to Evidence a Proximal Subungual Onychomycosis Pattern. **Case Reports in Dermatology**, v. 11, p. 198-203, jul. 2019.

PHILPOT, C. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *Trichophyton rubrum* by a single urease test. **Sabouraudia**, v.5, p.189-193, feb.1967.

PINTO, S. M. L. et al. Semisynthetic eugenol derivatives as antifungal agents against dermatophytes of the genus *Trichophyton*. **Journal of Medical Microbiology**, 68: 1109-1117, 2019.

PRICE, M.; WILKINSON, I.; GENTRY, L. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v.20, n.1, p.7-14, mar.1982.

RAMARAJ, V. et al. Molecular strain typing of *Trichophyton mentagrophytes* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*) using non-transcribed spacer region as a molecular marker. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 146(5), p. 636-641, nov. 2017.

REZENDE, C.; AMADO, F.G.; MENDONÇA, L.C.; LIMA, W.P. Incidence of dermatophytes in lesions suggestive of Dermatophytosis in the population of Votuporanga - São Paulo. **Rev. Científ. Multid. Cent. Universit.**, v. 4, p. 23-29, 2009.

RUDRAMURTHY, S. et al. Mutation in the Squalene Epoxidase Gene of *Trichophyton interdigitale* and *Trichophyton rubrum* Associated with Allylamine Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62(5), p. 1-9, may. 2018.

- SABOU, M. et al. Molecular identification of *Trichophyton benhamiae* in Strasbourg, France: a 9-year retrospective study. **Medical Mycology**, v. 0, p. 1-12, 2017.
- SALCI, T.P.; MARCON, S.S.; SVIDZINSK, T.I.E.; SALCI, M.A.; SALINEIRO, P.H.B. *Trichophyton tonsurans* in a family microepidemic. **An Bras Dermatol.**, v.86, p.1003-1006, 2011.
- SALEHI, Z.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Antifungal drug susceptibility profile of clinically important dermatophytes and determination of point mutations in terbinafine-resistant isolates. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 37, p.1841-1846, 2018.
- SALEHI, Z., SHAMS-GHAHFAROKHI, M., RAZZAGHI-ABYANEH, M. Internal Transcribed Spacer rDNA and TEF-1 α Gene Sequencing of Pathogenic Dermatophyte Species and Differentiation of Closely Related Species Using PCR-RFLP of The Topoisomerase II. **Cell Journal**, v. 22 (1), p. 85-91, apr. 2020.
- SANGUINO, T.C., JARROS, I.C., NEGRI, M. Occurrence of dermatophytoses in patients from the Sistema Único de Saúde. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94 (3), p. 293-297, 2019.
- SANTOS, J. I. dos., COELHO, M. P.P., NAPPI, B. P. Dermatophitosis' laboratorial diagnosis, **RBAC**, v.34(1), p.3-6, 2002.
- SATO, T. et al. Onychomycosis of the Middle Finger of a Japanese Judo Athlete due to *Trichophyton tonsurans*. **Medical Mycology Journal**, v. 60(1), p. 1-4, 2019.
- SHAW, D. et al. MIC and Upper Limit of Wild-Type Distribution for 13 Antifungal Agents against a *Trichophyton mentagrophytes-Trichophyton interdigitale* Complex of Indian Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64 (4), p. 1-11, 2020.
- SEM, S. et al. Sophorolipid Biosurfactant Can Control Cutaneous Dermatophytosis Caused by *Trichophyton mentagrophytes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, mar. 2020
- SHAMSIZADEH, F. et al. DNA Topoisomerase 2 Gene Polymorphism in Dermatophytes. **Mycoses**, apr. 2020.
- SHARMA, R. et al. A Pilot Study for the Evaluation of PCR as a Diagnostic Tool in Patients with Suspected Dermatophytoses. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 8(3), p.176-180, 2017.
- SIDRIM, J.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**, 1 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A., 1999. p.50-61.
- SIDRIM, J., ROCHA, M. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 388p.
- SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F.; LEITE, J.J.; MARANHÃO, F.C.; LIMA, R.A.; CASTELO-BRANCO, D.S.; BANDEIRA, T.J.; CORDEIRO, R.A.; BRILHANTE, R.S. *Trichophyton tonsurans* strains from Brazil: phenotypical heterogeneity, genetic homology and detection of virulence genes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, p. 754-760, 2013.

SILVA, C.S.; NEUFELD, P.M.; GOUVÉA, E.H.; ABREU, P.A. Etiology and epidemiology of tinea capitis: case-serie report and literature review. **RBAC**, v.51, p. 9-16, 2019.

SILVA-ROCHA, W.P.; AZEVEDO, M.F.; CHAVES, G.M. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. **Journal of Mycology Medical**, v. 27, p.57-64, 2017.

SILVA, K. A. da. et al. Diagnosed dermatophytosis etiology in patients at the Laboratory of Medical Mycology at the Center of Biosciences of the Federal University of Pernambuco, in 2014-2017. **RBAC**, v. 50(1), p. 33-37, 2018.

SILVA, E.S.; PINTO, D.S.; SANTOS-NETO, A.G.; ALMEIDA-JUNIOR, E.C.; SANTOS, T.B.; ROCHA, F.S.; SANTOS, A.F.; ARAÚJO, E.S. Clinical aspects of the incident of dermatophytoses in the State of Sergipe, Brazil. **Research Society and Development**, v. 10, p. 1-11, 2021.

SINGH, A.; MASIH, A.; KHURANA, A.; SINGH, P.K.; GUPTA, M.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; CHOWDHARY, A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the Squalene epoxidase (SQLE) gene. **Mycoses**, v. 61, p.477-484, 2018.

SINGH, S. et al. In vitro susceptibility of dermatophytes to oral antifungal drugs and amphotericin B in Uttar Pradesh, India. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 85(4), p. 388-392, 2019.

SIOPI, M.; EFSTATHIOU, I.; THEODOROPOULOS, K.; POURNARAS, S.; MELETIADIS, J. Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Trichophyton* Isolates in Greece: Emergence of Terbinafine-Resistant *Trichophyton mentagrophytes* Type VIII Locally and Globally. **Journal of Fungi**, v. 7, p. 1-23, 2021.

SONG, X. et al. In vivo antifungal activity of dipyrithione against *Trichophyton rubrum* on guinea pig dermatophytosis models. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 558-564, 2018.

SU, H. et al. Species Distinction in the *Trichophyton rubrum* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57 (9), p. 1-14, aug. 2019.

SÜß, A.; UHRLAß, S.; LUDES, A.; VERMA, S.B.; MONOD, M.; KRÜGER, C.; NENOFF, P. Extensive tinea corporis due to a terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* isolate of the Indian genotype in a young infant from Bahrain in Germany. **Der. Hautarzt**, v. 70, p. 888-896, 2019.

SUH, S., GROSSO, K. M., CARRION, M. E. Multilocus phylogeny of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex and the application of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for the rapid identification of dermatophytes. **Mycologia**, v. 110(1), p. 118-130, jun. 2018.

TAGHIPOUR, S.; PCHELIN, I.M.; MAHMOUDABADI, A.Z.; ANSARI, S.; KATIRAEI, F.; RAFIEI, A.; SHOKOHI, T.; ABASTABAR, M.; TARASKINA, A.E.; KERMANI, F.; DIBA, K.; NOURIPOUR-SISAKHT, S.; NAJAFZADEH, M.J.;

PAKSHIR, K.; ZOMORODIAN, K.; AHMADIKIA, K.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A. *Trichophyton mentagrophytes* and *T. interdigitale* genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations. **Mycoses**, v. 62, p. 1084-1091, 2019.

TANG, C.; KONG, X.; AHMED, S.A.; THAKUR, R.; CHOWDHARY, A.; NENOF, P.; UHRLASS, S.; VERMA, S.B.; MEIS, J.F.; KANDEMIR, H.; KANG, Y.; DE HOOG, G.S. Taxonomy of the *Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale* Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype *T. indotinea*. **Mycopathologia**, v. 315-326, 2021.

TARTOR, Y. H., HASHEM, M. E., ENANY, S. Towards a rapid identification and a novel proteomic analysis for dermatophytes from human and animal dermatophytosis. **Mycoses**, v. 0, p. 1-11, 2019.

THAKUR, R., KALSI, A.S. Outbreaks and Epidemics of Superficial Dermatophytosis Due To *Trichophyton mentagrophytes* Complex And *Microsporum canis*: Global And Indian Scenario. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 12, p. 887-893, 2019.

WAGNER, D. K.; SOHNLE, P. G. Cutaneous defenses against Dermatophytes and yeasts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.8, p.317-35, 1995.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. London: Academic Press. 1990; 315–322

WIEGAND, C. et al. *Trichophyton violaceum*: Main cause of tinea capitis in children at Mbarara Regional Referral Hospital in Uganda. **Der Hautarzt**, v. 67(9), p. 712-717, 2016.

WEITZMAN, I., SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8(2), p. 240-259, apr. 1995.

WOODGYER, A. The curious adventures of *Trichophyton equinum* in the realm of molecular biology: a modern fairy tale. **Medical Mycology**, v. 42(5), p. 397-403, oct, 2004.

YAMADA, T. et al. Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61(7), p. 115-117, jul. 2017.

YO, A. et al. Detection and identification of *Trichophyton tonsurans* from clinical isolates and hairbrush samples by loop-mediated isothermal amplification system. **Journal of Dermatology**, v.43, n.9, p.1037-43, sep. 2016.

ZAITZ, C.; MARQUES, S. A.; RUIZ, L. R. B.; SOUZA, V. M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: MEDSI; p.81-4, 1998.

ZANARDI, D. et al. Evaluation of the diagnostic methods of onychomycosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83(2), p. 119-124, 2008.

ZHAN, P. et al. Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*. **Studies in Mycology**, v. 89, p. 153-175, 2018.

ZHANG, X. et al. Metalloprotease genes of *Trichophyton mentagrophytes* are important for pathogenicity. **Medical Mycology**, v. 52(1), p. 36-45, jan. 2014.

ZHANG, X. et al. Transcriptome sequencing and analysis of zinc-uptake-related genes in *Trichophyton mentagrophytes*. **BMC Genomics**, v. 18, p. 1-12, 2017.

ZHANG, M. et al. Simultaneous dermatophytosis and keratomycosis caused by *Trichophyton interdigitale* infection: a case report and literature review. **BMC Infectious Diseases**, v. 19 (983), p. 1-8, 2019.

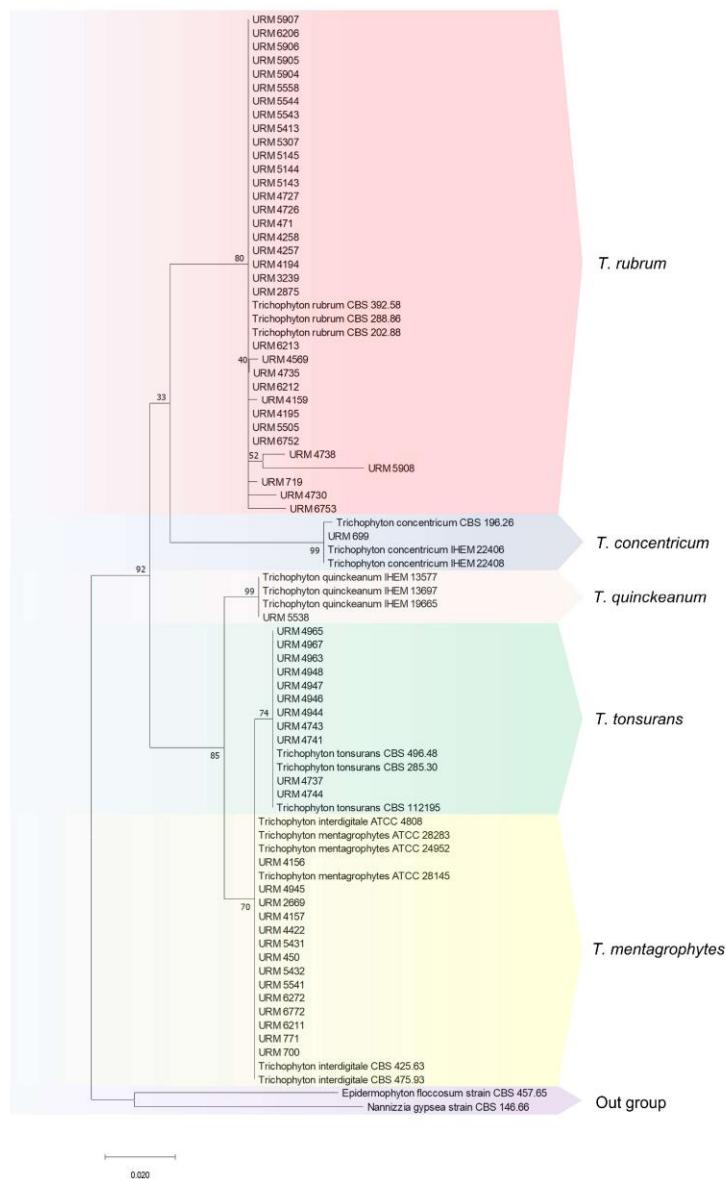
ZHENG, H. et al. Assembly and analysis of the whole genome of *Arthroderma uncinatum* strain T10, compared with *Microsporum canis* and *Trichophyton rubrum*. **Mycoses**, mar. 2020.

ZHENG, Y. et al. Adult black dot tinea capitis caused by *Trichophyton tonsurans* complicated with herpes zoster. **Chinese Medical Journal**, v. 133(1), p. 91-93, 2020.

ZIOŁKOWSKA, G.; NOWAKIEWICZ, A.; GNAT, S.; TROSCIANCZYK, A.; ZIEZBA, P.; DZIEDZIC, B.M.; Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. **Mycoses**, v.58, p.119-126, 2015.

APÊNDICE A – Figura 8

Figura 8 - Análise filogenética de 61 sequências de DNA da região ITS da espécie *Trichophyton* da coleção de culturas Micoteca URM, Pernambuco, Brasil. Os ramos são agrupados em uma escala de cores análoga à espécie e demonstram a presença de 5 espécies (*T. mentagrophytes*/*T. interdigitale* [amarelo], *T. quinckeanum* [cinza], *T. tonsurans* [verde], *T. concentricum* [azul] e *T. rubrum* [vermelho]). As espécies *Nannizzia gypsea* e *Epidermophyton floccosum* [roxo] são utilizadas como grupo externo. A análise foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo Kimura de 2 parâmetros. Sequências de referência de ITS (20 sequências) foram nomeadas conforme números de acesso do GenBank, NCBI.



APÊNDICE B - Figura 9

Figura 9 - Análise filogenética de 61 sequências de DNA do gene TUB (Tubulina) da espécie *Trichophyton* da coleção de culturas URM, Pernambuco, Brasil. Os ramos são agrupados em uma escala de cores análoga à espécie e demonstram a presença de 5 espécies (*T. mentagrophytes*/*T. interdigitale* [amarelo], *T. quinckeum* [cinza], *T. tonsurans* [verde], *T. concentricum* [azul] e *T. rubrum* [vermelho]). As espécies *Nannizzia gypsea* e *Epidermophyton floccosum* [roxo] são utilizadas como grupo externo. A análise foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança e modelo Kimura de 2 parâmetros. Sequências de referência do TUB (20 sequências) foram nomeadas conforme números de acesso do GenBank,NCBI.

