

# Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol

## *In vitro* susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole

Ana Raquel Mano Meinerz<sup>1</sup>, Patrícia da Silva Nascente<sup>2</sup>, Luiz Filipe Damé Schuch<sup>2</sup>, Marlete Brum Cleff<sup>1</sup>, Rosema Santin<sup>2</sup>, Cristiane da Silva Brum<sup>2</sup>, Márcia de Oliveira Nobre<sup>2</sup>, Mario Carlos Araújo Meireles<sup>2</sup> e João Roberto de Braga Mello<sup>1</sup>

### RESUMO

O estudo objetiva determinar a atividade *in vitro* da terbinafina e itraconazol através da técnica de microdiluição em caldo (NCCLSM27-A2) adaptado para um fungo dimórfico frente a 12 isolados de *Sporothrix schenckii*, sendo seis de esporotricose felina, três de esporotricose humana, um isolado de cão e dois isolados humanos provenientes do Instituto Oswaldo Cruz (IOC). O inóculo e as concentrações antifúngicas foram distribuídas em microplacas, as quais foram incubadas a 35°C por cinco dias, quando foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima. A concentração inibitória mínima para a terbinafina variou de 0,055µg/ml a 0,109µg/ml e para o itraconazol de 0,219µg/ml a 1,75µg/ml, sendo que para ambos os fármacos as CIMs entre os isolados do IOC foi de 0,875µg/ml. O estudo demonstrou uma alta suscetibilidade do *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina, necessitando mais estudos que correlacionem os testes *in vitro* frente ao fármaco com a resposta clínica em pacientes com esporotricose.

**Palavras-chave:** *Sporothrix schenckii*. Suscetibilidade. Terbinafina. Itraconazol.

### ABSTRACT

The study objective was to determine the *in vitro* activity of terbinafine and itraconazole through the microdilution technique in broth (NCCLSM27-A2), adapted for dimorphic fungus, in relation to 12 isolates of *Sporothrix schenckii*. Six were from feline sporotrichosis, three from human sporotrichosis, one from a dog and two from human isolates originating from Instituto Oswaldo Cruz. The inoculum and antifungal concentrates were distributed on microplates that were incubated at 35°C for five days. Minimum inhibitory concentration readings were made at the end of this period. The MIC for terbinafine ranged from 0.055µg/ml to 0.109µg/ml, and the MIC for itraconazole ranged from 0.219µg/ml to 1.75µg/ml. For both drugs, the MIC from the isolates from IOC was 0.875µg/ml. The present study demonstrates the high susceptibility of *Sporothrix schenckii* to terbinafine. Further studies to correlate the *in vitro* susceptibility tests with the clinical response of patients with sporotrichosis are needed.

**Key-words:** *Sporothrix schenckii*. Susceptibility. Terbinafine. Itraconazole.

A esporotricose, micose subcutânea de evolução subaguda a crônica, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* acomete o homem e várias espécies de animais. O felino doméstico representa importante papel na transmissão do agente a outros animais e para o homem, sendo que os relatos zoonóticos envolvendo essa espécie animal demonstra que o homem adquire a micose através de arranhadura, mordedura ou pela contaminação por solução de continuidade cutânea preexistente.

A transmissão é facilitada devido a grande quantidade de células leveduriformes presentes nas lesões cutâneas dos felinos com esporotricose<sup>1 2 22</sup>.

O tratamento da esporotricose é realizado, freqüentemente, com itraconazol, sendo este considerado atualmente o fármaco de eleição para as formas cutâneas e linfocutâneas da micose em humanos<sup>9</sup>. Porém, devido ao seu uso indiscriminado, têm sido freqüentes os relatos de isolados resistentes ao fármaco, levando

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Pelotas, RS. 2. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

**Endereço para Correspondência:** Dra. Ana Raquel Mano Meinerz. Rua Santa Cruz, 2530, 96015-710 Pelotas, RS.

Tel: 55 53 3275-7496

Recebido para publicação em 31/7/2006

Aceito em 18/1/2007

conseqüentemente a falhas terapêuticas e remissão da micose tanto nos homens como em animais<sup>19 21</sup>.

A terbinafina, antifúngico do grupo das alilaminas, demonstrou em vários estudos *in vitro* ação primária fungicida frente a fungos dimórficos, incluindo *S. schenckii*, não demonstrando problemas de resistência frente ao agente, além de efeitos tóxicos reduzidos quando comparado ao itraconazol<sup>5 7 9 10 14 17 20</sup>.

Considerando a esporotricose como uma micose zoonótica intensamente importante aos animais e homens, especialmente imunodeprimidos e a problemática em relação ao tratamento da micose, o estudo tem como objetivo avaliar a suscetibilidade de *S. schenckii* frente à terbinafina e itraconazol através da técnica de microdiluição em caldo descrita pelo documento NCCLSM27-A2, adaptada para um fungo dimórfico<sup>15</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 12 isolados clínicos de *Sporothrix schenckii*, sendo seis casos de esporotricose felina, três de esporotricose humana, um proveniente de um caso da micose em cão e dois casos de esporotricose humana oriundas do Instituto Oswaldo Cruz (IOC 1824 e IOC 1226). Os isolados foram mantidos na sua fase miceliana e leveduriforme através de subculturas para tubos com meio Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de cicloheximida, sendo mantidas sob refrigeração em temperatura média de 4°C.

Os isolados de *S. schenckii* foram estudados quanto à suscetibilidade frente ao itraconazol (Janssen Pharmaceutical) e terbinafina (Novartis Research Institute) através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento NCCLSM27-A2 adaptada para um fungo dimórfico<sup>15</sup>.

A partir da solução mãe dos fármacos terbinafina e itraconazol nas concentrações de 1.600µg/ml, foram realizadas nove diluições seriadas em DMSO alcançando uma concentração final dos antifúngicos de 3µg/ml. Essas concentrações foram diluídas a 1% cada, em meio RPMI 1.640 (GIBCO), estabelecendo concentrações com intervalos de 16µg/ml a 0,03µg/ml, as quais foram distribuídas em microplacas no sentido das colunas, em volume de 100µl<sup>15</sup>.

Os inóculos fúngicos, referentes aos isolados testados, foram preparados a partir de colônias jovens da fase leveduriforme de *S. schenckii*, as quais foram obtidas a partir do cultivo do agente em meio *Brain Heart Infusion* (BHI), sendo incubado a 37°C sob agitação branda (40 ciclos/minutos), durante 10 dias. Após este período, as colônias foram filtradas em camada dupla de gaze estéril, centrifugadas (1.500rpm/15 minutos) e lavadas duas vezes com solução salina tamponada (PBS), sendo desprezado o sobrenadante<sup>16</sup>. As células leveduriformes foram ressuspensas com solução salina estéril, homogeneizadas, sendo o inóculo ajustado a turbidez do tubo 0,5 da escala de MacFarland. Essa suspensão fúngica foi diluída em solução salina estéril (diluição 1:50), homogeneizada em agitador e submetida a diluição em meio RPMI 1.640 (diluição 1:20), sendo então distribuída no sentido das fileiras nas microplacas<sup>15</sup>.

Os testes de suscetibilidade antifúngica foram realizados em duplicata, sendo uma coluna da microplaca para o controle positivo, preenchida com meio RPMI 1.640 e inóculo fúngico e outra coluna referente ao controle negativo, contendo o meio RPMI 1.640<sup>15</sup>.

As microplacas foram incubadas a 35°C, por cinco dias, quando foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM). A leitura da CIM foi visual, correspondendo à menor concentração do antifúngico em que não houve crescimento visível do *S. schenckii* quando comparado ao controle-positivo<sup>23</sup>.

## RESULTADOS

A concentração inibitória mínima (CIM) para a terbinafina verificada entre todos os isolados estudados dos casos de esporotricose felina variaram de 0,055µg/ml a 0,109µg/ml, enquanto para os isolados provenientes de casos clínicos de esporotricose humana e canina resultaram em CIM de 0,055µg/ml e para os isolados IOC (1824 e 1226) foram de 0,875µg/ml (Tabela 1).

Em relação ao itraconazol, a CIM frente aos isolados de esporotricose felina foi de 0,875µg/ml a 1,75µg/ml, já para os casos de esporotricose humana os valores da CIM foram de 0,219µg/ml. Para o isolado do caso clínico de esporotricose canina foi observada uma CIM do itraconazol de 1,75µg/ml enquanto para os isolados provenientes do IOC (1824 e 1226) resultaram em valores de CIMs de 0,875µg/ml (Tabela 1).

**Tabela 1 - Concentração inibitória mínima da terbinafina e itraconazol frente a isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* através da técnica de microdiluição em caldo.**

<i>Sporothrix schenckii</i>	Concentração inibitória mínima	
	itraconazol (µg/ml)	terbinafina (µg/ml)
1*	0,875	0,109
2*	0,875	0,109
3*	0,219	0,055
4*	1,75	0,055
5*	1,75	0,055
6*	1,75	0,055
7**	0,219	0,055
8**	0,219	0,055
9**	0,219	0,055
10***	1,75	0,055
11****	0,875	0,875
12****	0,875	0,875

\*Isolado obtido de esporotricose felina. \*\* Isolado obtido de esporotricose humana.

\*\*\*Isolado obtido de esporotricose canina. \*\*\*\*Isolado obtido do Instituto Oswaldo Cruz (IOC)

## DISCUSSÃO

Mesmo não existindo um ponto de corte que estabeleça quais os valores da que determinam a sensibilidade ou resistência do *S. schenckii* frente a terbinafina, estudos consideram que valores

de CIM entre 0,1 a 0,4µg/ml estão associados à sensibilidade do agente frente ao fármaco. Os resultados observados no estudo demonstram uma intensa atividade *in vitro* da terbinafina frente aos isolados de campo de *S. schenckii* com valores de CIM mais baixos em relação ao itraconazol. Outros autores observaram resultados semelhantes, obtendo uma CIM menor ou igual aos antifúngicos recomendados para o tratamento da esporotricose, demonstrando ainda, uma atividade fungicida inicial da terbinafina frente ao agente<sup>7 8 12 17 18</sup>.

Assim, como para a terbinafina, também não há padronização de um valor da CIM para o itraconazol, que identifique resistência ou sensibilidade ao *S. schenckii*. No entanto, é preconizado que a suscetibilidade do agente frente ao fármaco traduz em CIM menor ou igual a 1µg/ml<sup>13 18</sup>. Considerando esses valores de CIM para o itraconazol, frente ao agente, o estudo observou sensibilidade em três isolados de esporotricose felina e em todos os isolados humanos avaliados, assim como para as cepas do IOC. Contudo, foi verificada resistência frente ao isolado de cão e para os demais isolados provenientes de esporotricose felina. Outros estudos confirmaram a boa atividade *in vitro* do fármaco frente ao *S. schenckii*, sendo considerado o tratamento de eleição para as formas cutânea e cutânea-linfática da micose em humanos<sup>4 10 11</sup>. Porém, têm sido demonstrados casos de resistência *in vitro* ao fármaco, resultando em CIMs de 4µg/ml para isolados de felinos com a forma sistêmica da micose<sup>12</sup>.

No estudo, foi observada grande amplitude de valores da CIM tanto para a terbinafina como para o itraconazol frente ao *S. schenckii*, coincidindo com outros estudos que determinaram à suscetibilidade do agente frente a esses antifúngicos. É importante considerar que não existe padronização para as técnicas de antifungograma frente aos fungos dimórficos, sendo que a dificuldade de avaliar testes de suscetibilidade para essa classe de fungos está na padronização do inóculo, quando utilizado a sua fase filamentosa ou ainda no lento crescimento do microrganismo no caso de utilizar a sua fase leveduriforme<sup>6 11 12 13 18</sup>.

As análises realizadas no presente estudo permitem concluir que os isolados de campo do *Sporothrix schenckii* demonstraram intensa suscetibilidade *in vitro* frente à terbinafina, o que impulsiona mais investigações, inclusive estudos *in vivo*, que confirmem a potencialidade terapêutica da terbinafina frente ao agente. O estudo também ressalta a necessidade da padronização dos testes de suscetibilidade para os fungos dimórficos.

## REFERÊNCIAS

1. Barros MBL, Schubach AO, Do Valle ACF, Galhardo MCG, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases Society of America* 38: 529-535, 2004.
2. Barros MBL, Schubach TMP, Galhardo MCG, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF,

- Wanke B, Do Valle ACF. Sporotrichosis: na emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96: 777-779, 2001.
3. Bustamante B, Campos PE. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2: 85-94, 2004.
4. Catalán M, Monteiro JC. Antifúngicos sistêmicos. *Revista Iberoamericana de Micologia* 23: 39-49, 2006.
5. Coskun B, Saral Y, Akpolat N, Ataseven A, Çicek D. Sporotrichosis successfully treated with terbinafina and potassio iodide: case report and review of the literature. *Mycopathologia* 158: 53-56, 2004.
6. Espinel-Ingroff A. Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH 56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743.872) and LY303366 against opportunistic filamentous fungi and dimorphic fungi and yeasts. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 2950-2956, 1998.
7. Hay RJ. Therapeutic potential of terbinafina in subcutaneous and systemic mycoses. *British Journal of Dermatology* 141: 36-40, 1999.
8. Hull PR, Vismar HR. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafina. *British Journal of Dermatology* 126: 51-55, 1992.
9. Johnson M, Macdougall C, Perfect J, Rex J. Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 693-715, 2004.
10. Kauffman CA, Hajjeh R, Chapman SW. Practice Guidelines for the management of patients with sporotrichosis. *Clinical Infectious Diseases* 30: 684-687, 2000.
11. Koç NA, Uksal U, Oymak O. Case report. Successfully treated subcutaneous infection with *Sporothrix schenckii* in Turkey. *Mycoses* 44: 330-333, 2001.
12. Kohler LMM, Monteiro PCF, Hahn RC, Handam JS. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafina. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4319-4320, 2004.
13. McGinnis MR, Nordoff N, Passarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Medical Mycology* 39: 369-371, 2001.
14. Morishita N, Yamazaki K, Ninomiya J, Hamaguchi T, Sei Y, Takiuchi, I. A case of lymphocutaneous sporotrichosis. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 42:149-154, 2001.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeast. Approved standards M27. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pennsylvania, 1997.
16. Nobre MO, Antunes TA, Oliveira IA, Berg V, Lucia, TJ, Fernandes CG, Meireles MCA, Ferreira L. Development of experimental sporotrichosis in a murine model with yeast and mycelial forms of *Sporothrix schenckii*. *Acta Scientiarum Veterinariae* 31: 161-166, 2003.
17. Perez A. Terbinafina: broad new spectrum of indications in several subcutaneous and systemic and parasitic diseases. *Mycoses* 42: 111-114, 1999.
18. Rex JH, Pfaler MA, Walsh TJ, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A. Antifungal Susceptibility testing: practical aspects and current challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 14: 643-658, 2001.
19. Rochette F, Engelen M, Vanden Bosschem H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. *Journal Veterinary Pharmacology* 26: 31-53, 2003.
20. Ryder NS, Leitner I. Synergic interaction of terbinafina with triazoles or amphotericin B against *Aspergillus* species. *Medical Mycology* 39: 91-95, 2001.
21. Schubach TMP, Schubach AO, Barros TMBLK, Figueiredo FB, Cuzzi T, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Perez MA. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224: 1623-1629, 2004.
22. Schubach TMP, Schubach AO, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro TF, Barros MBL, Brusteim R, Zancopé-Oliveira RM, Monteiro PCF, Wanke B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Mycopathologia* 153: 83-86, 2001.
23. Trilles L, Fernandez Torres B, Lazéra MS, Wanke B, Schubach AO, Paes R, Inza I, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 9: 3952-3954, 2005.