

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DAS ESPÉCIES FÚNGICAS CAUSADORAS DE MICOSES
SUPERFICIAIS EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM UM AMBULATÓRIO DE
REFERÊNCIA DE PORTO ALEGRE**

RODRIGO VETTORATO

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**ESTUDO DAS ESPÉCIES FÚNGICAS CAUSADORAS DE MICOSES
SUPERFICIAIS EM PACIENTES COM HANSENÍASE EM UM AMBULATÓRIO DE
REFERÊNCIA DE PORTO ALEGRE**

RODRIGO VETTORATO

Orientadora: Prof.^a Dra. Maria Lúcia
Scroferneker

Coorientadora: Dra. Letícia Maria Eidt

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Medicina:
Ciências Médicas, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Vettorato, Rodrigo
Estudo das espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase em um ambulatório de referência de Porto Alegre / Rodrigo Vettorato. -- 2021.
165 f.
Orientadora: Maria Lúcia Scroferneker.

Coorientadora: Letícia Maria Eidt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. hanseníase. 2. onicomicose. 3. tinea pedis. 4. suscetibilidade antifúngica. 5. dermatófitos. I. Scroferneker, Maria Lúcia, orient. II. Eidt, Letícia Maria, coorient. III. Título.

RESUMO

Introdução: A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*, caracterizada por lesões na pele e nervos periféricos. O tratamento é realizado com esquema de poliquimioterapia, incluindo rifampicina, clofazimina e dapsona. Corticosteroides também são utilizados para tratar a neuropatia e as reações hansênicas. O uso de antibióticos e corticosteroides, em combinação com a presença de lesões na pele, predispõem os pacientes com hanseníase a diversas infecções oportunistas, como as micoses superficiais. Essas micoses têm prevalência estimada em 20 a 25% da população mundial e os tipos mais comuns são onicomicose e *tinea pedis*. O tratamento é realizado com antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos; no entanto, pode ser ineficiente devido ao crescente problema de resistência antifúngica, entre outros fatores.

Objetivo: Determinar a prevalência das espécies fúngicas causadoras de onicomicose e *tinea pedis* em pacientes com hanseníase e avaliar sua suscetibilidade antifúngica *in vitro*.

Métodos: Estudo transversal que incluiu 95 pacientes com hanseníase e 91 pacientes sem hanseníase (grupo controle), com lesões características de onicomicose e *tinea pedis*. Raspados de pele e cortes das unhas foram analisados através de exame micológico direto e cultura. Se o paciente apresentava mais de um local de lesão, cada amostra foi coletada e analisada separadamente. Os materiais foram cultivados em ágar Sabouraud dextrose e os isolados fúngicos foram identificados através do sequenciamento da região ITS (*internal transcribed spacer*) do rDNA. Os testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* foram realizados com os protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As comparações das proporções foram feitas com o teste qui-quadrado no *software* SPSS v.22 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA).

Resultados: Ocorreu crescimento fúngico em 48 amostras de 40 pacientes com hanseníase e em 46 amostras de 43 pacientes do grupo controle. A maior parte das amostras foi de casos de onicomicose, no entanto, pacientes com hanseníase apresentaram mais casos de *tinea pedis* ($p < 0.05$). Destes pacientes, 27 (67,5%) apresentavam forma clínica virchowiana e 20 (50%) possuíam algum tipo de reação hansênica no momento da coleta. Em ambos os grupos, o principal fungo identificado foi *Trichophyton interdigitale*, não sendo encontradas variações na distribuição dos agentes etiológicos. A suscetibilidade antifúngica não apresentou grandes variações. Porém, para os isolados de *T. interdigitale* e o antifúngico itraconazol, as

concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os pacientes com hanseníase foram maiores que para o grupo controle ($p < 0.05$).

Conclusão: Este foi o primeiro estudo a analisar prospectivamente casos de onicomicose e *tinea pedis* na hanseníase. Esses pacientes são muito suscetíveis a micoses superficiais, o que foi comprovado pelos resultados deste estudo, nos quais 26,3% dos pacientes com hanseníase apresentavam ao menos um tipo de lesão. Apesar de não terem sido encontradas diferenças marcantes na suscetibilidade antifúngica, a efetividade reduzida *in vitro* do itraconazol merece destaque. Estudos posteriores, com um maior número de pacientes, além de correlações entre a suscetibilidade antifúngica *in vitro* e as respostas *in vivo* dos tratamentos, são necessários para determinar a significância clínica destes achados iniciais.

Palavras-chave: hanseníase; onicomicose; *tinea pedis*; suscetibilidade antifúngica; dermatófitos.

ABSTRACT

Background: Leprosy is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae*, characterized by lesions in the skin and peripheral nerves. Treatment is performed with a multidrug regimen, including rifampicin, clofazimine and dapson. Corticosteroids are also used to treat leprosy neuropathy and reactions. The use of antibiotics and corticosteroids, in combination with the presence of skin lesions, predispose leprosy patients to various opportunistic infections, such as superficial mycoses. These mycoses have an estimated prevalence of 20 to 25% of the world population and the most common types are onychomycosis and *tinea pedis*. Treatment is performed with topical and/or systemic antifungal agents; however, it may be ineffective due to the growing problem of antifungal resistance, among other factors.

Objective: To determine the prevalence of fungal species causing onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients and to assess their antifungal susceptibility *in vitro*.

Methods: Cross-sectional study including 95 leprosy patients and 91 non-leprosy patients (control group) with characteristic lesions of onychomycosis and *tinea pedis*. Skin scrapes and nail clippings were analyzed by direct mycological examination and culture. If the patient had more than one lesion site, each sample was collected and analyzed separately. The materials were cultivated in Sabouraud dextrose agar, and the fungal isolates were identified by sequencing the ITS (internal transcribed spacer) region of rDNA. *In vitro* antifungal susceptibility testing was performed using the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols. Comparisons of proportions were made using the chi-square test using SPSS v.22 software (IBM Corporation, Chicago, IL, USA).

Results: Fungal growth occurred in 48 samples from 40 leprosy patients and in 46 samples from 43 control patients. Most samples were from cases of onychomycosis; however, leprosy patients had more cases of *tinea pedis* ($p < 0.05$). Of these patients, 27 (67.5%) presented the lepromatous clinical form, and 20 (50%) had some type of leprosy reaction at the time of collection. In both groups, the main fungus identified was *Trichophyton interdigitale*, without variations in the distribution of etiological agents. Antifungal susceptibility did not vary greatly. However, for the isolates of *T. interdigitale* and the antifungal itraconazole, the minimum inhibitory concentrations (MIC) for leprosy patients were higher than for the control group ($p < 0.05$).

Conclusion: This was the first study to prospectively analyze cases of onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy. These patients are very susceptible to superficial mycoses, which was

confirmed by the results of this study, in which 26.3% of leprosy patients had at least one type of lesion. Although no marked differences were found in antifungal susceptibility, the reduced *in vitro* effectiveness of itraconazole is noteworthy. Further studies, with a larger number of patients, in addition to correlations between *in vitro* antifungal susceptibility and *in vivo* responses to treatments, are needed to determine the clinical significance of these initial findings.

Keywords: leprosy; onychomycosis; *tinea pedis*; antifungal susceptibility; dermatophytes.

LISTA DE TABELAS/QUADROS

- Quadro 1.** Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase em um ambulatório de referência de Porto Alegre”, Porto Alegre, 2021.....18
- Quadro 2.** Principais tipos de micoses superficiais e suas características.....37
- Quadro 3.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de fungos filamentosos dermatófitos de casos de micoses superficiais.....59
- Quadro 4.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos de casos de micoses superficiais.....62
- Quadro 5.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* de casos de micoses superficiais.....65
- Quadro 6.** Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de oito antifúngicos para diferentes espécies de leveduras não-*Candida* de casos de micoses superficiais.....68

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Biópsia corada com coloração de Ziehl-Neelsen, mostrando alta carga bacilar de *M. leprae* (aumento de 1000x).
Ref.: Han et al. 2014 (44).....22
- Figura 2.** Distribuição geográfica mundial de novos casos de hanseníase em 2018.
Ref.: adaptado de World Health Organization, 2019 (57).....24
- Figura 3.** Rotas de transmissão aceitas e hipotéticas de *M. leprae*.
Ref.: adaptado de Ploemacher et al. 2020 (69).....26
- Figura 4.** Mancha hipocrômica lisa e mal delimitada na face, característica da hanseníase indeterminada.
Ref.: Ministério da Saúde, 2017 (80).....29
- Figura 5.** Lesão única na mão, com bordas bem definidas e elevadas, característica da hanseníase tuberculóide.
Ref.: Talhari et al. 2015 (11).....29
- Figura 6.** Lesões de pele características da hanseníase dimorfa. **(A)** Lesão avermelhada elevada, mal delimitada, com centro irregular; **(B)** Múltiplas manchas hipocrômicas com bordas esmaecidas.
Ref.: Ministério da Saúde, 2017 (80).....30
- Figura 7.** Características típicas da hanseníase virchowiana. **(A)** Numerosas lesões avermelhadas no dorso de um paciente; **(B)** Infiltração difusa da face com envolvimento bilateral do pavilhão auricular; **(C)** Nódulos duros nas coxas, alguns ulcerados.
Ref.: van Hoang et al. 2016; Talhari et al. 2015; Ministério da Saúde, 2017 (7,11,80).....31
- Figura 8.** Reações hansênicas. **(A)** Eritema nitidamente demarcado e edema da mão direita em reação de tipo 1 (reação reversa); **(B)** Pápulas, placas e nódulos ocorrendo bilateralmente nas extremidades superiores em reação de tipo 2 (eritema nodoso hansênico).
Ref.: Kamath et al. 2014 (82).....32

Figura 9. Deformidades físicas decorrentes da hanseníase. (A) Mão em garra causada por lesão do nervo ulnar; (B) Mão gravemente comprometida devido a lesões nos nervos e reabsorção óssea.

Ref.: Virmond et al. 2015 (15).....35

Figura 10. Características macro e micromorfológicas de quatro espécies de fungos filamentosos dermatófitos. (A) Cultivo de *T. mentagrophytes/interdigitale* com colônias de coloração esbranquiçada e textura pulverulenta a aveludada; (B) Microcultivo de *T. mentagrophytes/interdigitale* com hifas septadas, microconídios e macroconídios; (C) Cultivo de *T. rubrum* com colônia de coloração esbranquiçada e textura aveludada, com verso avermelhado (evidente no centro à direita da colônia); (D) Microcultivo de *T. rubrum* com hifas septadas, microconídios e macroconídios; (E) Cultivo de *M. canis* com colônia esbranquiçada, textura aveludada e pigmentação amarela na periferia; (F) Microcultivo de *M. canis* com macroconídios fusiformes de parede espessa; (G) Cultivo de *E. floccosum* com colônia marrom-amarelada e textura granulosa; (H) Microcultivo de *E. floccosum* com macroconídios clavados de paredes finas e lisas, arredondados distalmente.

Ref.: adaptado de Nenoff et al. 2013; Thakur, Kalsi, 2019; Saxena et al. 2019; Saito et al. 2008 (23,139–141).....43

Figura 11. Manifestações clínicas da *tinea incognita*. (A) Eritema disseminado e descamação em caso de *tinea faciei*; (B) *Tinea incognita* na parte superior das costas.

Ref.: adaptado de Verma, 2017; Arenas et al. 2010 (163,165).....48

Figura 12. Esquema do teste de suscetibilidade antifúngica seguindo o protocolo de microdiluição em caldo do *Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Ref.: adaptado de Qidwai et al. 2018. (205).....54

Figura 13. Mecanismos de resistência antifúngica adquirida em fungos dermatófitos.

Ref.: adaptado de Gupta et al. 2021 (32).....72

Figura 14. Marco conceitual da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase em um ambulatório de referência de Porto Alegre”, Porto Alegre, 2021. (73).....74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| 5FC | 5-flucitosina |
| AMB | anfotericina B |
| ANI | anidulafungina |
| BAAR | bacilo álcool-ácido resistente |
| BCG | Bacilo de Calmette-Guérin |
| CAS | casposfungina |
| CEM | concentração efetiva mínima |
| CFM | concentração fungicida mínima |
| CIM | concentração inibitória mínima |
| CLSI | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> |
| CPX | ciclopirox olamine |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| ECV | <i>epidemiological cutoff values</i> |
| ENH | eritema nodoso hansênico |
| EUCAST | <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| FLC | fluconazol |
| FND | fungo filamentoso não-dermatófito |
| FTIR | espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier |
| GSF | griseofulvina |
| ITC | itraconazol |
| ITS | <i>internal transcribed spacer</i> |
| KOH | hidróxido de potássio |
| KTC | cetoconazol |

| | |
|-----------|--|
| MALDI-TOF | Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo |
| MB | multibacilar |
| MCZ | miconazol |
| MORHAN | Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PB | paucibacilar |
| PCR | reação em cadeia da polimerase |
| POS | posaconazol |
| RNA | ácido ribonucleico |
| SQLE | enzima esqualeno epoxidase |
| T1R | reação hansênica tipo 1 |
| TRB | terbinafina |
| VRC | voriconazol |
| WT | <i>wild-type</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|----------------|---|------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 2.1 | Hanseníase | 18 |
| 2.1.1 | Aspectos gerais..... | 18 |
| 2.1.2 | Breve histórico | 20 |
| 2.1.3 | Agentes etiológicos..... | 21 |
| 2.1.4 | Epidemiologia e controle..... | 23 |
| 2.1.5 | Manifestações clínicas e classificação | 27 |
| 2.1.5.1 | Reações hansênicas..... | 31 |
| 2.1.6 | Diagnóstico | 32 |
| 2.1.7 | Tratamento..... | 35 |
| 2.2 | Micoses superficiais | 36 |
| 2.2.1 | Aspectos gerais..... | 36 |
| 2.2.2 | Agentes etiológicos e epidemiologia | 43 |
| 2.2.3 | Epidemiologia no Rio Grande do Sul | 46 |
| 2.2.4 | Manifestações clínicas | 47 |
| 2.2.5 | Diagnóstico | 49 |
| 2.2.6 | Tratamento..... | 51 |
| 2.3 | Testes de suscetibilidade antifúngica | 52 |
| 2.3.1 | Testes de suscetibilidade antifúngica de fungos causadores de micoses superficiais | 56 |
| 2.3.2 | Resistência antifúngica de fungos causadores de micoses superficiais..... | 70 |
| 2.4 | Relação da hanseníase com as micoses superficiais..... | 72 |
| 3 | MARCO CONCEITUAL | 75 |
| 4 | JUSTIFICATIVA..... | 76 |
| 5 | OBJETIVOS..... | 77 |
| 5.1 | Objetivo primário | 77 |
| 5.2 | Objetivos secundários..... | 77 |
| 6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 78 |
| | ARTIGO 1..... | 105 |
| | ARTIGO 2..... | 126 |
| | ARTIGO 3..... | 135 |
| 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 157 |
| 8 | PERSPECTIVAS | 158 |

| | |
|--|------------|
| APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes com Hanseníase..... | 159 |
| APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes sem Hanseníase (grupo controle)..... | 160 |
| APÊNDICE C - Instrumento de coleta de dados para pacientes com hanseníase..... | 161 |
| APÊNDICE D - Instrumento de coleta de dados para pacientes sem hanseníase..... | 163 |

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica causada pelo bacilo da espécie *Mycobacterium leprae* e é caracterizada principalmente por lesões na pele e nervos periféricos. Ela faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, sendo um grande problema de saúde pública nas regiões tropicais do planeta e estando diretamente associada com a pobreza (1,2). A Índia e o Brasil são, nessa ordem, os países que registram o maior número de casos de hanseníase no mundo (3). *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que desencadeia um grande espectro de manifestações clínicas, que se correlacionam com a resposta imune de cada indivíduo (2,4). A transmissão ocorre principalmente através de gotículas respiratórias contaminadas, entre uma pessoa não-tratada com alta carga bacilar e outra pessoa suscetível ao bacilo (5). Estima-se que apenas de 5 a 12% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são efetivamente infectados (6).

O período de incubação da hanseníase é longo, devido à multiplicação lenta de *M. leprae* (7). As manifestações clínicas são muito diversas e existem vários sistemas de classificação dos casos, para melhor manejo clínico e prognóstico dos pacientes (8). Para fins operacionais de tratamento, a Organização Mundial da Saúde recomenda a classificação da hanseníase em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) (9), pois cada grupo recebe um tipo de esquema terapêutico. No Brasil, além dessa classificação, também é utilizada a de Madri, que divide a hanseníase em quatro grupos principais: indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana (10,11).

O diagnóstico da hanseníase é primariamente baseado em achados clínicos, não existindo um teste diagnóstico absoluto para determinação de um caso, apenas testes subsidiários (12,13). Entre eles, o principal é a baciloscopia, realizada através de um esfregaço obtido das lesões da pele ou de áreas frias do corpo, como o lóbulo da orelha e cotovelos. Esse esfregaço é corado com a coloração de Ziehl-Neelsen ou Fite-Faraco para evidenciar a presença dos bacilos (14). O diagnóstico precoce é essencial para evitar deformidades físicas e psicológicas permanentes, pois a hanseníase ainda apresenta um grande estigma social (15,16). Desde 1981, a Organização Mundial da Saúde preconiza o tratamento da hanseníase com uso de poliquimioterapia, a qual consiste na combinação de rifampicina, clofazimina e dapsona (9,17). A implementação desse esquema de tratamento foi essencial para redução mundial do número de casos de hanseníase e melhora do prognóstico (17). Corticosteroides, principalmente a prednisona, também são amplamente utilizados para

tratamento da inflamação associada à neuropatia hansênica e também das reações hansênicas (18).

O uso de antibióticos e corticosteroides sistêmicos, associado à presença de diversas lesões na pele, podem predispor os pacientes com hanseníase a diversas infecções oportunistas (19–21). Entre elas, destacam-se as micoses superficiais, que são infecções fúngicas caracterizadas por lesões no epitélio queratinizado, nos folículos pilosos ou nas unhas (22). Elas podem ser causadas por fungos filamentosos dermatófitos, leveduras (principalmente do gênero *Candida*) ou fungos filamentosos não-dermatófitos (23). Os fungos filamentosos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são causadores das dermatofitoses, ou *tineas*, que são denominadas de acordo com o local do corpo infectado, sendo a principal a *tinea unguium* (onicomicose) (24,25). Já leveduras do gênero *Candida* causam candidíase cutânea, mas também são patógenos secundários em casos de onicomicose (23,26). Fungos filamentosos não-dermatófitos são menos usuais, sendo os principais gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Scopulariopsis* (23,27). Apesar de os pacientes com hanseníase serem possivelmente mais suscetíveis a micoses superficiais (28), existem poucos relatos na literatura dessa associação, sendo necessária uma maior compreensão acerca das espécies fúngicas responsáveis pelas micoses nesses pacientes.

Independentemente do tipo de micose, um problema crescente na micologia médica é a resistência antifúngica. Nenhuma classe nova de antifúngicos foi disponibilizada nos últimos 20 anos, enquanto isolados resistentes de *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Trichophyton* spp. são identificados frequentemente (29–32). Para detecção de isolados resistentes, é essencial a realização de ensaios de suscetibilidade antifúngica, os quais permitem verificar a suscetibilidade/resistência *in vitro* de um isolado fúngico para um determinado antifúngico (33). Dessa maneira, esta pesquisa objetivou avaliar a prevalência das espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase, além de determinar sua suscetibilidade antifúngica, se caracterizando como um estudo pioneiro sobre essa doença tropical negligenciada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados à hanseníase, micoses superficiais, testes de suscetibilidade antifúngica e na relação da hanseníase com as micoses superficiais. A estratégia de busca envolveu as bases de dados PubMed e Embase, sem limites de data e idioma, englobando todos os estudos publicados até outubro de 2021. Os termos/estratégias utilizados na busca e o número de artigos encontrados, repetidos e incluídos em cada seção da revisão da literatura estão apresentados no Quadro 1. Além disso, também foram incluídas algumas diretrizes e leis brasileiras, além de diretrizes da Organização Mundial da Saúde, disponíveis em sites oficiais na internet, para tratar sobre a temática da hanseníase.

2.1 Hanseníase

2.1.1 Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica granulomatosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, caracterizada principalmente por lesões na pele e nervos periféricos (1). Ela é conhecida desde os tempos bíblicos e considerada uma das doenças mais antigas da humanidade (3,34). A hanseníase faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas, sendo um grande problema de saúde pública em muitos países das regiões tropicais do planeta e estando diretamente associada a condições de pobreza (2).

M. leprae é um patógeno intracelular obrigatório que ocasiona um grande espectro de manifestações clínicas, as quais se correlacionam com a resposta imune individual do hospedeiro (2). Apesar de afetar principalmente pele e nervos periféricos, outros órgãos podem estar envolvidos, como o fígado, rins, glândulas adrenais, testículos, olhos e linfonodos. A hanseníase é entendida como um conjunto de duas doenças: a primeira é uma infecção micobacteriana crônica, que provoca diferentes respostas imunes celulares; e a segunda é uma neuropatia periférica causada pela infecção e seus eventos imunológicos, cujas sequelas podem levar a graves deformidades físicas e consequências sociais e psicológicas (35).

Quadro 1. Estratégia de busca de estudos para a revisão da literatura da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase em um ambulatório de referência de Porto Alegre”, Porto Alegre, 2021.

| Seção | Estratégias de busca/ Base de dados | | Artigos encontrados | Artigos repetidos | Artigos incluídos |
|---------------------|--|--|---|-------------------|-------------------|
| | PubMed | Embase | | | |
| 2.1 - 2.1.7 | (leprosy[Title] OR (hansen disease[Title])) OR (hansen's disease[Title]) <i>Filtros: Review; Systematic review; Meta-analysis</i> | ('leprosy':ti OR 'hansen disease':ti OR 'hansen s disease':ti) AND 'review'/it <i>Filtros (Publication Types): Review</i> | PubMed: 1034 Embase: 879 | 575 | 90 |
| 2.2 - 2.2.6 | ("dermatomycoses"[Title] OR "fungal skin diseases"[Title] OR "dermatophyte infection"[Title] OR "Dermatomycesis"[Title] OR "tinea"[Title] OR "cutaneous candidiasis"[Title] OR "onychomycosis"[Title] OR "dermatophytosis"[Title] OR "Trichophyton"[Title] OR "Microsporum"[Title] OR "Epidermophyton"[Title] OR "non-dermatophyte"[Title] OR "pityriasis"[Title] OR "piedra"[Title]) <i>Filtros: Review; Systematic review; Meta-analysis</i> | 'dermatomycoses':ti OR 'fungal skin diseases':ti OR 'dermatophyte infection':ti OR 'dermatomycosis':ti OR 'tinea':ti OR 'cutaneous candidiasis':ti OR 'onychomycosis':ti OR 'dermatophytosis':ti OR 'trichophyton':ti OR 'microsporum':ti OR 'epidermophyton':ti OR 'non-dermatophyte':ti OR 'pityriasis':ti OR 'piedra':ti <i>Filtros (Publication Types): Review</i> | PubMed: 971 Embase: 887 | 568 | 91 |
| 2.3 | "antifungal susceptibility"[Title] OR "antifungal susceptibility testing"[Title] <i>Filtro: Review; Systematic review; Meta-analysis</i> | 'antifungal susceptibility':ti OR 'antifungal susceptibility testing':ti AND 'review'/it <i>Filtro (Publication Types): Review</i> | PubMed: 71 Embase: 64 | 44 | 32 |
| 2.3.1 e 2.3.2 | ("antifungal susceptibility"[Title] OR "antifungal susceptibility testing"[Title] OR "antifungal resistance"[Title]) AND ("dermatomycoses"[Title] OR "fungal skin diseases"[Title] OR "dermatophyte infection"[Title] OR "Dermatomycesis"[Title] OR "tinea"[Title] OR "cutaneous candidiasis"[Title] OR "onychomycosis"[Title] OR "dermatophytosis"[Title] OR "Trichophyton"[Title] OR "Microsporum"[Title] OR "Epidermophyton"[Title] OR "non-dermatophyte"[Title] OR "pityriasis"[Title] OR "piedra"[Title] OR "Candida"[Title]) | ('antifungal susceptibility':ti OR 'antifungal susceptibility testing':ti OR 'antifungal resistance':ti) AND ('dermatomycoses':ti OR 'fungal skin diseases':ti OR 'dermatophyte infection':ti OR 'dermatomycosis':ti OR 'tinea':ti OR 'cutaneous candidiasis':ti OR 'onychomycosis':ti OR 'dermatophytosis':ti OR 'trichophyton':ti OR 'microsporum':ti OR 'epidermophyton':ti OR 'non-dermatophyte':ti OR 'pityriasis':ti OR 'piedra':ti OR 'candida':ti) | PubMed: 594 Embase: 759 | 549 | 89 |
| 2.4 | ("leprosy"[Title/Abstract] OR "hansen disease"[Title/Abstract] OR "hansen s disease"[Title/Abstract]) AND ("dermatomycoses"[Title/Abstract] OR "fungal skin diseases"[Title/Abstract] OR "dermatophyte infection"[Title/Abstract] OR "Dermatomycesis"[Title/Abstract] OR "tinea"[Title/Abstract] OR "cutaneous candidiasis"[Title/Abstract] OR "onychomycosis"[Title/Abstract] OR "dermatophytosis"[Title/Abstract] OR "Trichophyton"[Title/Abstract] OR "Microsporum"[Title/Abstract] OR "Epidermophyton"[Title/Abstract] OR "non-dermatophyte"[Title/Abstract] OR "pityriasis"[Title/Abstract] OR "piedra"[Title/Abstract] OR "Candida"[Title/Abstract]) | ('leprosy':ti,ab,kw OR 'hansen disease':ti,ab,kw OR 'hansen s disease':ti,ab,kw) AND ('dermatomycoses':ti,ab,kw OR 'fungal skin diseases':ti,ab,kw OR 'dermatophyte infection':ti,ab,kw OR 'dermatomycosis':ti,ab,kw OR 'tinea':ti,ab,kw OR 'cutaneous candidiasis':ti,ab,kw OR 'onychomycosis':ti,ab,kw OR 'dermatophytosis':ti,ab,kw OR 'trichophyton':ti,ab,kw OR 'microsporum':ti,ab,kw OR 'epidermophyton':ti,ab,kw OR 'non-dermatophyte':ti,ab,kw OR 'pityriasis':ti,ab,kw OR 'piedra':ti,ab,kw OR 'candida':ti,ab,kw) | PubMed: 112 Embase: 177 | 89 | 31 |

Fonte: elaborado pelo autor.

No Brasil, a hanseníase era conhecida oficialmente como lepra até o ano de 1995, quando foi sancionada a Lei Nº 9.010, na qual foi definido que o termo “lepra” e seus derivados não poderiam mais ser utilizados (36). No entanto, desde 1975 já eram feitos esforços para substituição do termo (35). O termo “lepra” é o mesmo que era utilizado na Bíblia, carregando um grande estigma para os portadores da doença, estando associado à impureza e ao castigo divino. Dessa maneira, apesar de na literatura internacional ainda ser amplamente utilizado o termo “*leprosy*”, vem sendo cada vez mais sugerida e reforçada a troca para o termo “*Hansen’s disease*” ou “*Hanseniasis*”, para reduzir o estigma da doença, assim como foi feito no Brasil (35,37).

2.1.2 Breve histórico

A hanseníase é uma doença milenar e sua origem remonta às primeiras civilizações (38). Sua origem exata é uma questão de debate entre pesquisadores, sendo atribuída à Ásia ou à África (34). De qualquer maneira, ela já era citada na Índia, em 300 a.C., e também na China, em 500 a.C., além de existirem registros no Egito em 4.300 a.C., em papiros e com presença verificada em múmias. A hanseníase também é citada no Antigo Testamento, sendo considerada como um castigo divino (38). No entanto, em tempos remotos, ela era amplamente confundida com outras doenças de pele, não sendo possível definir com precisão quais casos eram de fato hanseníase. Uma das descrições antigas que mais se assemelham à descrição clínica da hanseníase foi feita em 190 a.C., em um manuscrito chinês que tratava sobre remédios (34).

A doença se espalhou para outros países por meio do comércio, peregrinações religiosas e guerras, surgindo na Grécia, na Gália (parte ocidental da Europa) e Península Ibérica. Posteriormente, as invasões árabes, as Cruzadas e o êxodo hebraico espalharam a hanseníase por todo o continente europeu (38). Durante a Idade Média, a doença era considerada infecciosa e incurável, com portadores sendo estigmatizados e isolados em leprosários afastados da cidade. Devido a esse isolamento estrito, a hanseníase desapareceu de quase toda a Europa durante o período do Renascimento (3).

Nas Américas, existe um debate sobre a existência da hanseníase na era pré-colombiana, também devido à semelhança das lesões com outras doenças. A teoria mais aceita é que a hanseníase foi trazida pelos colonizadores espanhóis e se disseminou nas Américas a partir das Grandes Antilhas (38). De fato, no Brasil, os primeiros relatos da

doença datam do período colonial, no ano de 1600, o que condiz com a introdução pelos colonizadores europeus (16). Ainda nesse período, foi criado no Rio de Janeiro o primeiro lazareto brasileiro, onde eram abrigados os afetados pela hanseníase. A partir do Rio de Janeiro, a doença se espalhou por todos os estados e foi iniciado um programa de segregação compulsória em todo o país. Isso começou a ser criticado na década de 1940, quando outros países endêmicos começaram a abolir os leprosários devido à descoberta das sulfonas. Com o início da abolição do termo “lepra”, em 1975, o cenário nacional da hanseníase começou a mudar e, em 1966, foi transformada em lei a política de descentralização do tratamento da doença, com os pacientes sendo tratados pela secretarias estaduais de saúde (16,34).

Durante toda a história, dois dos eventos mais importantes na hanseníase foram a descoberta do bacilo *M. leprae* pelo Dr. Gerhard Armauer Hansen, em 1874 na Noruega, e o início do uso das sulfonas pelo Dr. Guy Faget em 1941, no leprosário de Carville (Estados Unidos da América) (39). Além disso, na década de 1980, foi instituída a poliquimioterapia pela Organização Mundial da Saúde, reduzindo drasticamente o tempo de tratamento da hanseníase e permitindo uma organização de serviços regionais para atendimento da doença no Brasil (16,40). Nesse mesmo período, surgiu no Brasil o Movimento de Reintegração das Pessoas Atingidas pela Hanseníase (MORHAN), que foi criado inicialmente para garantir os direitos dos pacientes ainda isolados nas colônias de leprosos, e que segue atuando até hoje pelos direitos das pessoas com hanseníase e pela redução do estigma (16). Mesmo assim, até a atualidade, o estigma da hanseníase, principalmente causado pelas deformidades físicas, ainda é um grande problema a ser enfrentado (41).

2.1.3 Agentes etiológicos

O agente etiológico da hanseníase, *Mycobacterium leprae*, também é chamado de bacilo de Hansen, devido ao nome de seu descobridor, Dr. Gerhard Armauer Hansen, em 1873. *M. leprae* tem a forma de um bastonete reto ou ligeiramente curvo, com extremidades arredondados e possui entre 4 e 7 µm de comprimento. Microscopicamente, se caracteriza como um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR), apresentando cor vermelha proveniente da fucsina na coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 1). Isso ocorre pois, devido ao seu alto teor de lipídios, ele não perde essa cor quando lavado com álcool e ácido. *M. leprae* infecta principalmente macrófagos e células de Schwann, sendo um parasita intracelular obrigatório. Ele não pode ser cultivado em nenhum meio de cultura artificial existente, apenas *in vivo* em

animais, especificamente em patas de camundongos e também no tatu-de-nove-bandas (*Dasypus novemcinctus*), que é um hospedeiro natural de *M. leprae* (42). O bacilo de Hansen cresce lentamente, se dividindo por fissão binária apenas a cada 12 a 14 dias, o que o caracteriza como a bactéria de crescimento mais lento já conhecida (43). Para sobreviver e se reproduzir, ele necessita de temperaturas mais baixas, entre 27 e 30°C. Isso explica a preferência de *M. leprae* pela pele das extremidades do corpo e nervos periféricos. Quando no ambiente, ele permanece viável por até nove dias (3,4).

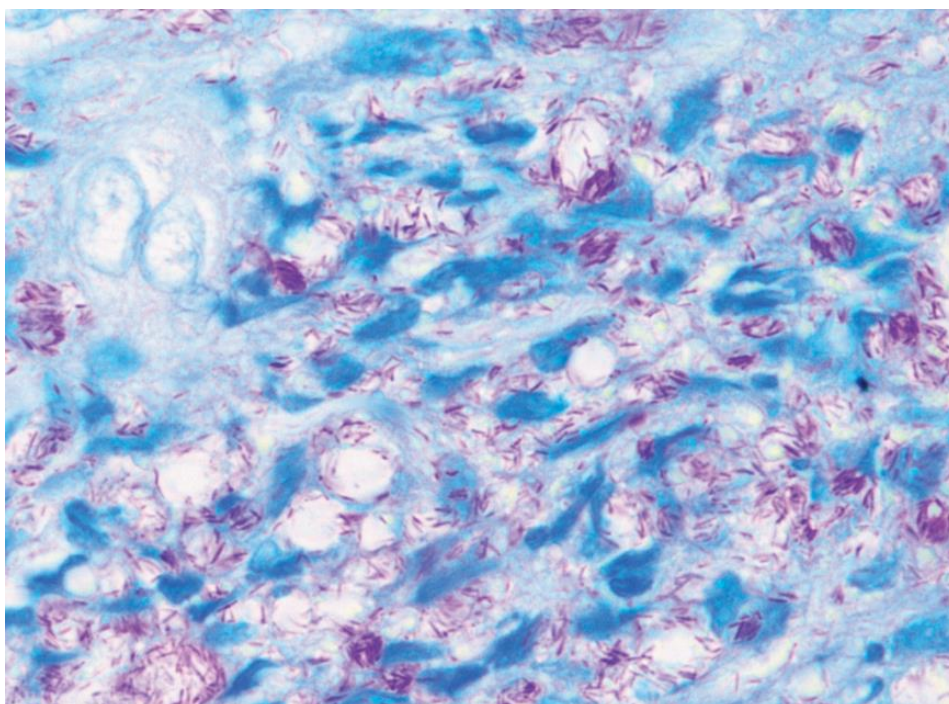


Figura 1. Biópsia corada com coloração de Ziehl-Neelsen, mostrando alta carga bacilar de *M. leprae* (aumento de 1000x).

Ref.: Han et al. 2014 (44)

A classificação científica de *M. leprae* é a seguinte: classe Schizomycetes, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero *Mycobacterium* (4). A espécie *M. leprae* está relacionada proximamente com *M. tuberculosis*, o bacilo causador da tuberculose, com muitos registros históricos de coinfeção. No entanto, *M. tuberculosis* pode ser cultivado em meios de cultura usuais, por ser patógeno intracelular facultativo, e apresenta crescimento mais rápido (45). Em 2001, foi sequenciado o primeiro genoma de um isolado indiano de *M. leprae*, com 3.268.203 pares de bases, em comparação com o genoma de *M. tuberculosis* que apresenta 4.411.532 pares de bases. Além disso, enquanto 90,8% do genoma de *M.*

tuberculosis codifica proteínas, esse percentual é de apenas 49,5% em *M. leprae*, este apresentando também um alto teor de pseudogenes. Isso demonstra um caso de evolução redutiva, muito documentada em parasitas intracelulares obrigatórios, pois nesse nicho altamente especializado muitos genes são inativados devido à perda de função (43,46). Acredita-se que o ancestral de *M. leprae* divergiu dos bacilos da tuberculose há aproximadamente 66 milhões de anos, e a adaptação intracelular com a associada redução de genes ocorreu há 9 milhões de anos (47).

Em 2008, foi identificada uma nova espécie, *Mycobacterium lepromatosis*, em dois pacientes do México que morreram devido à hanseníase lepromatosa difusa, uma forma de hanseníase que é endêmica na região de origem dos pacientes (48). Posteriormente, *M. lepromatosis* foi reconhecido como agente etiológico em casos com manifestações clínicas semelhantes nos Estados Unidos, Canadá e Costa Rica, acreditando-se que essa espécie estava localizada primariamente na América do Norte e Central (49). Entretanto, a espécie também já foi identificada no Brasil e em Mianmar, sugerindo ampla distribuição de *M. lepromatosis* (44). Alguns autores especulam que a existência de *M. lepromatosis*, além de *M. leprae*, pode ser um dos fatores responsáveis pela grande variabilidade clínica e geográfica da hanseníase (48).

2.1.4 Epidemiologia e controle

A transmissão da hanseníase ocorre principalmente através de gotículas respiratórias contaminadas, de humano para humano. No entanto, estima-se que apenas de 5 a 12% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são efetivamente infectados (6), pois o desenvolvimento da doença e suas manifestações clínicas dependem da interação do bacilo com o sistema imune do hospedeiro, além de sua suscetibilidade genética (50). Diversas variantes de genes já foram identificadas como fatores de risco para o desenvolvimento da hanseníase, para suas formas clínicas e para a ocorrência de reações hansênicas (6). Portanto, um dos principais fatores para a transmissão da hanseníase é o contato prolongado entre um doente não-tratado apresentando alta carga bacilar e uma pessoa suscetível ao bacilo (5). Por esse motivo, os contatos de pessoas com hanseníase, com convívio intradomiciliar, são um grupo de risco para a doença e devem ser monitorados (51). Em regiões endêmicas, existem portadores da hanseníase com infecção latente e assintomática, que podem ser agentes de transmissão (52). A infecção latente pode durar por décadas e se resolver espontaneamente a qualquer momento, ou

progredir para manifestações clínicas da hanseníase, dependendo, como mencionado, da suscetibilidade individual de cada pessoa (3).

Cerca de 80% de todos os casos de hanseníase no mundo são encontrados no Brasil, Índia e Indonésia (53). Índia e Brasil são, nessa ordem, responsáveis pelo maior número de casos, com cada país apresentando mais de 10.000 registros novos em 2018 (3) (Figura 2). A introdução da poliquimioterapia, em 1981, levou a grandes mudanças na epidemiologia da hanseníase, cujo número de casos reduziu de mais de 5 milhões, na década de 80, para menos de 200.000 em 2015 (54). Em 1991, ocorreu a 44ª Assembleia Mundial da Saúde, na qual foi estabelecida a meta de eliminação da hanseníase como um problema de saúde pública no mundo até o ano 2000. Essa meta era reduzir os casos de hanseníase para menos de um por 10.000 habitantes (55). No final dos anos 2000, 108 dos 122 países listados como endêmicos alcançaram a meta, este número aumentando para 116 no final de 2005 (56). Mesmo com o cumprimento da meta pela maior parte dos países, 60,2% dos casos notificados em 2015 ainda eram multibacilares, com presença de incapacidade física no momento do diagnóstico, indicando detecção tardia. Além disso, nesse ano, 8,9% dos casos foram registrados em crianças (3).

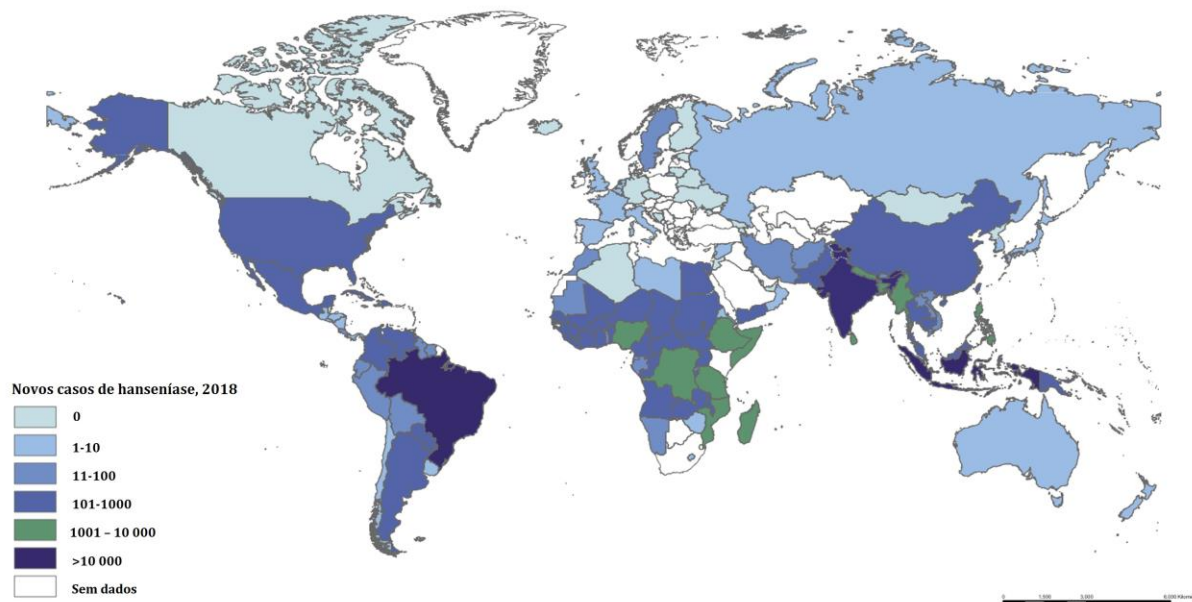


Figura 2. Distribuição geográfica mundial de novos casos de hanseníase em 2018.

Ref.: adaptado de World Health Organization, 2019 (57)

Dessa maneira, a Organização Mundial da Saúde iniciou a implementação de novas estratégias globais para a hanseníase. Com a “Estratégia Global da OMS para a Hanseníase

2016-2020”, foi possível reduzir o número de casos diagnosticados com incapacidade física e também a taxa de detecção de casos infantis. Atualmente, a “Estratégia Global da OMS para a Hanseníase 2021-2030” se concentra na interrupção da transmissão e na obtenção de zero casos autóctones (58). Para isso, um dos pilares é a detecção ativa de casos, principalmente nos contatos de casos novos (51). A quimioprofilaxia, principalmente com dose única de rifampicina, já se mostrou efetiva para reduzir a incidência de hanseníase em contatos (59,60). Além disso, é possível utilizar a imunoprofilaxia, com vacinação pela BCG, a qual tem efeito protetivo confirmado contra a hanseníase, e substitui o uso da quimioprofilaxia. Outras vacinas específicas também estão em desenvolvimento (61).

Além disso, existem outros desafios que vão além da meta de eliminação da hanseníase (62). Entre esses, se destacam a existência de casos de *M. leprae* multirresistente, cujo impacto global ainda não é totalmente conhecido, mas que tem potencial de gerar falhas no tratamento com a poliquimioterapia e causar recidivas (63,64). Outra questão importante é a falta de adesão ao tratamento que, no caso da hanseníase, ocorre em um número significativo de pacientes e pode prejudicar a eliminação da doença (64). Também ainda é muito necessária a redução do estigma associado à hanseníase, que traz grande sofrimento aos pacientes e seus familiares (65).

Outro ponto importante para eliminação da hanseníase é a compreensão do modo preciso de transmissão e seus fatores, os quais ainda não foram completamente esclarecidos (66). Como mencionado, a transmissão entre humanos, através de gotículas respiratórias contaminadas, é considerada o fator primordial (67). No entanto, diversas evidências sugerem que fatores do ambiente, junto com artrópodes, amebas de vida livre e reservatórios animais de *M. leprae* desempenham um papel importante na transmissão contínua da hanseníase (47,68) (Figura 3). Dessa maneira, a transmissão da doença é provavelmente muito mais complexa do que o imaginado, com fatores ambientais e animais estando associados à permanência da hanseníase em muitos locais endêmicos. Assim, alguns autores sugerem que deve ser abordado o conceito de *One Health* nas pesquisas sobre hanseníase, a fim de elucidar todos os mecanismos de transmissão de *M. leprae* e permitir um maior controle da doença. Esse conceito trata a saúde humana, ambiental e animal como algo indissociável (69). Além disso, também existem fatores socioeconômicos, como pobreza e má-nutrição, que estão associados e que devem ser considerados na transmissão e fatores de risco da hanseníase (47,70–72).

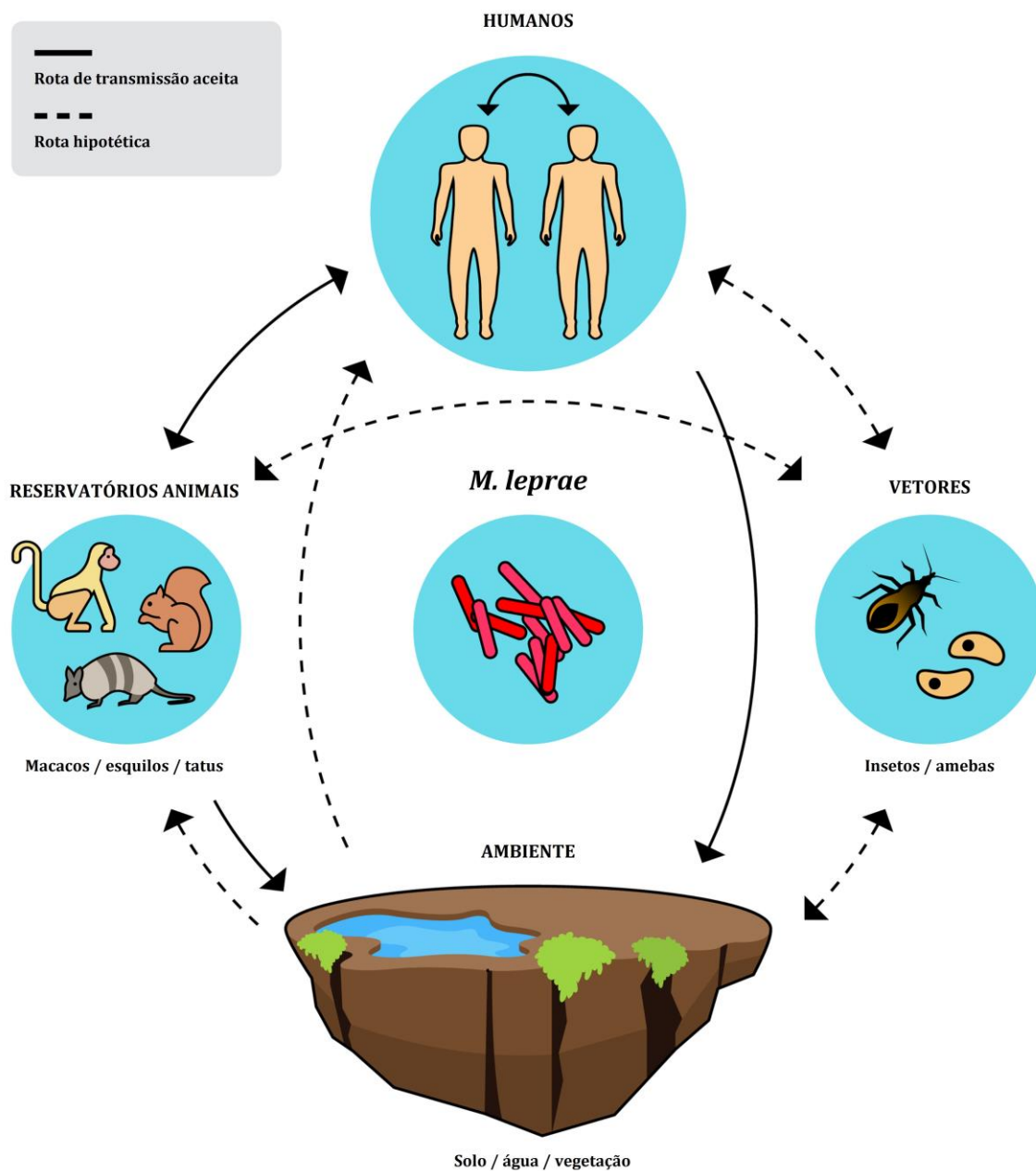


Figura 3. Rotas de transmissão aceitas e hipotéticas de *M. leprae*.

Ref.: adaptado de Ploemacher et al. 2020 (69)

Especificamente em relação à epidemiologia no Brasil, o país é considerado de alta carga para a hanseníase, não tendo atingido, em 2019, a meta de menos de um caso para 10.000 habitantes. Nesse ano, a taxa de detecção foi de 1,3 casos por 10.000 habitantes (73,74). Devido a isso, o país tem suas próprias estratégias nacionais para enfrentamento da doença, tendo como visão um Brasil sem hanseníase (75). Em 2019, foram reportados 29.936 casos novos de hanseníase nas Américas e, destes, 27.864 (93%) foram notificados no Brasil.

Destes, 23.483 foram avaliados para incapacidades físicas no diagnóstico, com 2.351 (9,9%) já apresentando deformidades visíveis. Além disso, 1.545 (5,5%) do total de casos foram diagnosticados em menores de 15 anos, com taxas de detecção altas que mostram a continuidade de transmissão da hanseníase (76). No Brasil, o maior número de casos é registrado entre 50 e 59 anos de idade, com predomínio do sexo masculino em todas as faixas etárias (73). A hanseníase não se distribui de forma homogênea no país, se concentrando nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste. Os estados com maior número de casos, em 2019, foram Mato Grosso e Tocantins, sendo considerados de alta endemicidade. Os estados brasileiros com menor número de casos, considerados de baixa endemicidade, são Santa Catarina e Rio Grande do Sul (73,75). Essa distribuição heterogênea é atribuída principalmente às condições socioeconômicas de cada local, pois a hanseníase é uma doença atrelada principalmente à pobreza e à dificuldade de acesso aos serviços de saúde (75,77).

No estado do Rio Grande do Sul, entre 1990 e 2011, foram registrados 4.770 casos de hanseníase, resultando em uma taxa de detecção de 0,21 casos para 10.000 habitantes (78), e média de aproximadamente 227 casos por ano. A partir de 2006, há um início de tendência de queda no número de casos novos, se estabilizando em uma média de 112 casos ao ano a partir de 2015 (dados não publicados). Assim como no cenário nacional, há predomínio do sexo masculino, porém discreto. No período de 1990 a 2011, 1,9% dos 4.770 casos foram em menores de 15 anos e 74,7% foram detectados como multibacilares no diagnóstico (78). Entre 2000 e 2019, o percentual de casos em menores de 15 anos foi de 1,88%, mostrando uma estabilidade desde 1990 (79). O diagnóstico de casos multibacilares e com grau de incapacidade física, tanto em adultos como em menores de 15 anos, mostra que, mesmo com classificação de baixa endemicidade, o estado do Rio Grande do Sul ainda tem muitos desafios em relação à hanseníase, principalmente no que tange à realização de diagnósticos mais precocemente (78,79).

2.1.5 Manifestações clínicas e classificação

As manifestações clínicas da hanseníase são muito diversas, dependendo da relação do sistema imune do hospedeiro com *M. leprae*, podendo ir de poucas lesões até lesões disseminadas (3,11). Antes de ocorrerem manifestações, o período de incubação é longo, em média de 2 a 5 anos, mas podendo ir de 3 meses até 40 anos (7). Apesar de sua grande variabilidade, os principais sinais e sintomas da hanseníase são: (1) manchas esbranquiçadas,

acastanhadas ou avermelhadas, com alterações de sensibilidade ao calor e/ou dolorosa, e/ou ao tato; (2) formigamentos, choques e câimbras nos braços e pernas, que evoluem para a dormência; (3) pápulas, tubérculos e nódulos, normalmente sem sintomas; (4) diminuição ou queda de pelos, localizada ou difusa, principalmente nas sobrancelhas (madarose); e (5) pele infiltrada (avermelhada), com diminuição ou ausência de suor no local (80).

Existem diversos sistemas de classificação da hanseníase, utilizados para melhorar a compreensão, o manejo clínico e o prognóstico dos pacientes (8). No Brasil, é utilizada a classificação de Madri, definida na Conferência Internacional de Hanseníase em 1953, que se baseia em critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos. Essa classificação divide a hanseníase em quatro grupos principais: indeterminada, tuberculóide, dimorfa e virchowiana (10,11). Para fins operacionais de tratamento, a Organização Mundial da Saúde, em 1982, recomendou a classificação da hanseníase em paucibacilar (PB) e multibacilar (MB) (9), pois cada grupo recebe um tipo de esquema terapêutico. Um caso PB se caracteriza pela presença de até cinco lesões de pele com baciloscopia de raspado intradérmico negativo (quando realizada), enquanto um caso MB se caracteriza pela presença de seis ou mais lesões de pele ou pelo resultado de baciloscopia positiva, independentemente do número de lesões de pele (80). A baciloscopia permite verificar a presença do bacilo em esfregaços de lesões cutâneas, do lóbulo da orelha ou dos cotovelos (7). Na classificação de Madri, os casos de hanseníase indeterminada e tuberculóide são paucibacilares, enquanto os casos de hanseníase dimorfa e virchowiana são multibacilares (10). No Brasil, essa classificação também é utilizada para melhor compreensão e diagnóstico, pois nem sempre as lesões de pele são visíveis ou estão presentes (no caso de hanseníase primariamente neural) para classificação apenas em paucibacilar e multibacilar (80).

A hanseníase indeterminada é um estágio inicial da doença, com características clínicas inespecíficas, pelo qual todos os pacientes passam (7,80). Nesse estágio, o indivíduo ainda não desenvolveu uma resposta imune celular contra *M. leprae*, podendo progredir para a cura espontânea, para a forma tuberculóide ou para a forma virchowiana (7,14). As lesões cutâneas são maculares e hipopigmentadas, com superfície lisa e não pruriginosa, geralmente associadas à perda de sensação térmica (11,15). Essas lesões usualmente surgem na face, tronco e superfície extensora das extremidades (7) (Figura 4).



Figura 4. Mancha hipocrômica lisa e mal delimitada na face, característica da hanseníase indeterminada.

Ref.: Ministério da Saúde, 2017 (80)

A hanseníase tuberculóide ocorre em indivíduos com intensa imunidade mediada por células, conseguindo destruir os bacilos espontaneamente. É caracterizada por lesões únicas ou pouco numerosas de pequeno porte, com bordas bem definidas e elevadas (pápulas e placas). As lesões podem apresentar diminuição da sudorese, perda de pelos e sempre há perda total de sensibilidade, associada ou não à alteração de função motora de forma localizada (15,80) (Figura 5).



Figura 5. Lesão única na mão, com bordas bem definidas e elevadas, característica da hanseníase tuberculóide.

Ref.: Talhari et al. 2015 (11)

A hanseníase dimorfa é a forma mais comum de apresentação da doença, englobando mais de 70% dos casos. As lesões de pele são múltiplas, avermelhadas ou esbranquiçadas, com bordas elevadas e mal delimitadas na periferia; podem ser únicas e bem delimitadas, como nas lesões tuberculóides, mas nesse caso apresentam borda externa esmaecida (80). Usualmente há grave envolvimento múltiplo de nervos periféricos, levando a sequelas permanentes. Sem tratamento, os pacientes dimorfos podem progredir para a hanseníase virchowiana. Reações hansênicas são comuns nesses pacientes, com piora intensa das lesões na pele e nos nervos (11) (Figura 6).



Figura 6. Lesões de pele características da hanseníase dimorfa. **(A)** Lesão avermelhada elevada, mal delimitada, com centro irregular; **(B)** Múltiplas manchas hipocrômicas com bordas esmaecidas.

Ref.: Ministério da Saúde, 2017 (80)

Por fim, a hanseníase virchowiana ocorre em indivíduos incapazes de desenvolver uma resposta imune celular eficaz contra *M. leprae*, constituindo a forma mais grave e mais contagiosa da doença. Se não tratada, ocorre disseminação hematogênica ampla dos bacilos, com possível envolvimento de olhos, nariz, ossos, testículos, baço, fígado e suprarrenais (11,15). A pele pode se apresentar avermelhada em geral, seca, infiltrada e com poros dilatados, sem manchas visíveis; ou podem existir numerosas lesões como máculas, pápulas e placas com coloração avermelhada, infiltração difusa e borda indistinta. Com a evolução do quadro, comumente aparecem hansenomas, que são nódulos escuros, endurecidos e assintomáticos. Além disso, também pode haver perda das sobrancelhas (madarose), dos cílios e de outros pelos do corpo, exceto no couro cabeludo. Os nervos periféricos e seus ramos superficiais ficam espessados, e são comuns câimbras e formigamentos nas mãos e pés (7,80). A hanseníase virchowiana apresenta um prognóstico ruim e está associada com reações hansênicas (7) (Figura 7).

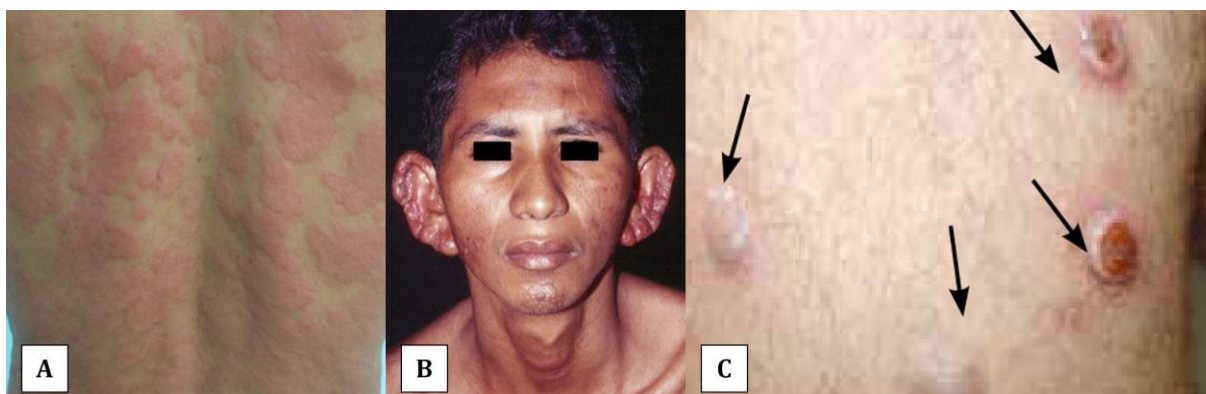


Figura 7. Características típicas da hanseníase virchowiana. (A) Numerosas lesões avermelhadas no dorso de um paciente; (B) Infiltração difusa da face com envolvimento bilateral do pavilhão auricular; (C) Nódulos duros nas coxas, alguns ulcerados.

Ref.: van Hoang et al. 2016; Talhari et al. 2015; Ministério da Saúde, 2017 (7,11,80)

2.1.5.1 Reações hansênicas

As reações hansênicas são fenômenos imunoinflamatórios, resultado da reativação da resposta imune celular com a produção de mediadores inflamatórios, levando a graves danos nos tecidos e nervos de maneira local ou sistêmica. Elas podem ocorrer antes, durante ou após o tratamento com poliquimioterapia, afetando de 30 a 50% dos pacientes. As reações hansênicas são graves e necessitam de diagnóstico e tratamento precoce, para prevenir o comprometimento da função nervosa e a incapacidade permanente. Elas podem ser classificadas em dois tipos principais: tipo 1, também chamada de reação reversa (T1R), e tipo 2, cuja principal manifestação é o eritema nodoso hansênico (ENH) (13,81–83). Apesar da gravidade das reações hansênicas, ainda não existe nenhum método diagnóstico rotineiro efetivo para detectá-las, além de não existirem marcadores conhecidos que possam definir quais pacientes irão apresentar essas reações (84).

As reações do tipo 1 estão associadas à ativação da imunidade celular contra antígenos de *M. leprae*, causando inflamação na pele e nos nervos (85). Elas podem ocorrer tanto em pacientes paucibacilares como em multibacilares, mas estão altamente associadas com a hanseníase dimorfa (86). As características clínicas principais são aumento da gravidade das lesões cutâneas já existentes, além do surgimento de novas lesões, e quase sempre há neurite envolvendo nervos periféricos (7). O tratamento é realizado com analgésicos e corticosteroides (prednisona) (15) (Figura 8, A).

As reações do tipo 2 são causadas pela resposta imune humoral a determinantes antigênicos de *M. leprae*. Elas são uma complicação imunológica de indivíduos com hanseníase dimorfa ou virchowiana, e estes pacientes tendem a ter múltiplos episódios de ENH ao longo dos anos (7,86). Aproximadamente 50% dos pacientes virchowianos desenvolvem essa complicação (87). As características clínicas incluem mal-estar, febre, lesões dolorosas nos nervos periféricos e nódulos cutâneos doloridos e endurecidos, podendo também ocorrer hepatomegalia e esplenomegalia. A neurite é menos grave que na reação de tipo 1, mas também deve ser tratada precocemente para evitar a perda permanente de função (7,86). O tratamento inclui o uso de corticosteroides (prednisona) e talidomida, ambos devendo ser utilizados com cautela devido à imunossupressão e aos efeitos teratogênicos, respectivamente (88) (Figura 8, B).



Figura 8. Reações hansênicas. **(A)** Eritema nitidamente demarcado e edema da mão direita em reação de tipo 1 (reação reversa); **(B)** Pápulas, placas e nódulos ocorrendo bilateralmente nas extremidades superiores em reação de tipo 2 (eritema nodoso hansênico).

Ref.: Kamath et al. 2014 (82)

2.1.6 Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é primariamente baseado em achados clínicos, com um caso se caracterizando pela presença de um ou mais dos seguintes sinais cardinais: (1) lesão(ões) e/ou área(s) da pele com alteração da sensibilidade térmica e/ou dolorosa e/ou tátil; (2) espessamento de nervo periférico, associado a alterações sensitivas e/ou motoras e/ou autonômicas; (3) presença de bacilos *M. leprae*, confirmada na baciloscopia de esfregaço

intradérmico ou na biópsia de pele (14,89). No entanto, destaca-se a necessidade de incluir a hanseníase como diagnóstico diferencial, pois suas características podem se assemelhar a outras doenças, como sífilis, micose fungoide, tuberculose cutânea, sarcoidose e doenças do colágeno. Isso é especialmente importante em locais nos quais a hanseníase teve grande redução do número de casos e se tornou uma doença rara (14,90).

Até o momento, não existem exames laboratoriais absolutos para diagnóstico da hanseníase. Os testes existentes são apenas subsidiários, auxiliando na classificação e acompanhamento do paciente (13,91), sendo importantes pois a hanseníase possui um grande espectro possível de manifestações clínicas (92). Entre eles, se destaca a baciloscopia, realizada a partir de esfregaços obtidos das lesões do paciente. Se as lesões não estão aparentes, a amostra é coletada das partes mais frias do corpo, principalmente dos lóbulos das orelhas e dos cotovelos. É utilizada a coloração de Ziehl-Neelsen modificada ou Fite-Faraco para visualização dos bacilos álcool-ácido resistentes. Os bacilos são contados e avaliados de acordo com uma escala logarítmica, para determinação do índice bacilar (13,14). Em pacientes paucibacilares, a baciloscopia é negativa; nos multibacilares, normalmente é positiva. Caso seja negativa em pacientes MB, deve ser considerado em conjunto o quadro clínico, que continua sendo multibacilar caso a apresentação seja dimorfa ou virchowiana (80).

Outro exame que pode auxiliar no diagnóstico, classificação e detecção de surtos reacionais é a histopatologia. Para isso, é importante que a biópsia seja coletada do local correto (da borda da lesão na hanseníase tuberculóide e do centro da lesão na hanseníase virchowiana) e que seja feita uma boa coloração de Fite-Faraco para visualização de *M. leprae*. Também é feita coloração de hematoxilina-eosina, para analisar o tipo, a extensão e as características do infiltrado (13,14,93). Apesar de a histopatologia ser muito útil na maior parte dos pacientes, em alguns deles as biópsias de pele podem mostrar achados não-diagnósticos e/ou que são confundidores, como, por exemplo, achados comuns de outras doenças similares (94).

Além da baciloscopia e da histopatologia, existem outros testes que podem ser utilizados, mas que, em geral, são menos usuais. Esses testes são úteis principalmente para melhorar a sensibilidade do diagnóstico, porém, não estão disponíveis em todos os locais (95). Entre eles, se destacam os testes sorológicos e moleculares. Em relação à sorologia, diversos testes já foram desenvolvidos para detecção de anticorpos circulantes, que devem ser responsivos a antígenos de proteína nativa ou recombinante de *M. leprae*. A maior parte dos

testes, com diferentes antígenos, mostrou resultados satisfatórios para pacientes multibacilares no início da doença. No entanto, para casos paucibacilares, quase 60% destes não são detectados, devido à baixa produção de anticorpos. Dessa maneira, novas pesquisas buscam encontrar melhores antígenos para superar essa dificuldade (96,97). Em relação aos métodos moleculares, é utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de *M. leprae* em amostras biológicas, com alta especificidade e sensibilidade, inclusive para pacientes paucibacilares. No entanto, é um exame caro que não está disponível rotineiramente em muitos locais onde a hanseníase é endêmica (91,95).

Independentemente do método diagnóstico utilizado, o aspecto primordial na hanseníase é que ele seja realizado precocemente. Isso é importante para interrupção da transmissão e, principalmente, para evitar sequelas físicas e psicológicas ao paciente. Em um estudo realizado com 40 pacientes em São Paulo, Brasil, 55% destes tiveram o diagnóstico em até um ano após notarem os primeiros sintomas. No entanto, nesse período de tempo, 54% dos pacientes deste grupo já tinham algum grau de incapacidade física instalado. Os autores encontraram que os principais fatores que influenciam no diagnóstico tardio são os diagnósticos equivocados e o desconhecimento da doença (98). As principais consequências físicas do diagnóstico tardio são as incapacidades físicas permanentes, causadas principalmente por danos nos nervos, como a mão em garra, e pela reabsorção óssea (15) (Figura 9). Além disso, as consequências psicológicas da hanseníase também são devastadoras, com um grande número de pacientes apresentando morbidades psiquiátricas como depressão, transtornos de ansiedade e tentativas de suicídio (99).

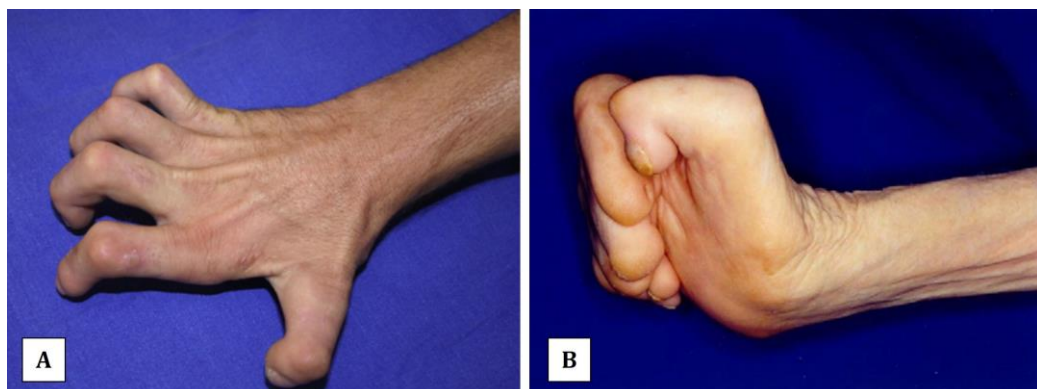


Figura 9. Deformidades físicas decorrentes da hanseníase. (A) Mão em garra causada por lesão do nervo ulnar; (B) Mão gravemente comprometida devido a lesões nos nervos e reabsorção óssea.

Ref.: Virmond et al. 2015 (15)

2.1.7 Tratamento

Em 1981, a Organização Mundial da Saúde implementou o uso da poliquimioterapia para tratamento da hanseníase, a qual consiste em três fármacos: rifampicina, clofazimina e dapsona (9). A implementação desse sistema teve um enorme sucesso na redução do número de casos, do tempo de tratamento e das sequelas associadas à hanseníase (17). Inicialmente, pacientes paucibacilares recebiam apenas rifampicina e dapsona por seis meses, enquanto os multibacilares recebiam rifampicina, clofazimina e dapsona por 12 meses. Recentemente, em 2018, a OMS recomendou o uso uniforme, com os três medicamentos e as mesmas doses, tanto para pacientes pauci como multibacilares, respeitando os tempos de tratamento de 6 e 12 meses, respectivamente (12,100). Para tratamento da inflamação associada à neuropatia hanseníase, uma das complicações mais comuns da hanseníase, são amplamente utilizados esteroides, principalmente prednisona (18).

A rifampicina é um antibiótico bactericida que atua bloqueando a síntese de RNA bacteriano. Já a dapsona apresenta efeito bacteriostático e atua pela inibição de enzimas fundamentais na via de biossíntese de folato do *M. leprae*. Por fim, a clofazimina é um corante cristalino lipossolúvel que apresenta ação bacteriostática e anti-inflamatória. Sua função antimicrobiana ainda não é totalmente compreendida, mas possivelmente envolve bloqueio da função molde do DNA e aumento da capacidade de fagocitose dos macrófagos. A utilização de um esquema de poliquimioterapia se justifica pelo fato de que os três fármacos apresentam mecanismos antimicrobianos diferentes, o que minimiza o problema de resistência (40).

No entanto, casos de resistência à rifampicina são encontrados em todo o mundo, não só em recidivas, mas também em casos novos. Em uma análise recente, foi encontrada uma taxa de 8% de resistência à rifampicina em 1.932 casos de hanseníase de 19 países. Apesar de ser baixa, essa resistência prejudica o esquema de poliquimioterapia, pois a rifampicina é o fármaco mais potente e a base do tratamento. Portanto, essa questão deve ser monitorada atentamente (17,101). Além disso, apesar da OMS ter declarado a inexistência de efeitos tóxicos com o esquema de poliquimioterapia, existem diversos relatos de efeitos adversos no tratamento da hanseníase, principalmente com a rifampicina e com a dapsona, que podem causar erupções cutâneas, hepatite, anemia hemolítica, metahemoglobinemia, choque, insuficiência respiratória, entre outros (102,103). Assim, novos fármacos e novas estratégias de entrega de fármacos seguem sendo pesquisados e desenvolvidos (104–106). No entanto,

até o momento, não existe nenhum esquema de tratamento que seja tão efetivo quanto a poliquimioterapia recomendada pela OMS (107).

2.2 Micoses superficiais

2.2.1 Aspectos gerais

As micoses superficiais (ou dermatomicoses) são infecções fúngicas caracterizadas por lesões no epitélio queratinizado, nos folículos pilosos ou nas unhas (22). Estima-se que sua prevalência mundial seja de 20 a 25% da população, sendo que a maior parte das infecções fúngicas em países de clima temperado e tropical são micoses superficiais (108). Fatores como aumento da urbanização, uso de roupas e sapatos apertados e oclusivos, baixo nível socioeconômico e ausência de cuidado médico são elencados como os principais para a alta prevalência dessas micoses (108,109). Além disso, o turismo e as migrações crescentes também influenciam na expansão de casos no mundo, disseminando espécies menos comuns em diversos países (108).




Em geral, as micoses superficiais podem ser divididas de acordo com o agente etiológico, causadas por fungos filamentosos dermatófitos, leveduras ou fungos filamentosos não-dermatófitos (23). Os fungos filamentosos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* são causadores das dermatofitoses, ou *tineas*, que são denominadas de acordo com o local do corpo infectado, sendo as principais *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea faciei*, *tinea pedis*, *tinea manuum*, *tinea capitis*, *tinea barbae* e *tinea unguium* (24). Dentre estas, a forma mais comum é a *tinea unguium* (onicomicose), a forma mais usual de doenças nas unhas no mundo inteiro (25).

Leveduras do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, causam candidíase cutânea, mas também são patógenos secundários em casos de onicomicose (23,26). Outras leveduras relevantes são as do gênero *Malassezia*, que causam pitiríase versicolor, uma infecção da pele muito comum, além de também poderem estar associadas a casos de dermatite seborreica e dermatite atópica (23,110). Mais raramente, outros gêneros de leveduras estão envolvidos em casos de micoses superficiais, como *Trichosporon*, que causa uma micose rara dos pelos chamada piedra branca (111), e *Rhodotorula*, que pode também estar associada a casos de piedra branca (111) e de onicomicose (112).




Fungos filamentosos não-dermatófitos são menos usuais, habitando normalmente o solo e restos de plantas em decomposição (23,113). Porém, sua incidência principalmente em casos de onicomicose tem crescido ao longo do tempo, possivelmente devido ao uso crescente de técnicas de identificação com biologia molecular. Os principais gêneros são *Scopulariopsis* (principalmente *S. brevicaulis*), *Fusarium* e *Aspergillus* (23,27).

As principais características dos tipos de micoses superficiais mais usuais estão descritas no Quadro 2: candidíase cutânea, piedra branca, piedra negra, pitiríase versicolor, *tinea barbae*, *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea imbricata*, *tinea faciei*, *tinea cruris*, *tinea genitalis*, *tinea manuum*, *tinea pedis* e *tinea unguium* (onicomicose). No quadro, estão descritos o local do corpo afetado, principais agentes etiológicos, métodos diagnósticos mais utilizados, tratamentos indicados e estão ilustradas com figuras as manifestações clínicas mais comuns de cada tipo de micose (Quadro 2). Alguns aspectos mais específicos sobre os agentes etiológicos, a epidemiologia, as manifestações clínicas, o diagnóstico e o tratamento serão abordados nas próximas seções.




Quadro 2. Principais tipos de micoses superficiais e suas características.

| Tipo de micose | Local do corpo | Principais espécies | Principais métodos diagnósticos | Principais tratamentos | Manifestações clínicas usuais | Ref. |
|---------------------------|---|---|---|--|---|---------------|
| Candidíase cutânea | Qualquer área do corpo. Mais comuns: - Intertrigo - Queilite - Dermatite de fralda - Candidíase interdigital | <i>Candida albicans</i> (66% dos casos) <i>Candida tropicalis</i> (20% dos casos) | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Cultura em ágar Sabouraud/Mycosel | Uso tópico de clotrimazol, nistatina, miconazol Uso oral de fluconazol e itraconazol |  Intertrigo candidiásico abaixo do seio (114) | (114-116) |
| Piedra branca | Haste pilar. Mais comum: - Couro cabeludo Menos usuais: - Barba - Bigode - Axila - Púbis | <i>Trichosporon</i> spp.: <i>T. inkin</i> <i>T. beigeli</i> (espécies mais comuns no continente americano) | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Tricoscopia e exame com lâmpada de Wood | Remoção dos fios de cabelo afetados Uso de imidazóis tópicos, principalmente xampu de cetoconazol |  Nódulos brancos nos fios de cabelo (117) | (111,117-119) |
| Piedra negra | Haste pilar. Mais comuns: - Couro cabeludo - Barba Menos usuais: - Axila - Púbis | <i>Piedraia hortae</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Tricoscopia e exame com lâmpada de Wood | Remoção dos fios de cabelo afetados Uso de imidazóis tópicos, principalmente xampu de cetoconazol |  Nódulos pretos no fio de cabelo (117) | (117,118) |




Continuação da tabela na próxima página

| Tipo de micose | Local do corpo | Principais espécies | Principais métodos diagnósticos | Principais tratamentos | Manifestações clínicas usuais | Ref. |
|-----------------------------|---|--|---|---|---|-----------|
| Pitiríase versicolor | Áreas seboreicas do tronco, ombro, partes superiores dos braços e pescoço Menos usuais: rosto, couro cabeludo, áreas submamárias, axilas, virilha, dobras cutâneas e nádegas | <i>Malassezia</i> spp.: <i>M. furfur</i> <i>M. globosa</i> <i>M. sympodialis</i> | Características clínicas das lesões da pele Exame com lâmpada de Wood Dermatoscopia Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de imidazóis, como cetoconazol Uso tópico de xampus de piritionato de zinco, sulfeto de selênio, ácido salicílico com enxofre Uso oral de itraconazol e fluconazol |  Lesões hipopigmentadas (forma mais comum) (120) | (120,121) |
| Tinea barbae | Áreas de barba na face | <i>Trichophyton verrucosum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes/interdigitale</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Cultivo e microcultivo do fungo | Uso oral de griseofulvina, terbinafina ou itraconazol |  Pústulas foliculares com lesão eritematosa (22) | (22,122) |
| Tinea capitis | Cabelo Couro cabeludo Anexos (sobrancelhas e cílios) | <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Microsporum canis</i> <i>Trichophyton violaceum</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Cultivo do fungo em ágar Sabouraud/Mycosel | Uso oral de terbinafina, itraconazol, griseofulvina ou fluconazol |  Alopecia com inflamação mínima e pele escamosa (123) | (123,124) |

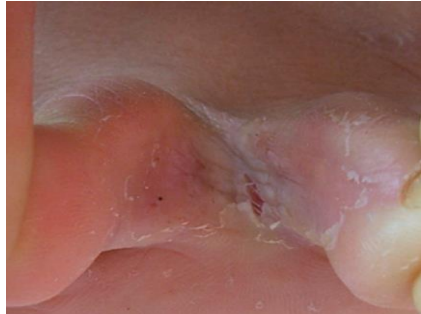

Continuação da tabela na próxima página

| Tipo de micose | Local do corpo | Principais espécies | Principais métodos diagnósticos | Principais tratamentos | Manifestações clínicas usuais | Ref. |
|-------------------------------|--|---|---|---|---|-----------|
| <i>Tinea corporis</i> | Qualquer área do corpo que não seja as mãos, pés, couro cabeludo, região da barba, face, virilha e unhas | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Microsporum canis</i> | Aspecto clínico das lesões Dermatoscopia Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos (como cetoconazol e miconazol), alilaminas (como terbinafina), ciclopirox e tolnaftato Uso oral de itraconazol, fluconazol ou terbinafina |  Placa anular, eritematosa e escamosa no braço (125) | (125) |
| <i>Tinea imbricata</i> | Variante clínica da <i>tinea corporis</i> , endêmica da América do Sul e Central, Sudoeste do Pacífico e Sudeste Asiático; afeta principalmente áreas extensas do tronco | <i>Trichophyton concentricum</i> | Aspecto clínico das lesões Dermatoscopia Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso oral de griseofulvina, terbinafina, itraconazol ou fluconazol |  Aspecto concêntrico das lesões generalizadas no tronco (125) | (125,126) |
| <i>Tinea faciei</i> | Áreas da face (exceto barba) | <i>Trichophyton tonsurans</i> <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporum canis</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos ou alilaminas |  Mácula plana e escamosa (127) | (127) |

Continuação da tabela na próxima página

| Tipo de micose | Local do corpo | Principais espécies | Principais métodos diagnósticos | Principais tratamentos | Manifestações clínicas usuais | Ref. |
|-------------------------------|---|--|--|---|--|--------------|
| <i>Tinea cruris</i> | Região inguinal | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes/interdigitale</i> | Aspecto clínico das lesões Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos, terbinafina ou naftifina |  Lesão típica na virilha de um homem (128) | (24,128,129) |
| <i>Tinea genitalis</i> | Região genital | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes/interdigitale</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos e alilaminas Uso oral de itraconazol ou terbinafina |  Placas descamativas eritematosas e pústulas foliculares (130) | (130,131) |
| <i>Tinea manuum</i> | Dorso ou palma das mãos Espaços interdigitais das mãos | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Microsporum canis</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos e alilaminas Uso oral de fluconazol, itraconazol ou terbinafina |  Eritema monolateral, vesículas e pústulas (132) | (132) |

Continuação da tabela na próxima página

| Tipo de micose | Local do corpo | Principais espécies | Principais métodos diagnósticos | Principais tratamentos | Manifestações clínicas usuais | Ref. |
|---|-------------------------------|--|--|---|---|--------------|
| <i>Tinea pedis</i> | Espaços interdigitais dos pés | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton interdigitale</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% | Uso tópico de azólicos e alilaminas Uso oral de itraconazol, fluconazol ou terbinafina |  Descamação interdigital, maceração e fissura (133) | (133,134) |
| <i>Tinea unguium</i> (onicomicose) | Unhas dos pés ou das mãos | <i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes/interdigitale</i> | Exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) 10 a 20% Cultivo do fungo em ágar Sabouraud/Mycosel | Uso oral de itraconazol, fluconazol ou terbinafina Uso tópico de efinaconazol, tavaborol, ciclopirox ou amorolfina |  Unha do hálux direito com hiperkeratose subungueal e onicólise da lâmina ungueal (135) | (25,135,136) |

2.2.2 Agentes etiológicos e epidemiologia

Os principais agentes etiológicos das micoses superficiais são os fungos filamentosos dermatófitos, caracterizados pela sua capacidade de digerir queratina. Tradicionalmente, todos esses fungos são englobados em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*. Na Figura 10 estão ilustradas as características macro e micromorfológicas de *E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, algumas das principais espécies destes gêneros (23,108). São conhecidos três grandes grupos ecológicos nos quais os dermatófitos se inserem: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos. As espécies antropofílicas naturalmente colonizam humanos e são transmitidas de pessoa para pessoa, sendo consideradas os reais patógenos de micoses superficiais. Elas geralmente causam infecções crônicas não-inflamatórias que muitas vezes podem se tornar epidemias. Espécies zoofílicas são encontradas em animais não humanos, podendo ocasionalmente ser transmitidas para humanos, causando infecções agudas e inflamatórias, dificilmente atingindo proporções epidêmicas. Já as espécies geofílicas se encontram no solo, próximo a tocas de animais, se alimentando de restos de queratina. A transmissão para humanos ocorre através do ambiente e causa infecções altamente inflamatórias, mas que apresentam resolução rápida (137,138).

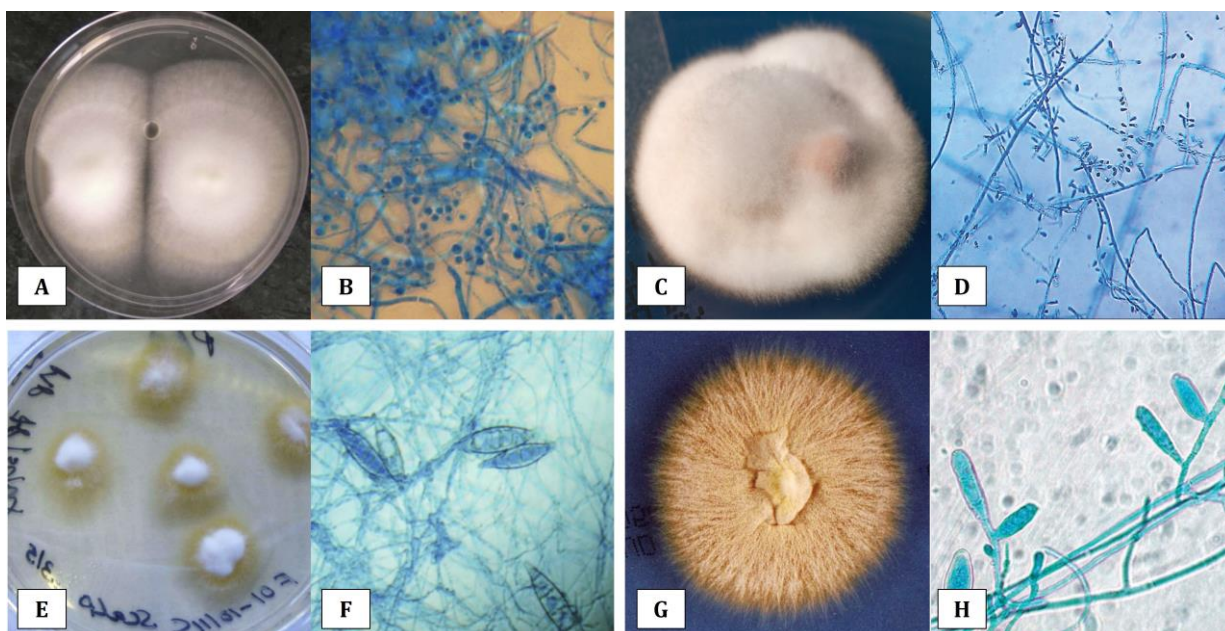


Figura 10. Características macro e micromorfológicas de quatro espécies de fungos filamentosos dermatófitos. (A) Cultivo de *T. mentagrophytes/interdigitale* com colônias de coloração esbranquiçada e textura pulverulenta a aveludada; (B) Microcultivo de *T. mentagrophytes/interdigitale* com hifas septadas, microconídios e macroconídios; (C) Cultivo

de *T. rubrum* com colônia de coloração esbranquiçada e textura aveludada, com verso avermelhado (evidente no centro à direita da colônia); **(D)** Microcultivo de *T. rubrum* com hifas septadas, microconídios e macroconídios; **(E)** Cultivo de *M. canis* com colônia esbranquiçada, textura aveludada e pigmentação amarela na periferia; **(F)** Microcultivo de *M. canis* com macroconídios fusiformes de parede espessa; **(G)** Cultivo de *E. floccosum* com colônia marrom-amarelada e textura granulosa; **(H)** Microcultivo de *E. floccosum* com macroconídios clavados de paredes finas e lisas, arredondados distalmente.

Ref.: adaptado de Nenoff et al. 2013; Thakur, Kalsi, 2019; Saxena et al. 2019; Saito et al. 2008 (23,139–141)

A classificação e identificação tradicional dos fungos filamentosos dermatófitos em três gêneros se baseia essencialmente em características morfológicas dos macroconídios, a qual apresenta limitações. Dessa forma, através de análises filogenéticas, foi proposta em 2017 uma nova taxonomia para dermatófitos, os quais, segundo essa classificação, passaram a ser englobados em nove gêneros: *Trichophyton* (16 espécies), *Epidermophyton* (uma espécie), *Nannizzia* (9 espécies), *Paraphyton* (gênero novo), *Lophophyton* (uma espécie), *Microsporum* (3 espécies), *Arthroderma* (21 espécies), *Ctenomyces* (uma espécie) e *Guarromyces* (gênero novo) (137). Para facilitar a diferenciação de cepas antropofílicas daquelas que não são originalmente patógenas humanas (zoofílicas e geofílicas), a maior parte das espécies antropofílicas foram agrupadas nos gêneros *Trichophyton* e *Epidermophyton* na nova taxonomia (137).

Essa nova taxonomia também foi proposta para resolver o problema de diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *T. mentagrophytes*, que engloba sete espécies filogeneticamente muito próximas (137,142). A principal questão desse complexo é a diferenciação de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale*, a qual no passado era considerada uma variedade de *T. mentagrophytes* (chamada *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*), e não uma espécie separada (142). Na nova classificação, as cepas zoofílicas são classificadas como *T. mentagrophytes*, enquanto as cepas antropofílicas são classificadas como *T. interdigitale* (137).

Em muitos estudos anteriores à nova taxonomia, cepas claramente antropofílicas foram classificadas como *T. mentagrophytes* e, por esse motivo, em algumas seções desta revisão da literatura, as espécies *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* foram mencionadas em conjunto, sem diferenciação. Além disso, mesmo essa classificação apresenta problemas pois,

se a origem da cepa é desconhecida, é muito difícil diferenciar morfológicamente cepas antropofílicas e zoofílicas (142). Mesmo o uso de técnicas moleculares, como o usual sequenciamento da região do *internal transcribed spacer* (ITS) para identificação de fungos dermatófitos, pode não ser capaz de diferenciar *T. mentagrophytes* de *T. interdigitale*, devido à grande proximidade das duas espécies (143). A diferenciação entre as duas espécies também causa debates sobre qual o real agente etiológico da grande epidemia de dermatofitoses que a Índia vem apresentando nos últimos anos, com alguns autores atribuindo a *T. mentagrophytes* e outros a *T. interdigitale* (143,144). Do ponto de vista epidemiológico, essa diferenciação é evidentemente muito relevante. Do ponto de vista clínico, ela também é importante, considerando que cepas antropofílicas são os reais patógenos das dermatofitoses, estando adaptadas para infecções e transmissão entre humanos, o que também pode influenciar nas opções de tratamento (137). Além disso, *T. interdigitale* geralmente é isolada de lesões não inflamatórias de *tinea pedis* e onicomicose, enquanto *T. mentagrophytes* é encontrada em lesões mais inflamatórias de *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea faciei* e *tinea capitis* (144).

Dentro do gênero *Trichophyton*, a espécie antropofílica *T. rubrum* é claramente diferenciada das demais (137) e é o dermatófito mais comum no mundo todo (108,145). *T. rubrum* é o principal agente etiológico em casos de *tinea pedis* (133), *tinea manuum* (132), *tinea cruris* (108), *tinea corporis* (125) e onicomicose (136). Essa prevalência é atribuída ao fato de *T. rubrum* ter uma capacidade maior de se espalhar que outros dermatófitos (138,146), além de apresentar diversos fatores de virulência como enzimas hidrolases, queratinases e cisteína dioxigenase (145). No entanto, apesar de continuar mundialmente como a espécie mais prevalente, *T. rubrum* vem sendo substituída por *T. mentagrophytes/interdigitale* em alguns países, principalmente na grande epidemia atual de dermatofitoses da Índia (140,147,148). Alguns autores apontam que a espécie zoofílica *T. mentagrophytes* vem sofrendo um fenômeno de antropização, se adaptando à superfície da pele humana e aumentando sua transmissão entre humanos, a ponto de causar epidemias (147,148). No entanto, esse fenômeno ainda foi pouco estudado, mas merece ser discutido principalmente no contexto da epidemia indiana (147).

Em relação às leveduras, o principal gênero envolvido é *Candida*, que faz parte da microbiota comensal da mucosa humana. Quando na pele, e em condições específicas como alta umidade, oclusão por roupas ou sapatos, rompimento da barreira cutânea ou alteração da flora microbiana, as leveduras do gênero *Candida* são reconhecidas como patogênicas e causam infecções cutâneas (115,116). Além disso, também podem causar onicomicose,

podendo afetar tanto indivíduos imunocompetentes como imunossuprimidos, principalmente aqueles com sistema imunológico comprometido devido ao envelhecimento, diabetes mellitus e infecção por HIV, além do uso de terapias medicamentosas com imunossupressores e antibióticos de amplo espectro (26). Dentre as espécies do gênero *Candida*, a principal em casos de micoses superficiais é *C. albicans*, seguida de *C. parapsilosis* e, em menor proporção, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (116,149). Além dessas espécies, muitas outras podem estar envolvidas, como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis* e *C. sake* (150–152), as quais podem piorar o prognóstico das infecções e dificultar seu tratamento, pois apresentam perfil variado de suscetibilidade aos antifúngicos utilizados rotineiramente (149).

Por fim, ainda existe um amplo universo de fungos filamentosos não-dermatófitos que podem ser agentes etiológicos de micoses superficiais, cujos casos vêm aumentando nos últimos anos (145). Além dos gêneros usuais *Scopulariopsis* e *Fusarium*, também são relatados diversos outros gêneros e espécies: *Aspergillus* spp. (principalmente *A. flavus*) (153), *Neoscytalidium* spp. (154,155), *Acremonium* spp., *Cladosporium* spp. (27), *Arthrimum* spp. (27,156), entre muitas outras. Alguns autores sugerem, ainda, que há um amplo espectro de fungos filamentosos não-dermatófitos causadores de onicomicoses não reconhecidos, assim como a possibilidade de existirem espécies fúngicas ainda não descritas nesses casos (27). É importante destacar, porém, que muitas vezes os fungos filamentosos não-dermatófitos apenas crescem saprofiticamente nas unhas com alterações patológicas, não sendo os agentes etiológicos primários. Dessa maneira, é importante distinguir quando são patógenos e quando são apenas colonizadores seguindo alguns critérios, como teste micológico direto positivo, isolamento consecutivo em coletas realizadas durante três meses e ausência de detecção de um fungo dermatófito (145).

2.2.3 Epidemiologia no Rio Grande do Sul

Não existem muitos dados sobre a epidemiologia das micoses superficiais no estado do Rio Grande do Sul. Em dois grandes estudos epidemiológicos sobre dermatofitoses, encontrou-se que a maior porcentagem de casos era de onicomicose: no estudo de Aquino *et al.* (2007) (157), com análise de 2.033 casos de dermatofitoses, 54% destes corresponderam à onicomicose; e no estudo de Heidrich *et al.* (2015) (158), com análise de 9.048 casos, 48,5% destes corresponderam à onicomicose. Em ambos, o segundo tipo de micose superficial mais

prevalente foi *tinea pedis* (157,158). Em relação ao sexo e à idade, observa-se o predomínio do sexo masculino e da faixa etária entre 40 e 50 anos (158).

Quanto aos agentes etiológicos, recentemente, em 2021, em um estudo com 75 isolados de *Trichophyton* spp. de casos de onicomicose em Porto Alegre, 81% destes (61) foram identificados como *T. interdigitale* (159), o que está de acordo o predomínio da espécie em casos de onicomicose encontrado em 2013 em outro estudo (160). No entanto, em análises de casos anteriores a 2013, a espécie *T. rubrum* foi encontrada como a mais prevalente (157,158,161). É importante destacar que, apenas no primeiro estudo mencionado, realizado em 2021, foi feita a identificação molecular dos isolados fúngicos. Nos outros, ela foi realizada apenas pelas características macro e micromorfológicas. Porém, as espécies *T. rubrum* e *T. interdigitale* são facilmente distinguíveis pela coloração do verso das colônias (avermelhada em *T. rubrum*), além de ter sido realizado teste de urease nos estudos, que permite uma boa diferenciação entre as duas espécies (158). Dessa forma, especula-se que, assim como no cenário indiano, também possa estar ocorrendo uma mudança no predomínio dos agentes etiológicos das dermatofitoses no Rio Grande do Sul, de *T. rubrum* para *T. interdigitale* (147). No entanto, mais estudos epidemiológicos são necessários no estado, com diferentes tipos de dermatofitoses, para determinar com precisão a prevalência das espécies.

2.2.4 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas dos diferentes tipos de micoses superficiais são muito diversas, dependendo principalmente do local do corpo afetado e do agente etiológico (Quadro 2). Dessa maneira, devido a essa grande diversidade, não serão exploradas aqui manifestações clínicas específicas de cada tipo de micose. No entanto, serão destacadas duas questões relevantes em relação a esse tema: a *tinea incognita* (ou *incognito*) e a possibilidade de micoses superficiais se tornarem invasivas.

A *tinea incognita* foi descrita pela primeira vez em 1968 e se caracteriza por apresentação clínica atípica, dificultando o reconhecimento e diagnóstico. Isso pode levar ao diagnóstico equivocado de outras doenças, como eczema, psoríase e lúpus eritematoso cutâneo (162,163). A *tinea incognita* ocorre principalmente em um quadro de imunossupressão local ou sistêmica induzida pelo uso de corticosteroides, além de, mais raramente, dos imunomoduladores pimecrolimo e tacrolimo (164). Alguns autores sugerem que, ao invés do uso do termo *tinea incognita*, essa manifestação clínica deve ser chamada de “*tinea* modificada por esteroides” (165,166).

De maneira resumida, o uso de corticosteroides diminui a inflamação, dando a impressão de que a lesão está melhorando, enquanto o fungo continua presente e ativo devido às alterações imunológicas induzidas pelo uso do medicamento (tópico ou oral). Assim, devido à aparente melhora, o tratamento é interrompido, e nesse momento a inflamação retorna, mas com um aspecto diferente (22,164). Em geral, o uso de corticosteroides faz com que apareça um eritema difuso sem bordas definidas, com pápulas e pústulas foliculares, tornando difícil seu reconhecimento (24,162) (Figura 11). Na Índia, o uso de pomadas com combinação de antifúngico, corticoide e antibiótico é um dos fatores elencados como o responsável pela grande epidemia de dermatofitoses pois, além de dificultar o diagnóstico, também faz os casos de *tinea* se tornarem crônicos e com lesões extensas (166,167).



Figura 11. Manifestações clínicas da *tinea incognita*. (A) Eritema disseminado e descamação em caso de *tinea faciei*; (B) *Tinea incognita* na parte superior das costas.

Ref.: adaptado de Verma, 2017; Arenas et al. 2010 (163,165)

A outra manifestação clínica das micoses superficiais que merece destaque é a possibilidade de elas se tornarem infecções invasivas. Essas micoses estão normalmente confinadas ao estrato córneo e unhas, com lesões não ultrapassando a camada basal. Porém, em situações específicas e mais raras, os fungos dermatófitos penetram profundamente na derme e causam infecções invasivas, envolvendo o tecido subcutâneo e podendo atingir também órgãos internos, como gânglios linfáticos, ossos e cérebro (168,169). Apesar de mais rara, essa apresentação clínica das micoses superficiais está associada a uma mortalidade elevada.

Em uma revisão sistemática, foram identificados 160 casos de infecções invasivas causadas por fungos dermatófitos entre 2000 e 2020. Os principais fatores de predisposição encontrados para esse tipo de micose invasiva são transplante de órgãos sólidos, uso de imunossupressores tópicos, mutações gênicas específicas (CARD9 e STAT3), diabetes e trauma. A principal espécie envolvida foi *T. rubrum*, dado que está de acordo com sua prevalência mundial. A mortalidade ficou entre 5,5%, para pacientes sem mutações gênicas, chegando a 17,4% para os pacientes que as apresentavam (169). Além disso, outros fatores de predisposição que podem ser citados são uso sistêmico de corticosteroides, infecção por HIV (170) e doenças hepáticas (168). No entanto, infecções invasivas também podem acontecer em pacientes sem imunossupressão (171).

Além dos fungos filamentosos dermatófitos, casos de onicomicose causados por *Candida* spp. também podem evoluir para infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, como idosos, pessoas com diabetes mellitus e infecção por HIV (26). Assim, destaca-se a importância de realizar um tratamento rápido e eficiente de micoses superficiais em pacientes imunossuprimidos, a fim de evitar a progressão sistêmica da infecção. Não existe um tratamento padrão para esses casos, mas em geral a terbinafina apresenta bons resultados. Mais preocupante é o quadro de pacientes que apresentam mutações gênicas, os quais usualmente requerem tratamento profilático durante toda a vida (169,170).

2.2.5 Diagnóstico

Como pode ser observado no Quadro 2, um dos métodos diagnósticos mais indicados para todos os principais tipos de micoses superficiais é o exame micológico direto com hidróxido de potássio (KOH) a 10 ou 20% e observação no microscópio ótico (117). Esse método é simples, barato e rápido de ser realizado, sendo fundamental para diagnosticar a presença de uma infecção fúngica (172). Entretanto, o exame micológico direto apresenta limitações, necessitando de uma boa quantidade e qualidade de amostra para evitar resultados falso-negativos, exigindo um profissional experiente para visualização das estruturas fúngicas e apresentando ineficiência para identificação do gênero e da espécie do fungo (173).

Para realizar a identificação do fungo, tradicionalmente é feito o seu cultivo em ágar Sabouraud suplementado com antibiótico (cloranfenicol) e cicloheximida (utilizado para seleção de fungos dermatófitos) (172). No entanto, os cultivos também apresentam percalços, pois nem todas as espécies podem ser diferenciadas através das características macro e

micromorfológicas, a exemplo de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* (137,174). Além disso, muitas vezes, mesmo com um exame micológico direto positivo, o fungo pode não crescer no meio de cultivo, devido a diversos fatores como pouca quantidade de amostra, falta de viabilidade celular no material coletado ou utilização de antifúngicos antes da coleta (174). O tempo necessário para o cultivo também é uma limitação, pois a maioria dos fungos dermatófitos necessitam de 7 até 21 dias para crescer (173). A identificação da espécie não é fundamental para todos os tipos de micoses superficiais e o tratamento pode ser iniciado sem a determinação do agente etiológico. Porém, em algumas situações, como em lesões causadas por espécies zoofílicas e em casos de fungos filamentosos não dermatófitos, a identificação é fundamental para a escolha e eficiência do tratamento (172,175).

A partir das limitações dos métodos convencionais de diagnóstico, diversas novas técnicas e metodologias passaram a ser propostas. Entre elas, se destacam as relacionadas à biologia molecular, com a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (138,172,174). As técnicas moleculares têm dois ramos de aplicação: um, a identificação do fungo direto de amostras clínicas do paciente (unhas, raspado de pele, entre outras topografias); o outro, a identificação do fungo a partir de DNA extraído das culturas (138).

A detecção e identificação do fungo diretamente de amostras do paciente apresentam vantagens incontestáveis em relação aos métodos convencionais, como a rapidez na obtenção dos resultados (possível de ser obtido em até 24 horas) e aumento tanto da sensibilidade quanto da especificidade, evitando o uso de tratamentos inadequados, por exemplo (174). A identificação de fungos dermatófitos é realizada principalmente a partir dos polimorfismos presentes nos espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês *internal transcribed spacer*) ITS1 e ITS2 da sequência codificadora do rDNA 5.8S. A utilização dessa região apresenta muita sensibilidade e confiabilidade para diferenciar as espécies (172). Já a identificação dos fungos a partir de DNA extraído das culturas não é tão útil clinicamente, pois exige o cultivo antes da realização da PCR. No entanto, é essencial para fins de pesquisa e dados epidemiológicos, permitindo a verificação da incidência de espécies e sua identificação mesmo em isolados já armazenados em micotecas, por exemplo (138).

Em ambas as situações, a identificação com técnicas moleculares também apresenta limitações. As principais são a disponibilidade dessas técnicas apenas em grandes centros especializados e o alto custo envolvido (que, em 2017, era de 10 a 15 euros por amostra). Poucos laboratórios já realizam rotineiramente métodos moleculares para identificação de fungos dermatófitos em amostras de pacientes, com finalidades clínicas; a maior parte faz uso

principalmente para pesquisa (172). Dessa maneira, apesar de terem vantagens indiscutíveis sobre os métodos diagnósticos convencionais, é preciso sempre balancear os benefícios e as desvantagens, avaliando o real impacto clínico da biologia molecular em cada caso (172,174).

2.2.6 Tratamento

Os antifúngicos disponíveis atualmente são agrupados em quatro classes principais: polienos (representados principalmente pela anfotericina B), azólicos (representados principalmente pelo itraconazol, cetoconazol e fluconazol), equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e alilaminas (representados principalmente pela terbinafina). Todos os antifúngicos dessas classes agem na síntese da parede celular fúngica. Também há a 5-flucitosina, um antimetabólico que interfere na síntese de DNA e proteínas; o ciclopirox, que inibe as enzimas responsáveis pela degradação de peróxidos na célula fúngica; e a griseofulvina, que inibe a mitose (176). Para infecções fúngicas invasivas, as opções terapêuticas incluem apenas os polienos, azólicos e equinocandinas (177).

O tratamento das micoses superficiais pode ser realizado com antifúngicos tópicos ou orais. Além disso, também pode ser feito o uso combinado de ambos (178). O tratamento primário indicado para casos de *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea pedis* e *tinea manuum* são antifúngicos tópicos, principalmente os azólicos, como clotrimazol, miconazol e econazol. Já para casos de onicomicose e *tinea capitis*, em geral é indicado uso oral de antifúngicos (179). Para *tinea capitis*, isso é necessário pois antifúngicos tópicos não penetram o suficiente na haste capilar para erradicar a infecção (180); já para onicomicose, os agentes tópicos apresentam dificuldade de penetração e absorção na lâmina ungueal (181). Apesar disso, é possível o uso de medicamentos tópicos, dependendo da severidade das lesões em casos de onicomicose (179). Em relação à candidíase cutânea, não existe uma diretriz conclusiva sobre qual a melhor opção de tratamento, dependendo da apresentação clínica do caso; para uso tópico, o mais indicado é o clotrimazol e, para uso sistêmico, o fluconazol (115).

Ressalta-se que o uso tópico de antifúngicos, para qualquer tipo de micose superficial, somente é indicado para lesões localizadas, pois lesões extensas, crônicas, recalcitrantes ou modificadas pelo uso de corticosteroides exigem o uso de medicações orais, independentemente do tipo de micose (178,179). Análises sistemáticas comparando a eficácia em casos de micoses superficiais não encontraram diferenças significativas entre as diferentes classes de antifúngicos de uso tópico (182,183). No entanto, em relação à cura micológica ao

final do tratamento, as alilaminas terbinafina e butenafina se mostraram superiores em relação aos azólicos clotrimazol, oxiconazol e sertaconazol (183). Além dos medicamentos usuais, também são estudados diferentes compostos naturais, como óleos essenciais de plantas e quitosano, para superar os efeitos adversos dos antifúngicos convencionais e o problema da resistência antifúngica (179). Quando é necessário o uso de terapias antifúngicas sistêmicas, os principais utilizados são o itraconazol e a terbinafina, em casos de dermatofitoses, e o fluconazol, em casos de candidíase cutânea (178).

A maior parte dos estudos referentes ao tratamento são realizados sobre onicomicose, devido ao fato dessa ser a micose superficial mais comum, e também pela questão de dificuldade de absorção de agentes tópicos nas unhas (184). Além disso, o uso de antifúngicos tópicos requer um longo tempo de tratamento e adesão do paciente ao tratamento para que este seja efetivo para cura (181). A cura completa é definida pela combinação da cura clínica (unha com aparência normal) e micológica (exame micológico direto negativo) (185). Entre os medicamentos de uso tópico, destacam-se o ciclopirox e a amorolfina e, entre os de uso oral, a terbinafina, o itraconazol e o cetoconazol (186). No entanto, nenhuma dessas modalidades de tratamento consegue atingir taxas de cura de 100% e, para uso tópico, a eficácia é muito menor (135). Assim, diferentes e novas estratégias de tratamento vêm sendo estudadas, como novas formulações de agentes tópicos também com potenciadores de penetração (187,188), uso de sistemas de laser, principalmente de CO₂ (189) e terapia fotodinâmica (190). Além dos fatores usuais que levam à dificuldade do tratamento, também se destaca a questão de casos nos quais o agente etiológico é um fungo filamentosso não-dermatófito, os quais podem ser resistentes aos antifúngicos usualmente utilizados (191,192).

2.3 Testes de suscetibilidade antifúngica

Os testes de suscetibilidade antifúngica são realizados para definição da suscetibilidade/resistência *in vitro* de um isolado fúngico para um determinado antifúngico. Essa definição é feita através da concentração inibitória mínima (CIM), que é a concentração mínima necessária para inibir o crescimento do fungo (33). O primeiro antifúngico desenvolvido foi a anfotericina B, em 1958, apresentando bom desempenho mas alta toxicidade. Apenas em 1973 foi desenvolvida a flucitosina, e os azóis de primeira geração (fluconazol e itraconazol) foram disponibilizados em 1990. No começo dos anos 2000, surgiram novos agentes antifúngicos mais eficazes e seguros, como as equinocandinas para

combater *Candida* spp. e os azóis de segunda geração (como voriconazol, posaconazol e isavuconazol), eficazes contra fungos filamentosos (193). Portanto, até 1973, não havia necessidade de realizar testes de suscetibilidade antifúngica, pois apenas a anfotericina B estava disponível para o tratamento de infecções fúngicas.

Com o surgimento de novos agentes antifúngicos, testes de suscetibilidade começaram a ser realizados, principalmente com métodos de microdiluição em caldo adaptados a partir de protocolos para bactérias ou com testes de difusão em ágar. Porém, a variabilidade interlaboratorial dos valores de CIM era muito alta, prejudicando a interpretação correta dos resultados e sua correlação clínica. Muitos fatores influenciam na determinação das CIMs, como tamanho do inóculo inicial, meio e tempo de cultivo e concentração dos antifúngicos testados (194,195). Dessa maneira, o *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI), uma organização dedicada para a padronização de testes de suscetibilidade para diferentes microrganismos, iniciou em 1985 um esforço para padronizar os testes de suscetibilidade antifúngica (33). Isso levou ao surgimento de diversos protocolos que permitem o controle de qualidade e padronização dos testes, com destaque para os protocolos M27 (para testes de microdiluição em caldo de leveduras) e M38 (para testes de microdiluição em caldo de fungos filamentosos) (196,197). Da mesma maneira, outras organizações como o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) também desenvolveram protocolos para testes de suscetibilidade antifúngica (198). No entanto, os protocolos do CLSI são os mais amplamente utilizados.

De forma resumida, os protocolos de microdiluição em caldo do CLSI são realizados da seguinte maneira: uma quantidade inicial padronizada de inóculo fúngico é incubada na presença de uma diluição seriada do antifúngico a ser testado, em poços contendo um meio de cultivo padrão e estéril, usualmente meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*); e o valor de CIM é determinado pela menor concentração do antifúngico capaz de inibir o crescimento do fungo (total ou parcialmente, dependendo do antifúngico) em comparação com o poço de controle de crescimento (sem adição de antifúngico) (199) (Figura 12).

Além da CIM, outro parâmetro utilizado para avaliar a suscetibilidade antifúngica é a concentração fungicida mínima (CFM), definida como a menor concentração de antifúngico capaz de matar pelo menos 99,9% do inóculo final, presente nos poços que não apresentaram crescimento fúngico no teste para determinação da CIM (200). A CFM tem sido avaliada em diversos estudos (201–203), pois seu resultado é importante principalmente no caso de pacientes imunossuprimidos, cujos sistemas imunológicos podem ser ineficientes na

eliminação de células fúngicas remanescentes após o tratamento. No entanto, diferentemente da CIM, não existem protocolos padrão para determinação da concentração fungicida mínima (204).

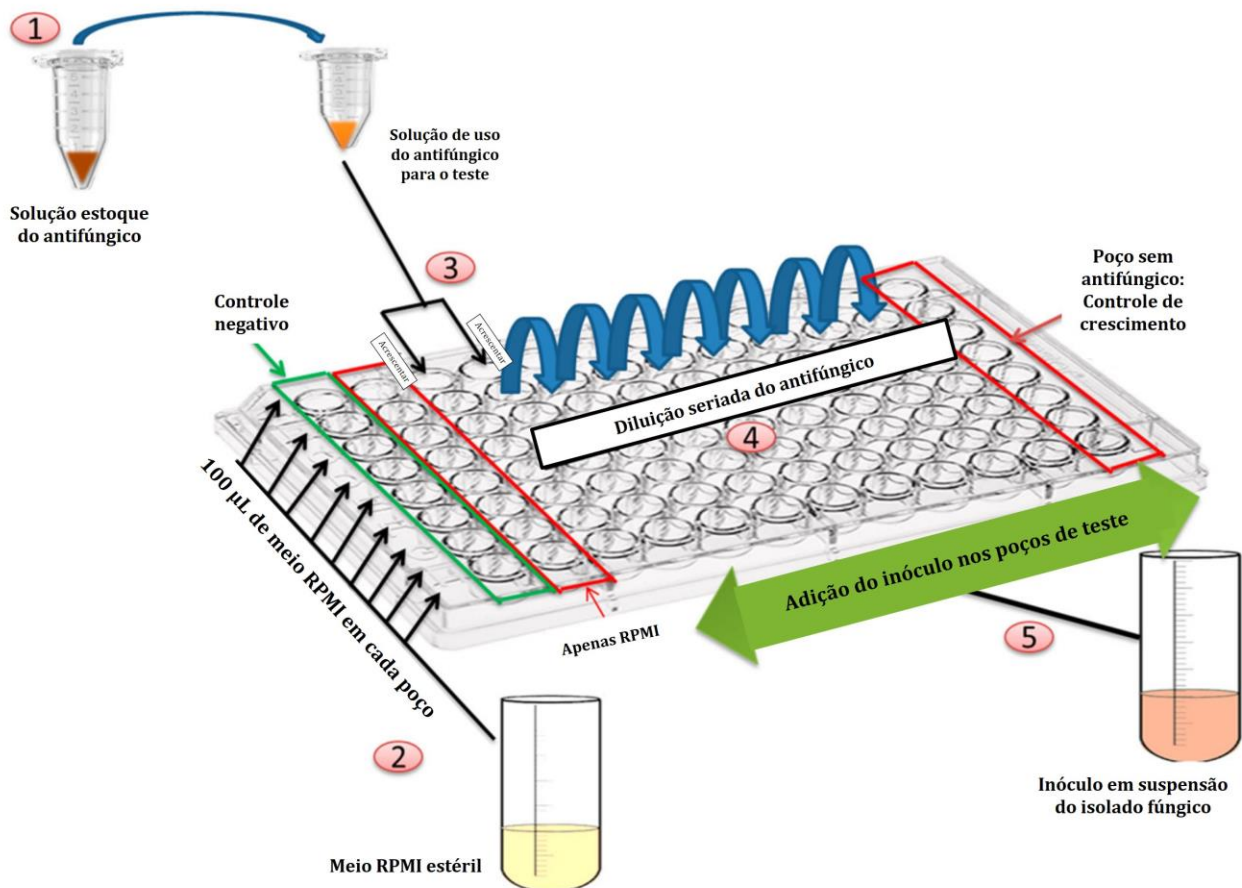


Figura 12. Esquema do teste de suscetibilidade antifúngica seguindo o protocolo de microdiluição em caldo do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Ref.: adaptado de Qidwai et al. 2018. (205)

Os valores de CIM não podem ser correlacionados diretamente com suscetibilidade/resistência *in vivo* dos isolados fúngicos, pois diversos fatores ambientais e fisiológicos que não são reprodutíveis nos testes *in vitro* influenciam na suscetibilidade antifúngica (206). Portanto, as CIMs não têm relevância clínica e epidemiológica direta. Além disso, esses valores são dependentes das condições em que o teste foi realizado (207). Para superar esse problema e permitir a interpretação dos valores de CIM, começaram a ser estabelecidos pontos de corte (*clinical breakpoints*) que classificam os isolados fúngicos em

quatro categorias: sensível, intermediário, sensível dose-dependente e resistente ao antifúngico que está sendo testado. Os protocolos do CLSI possuem pontos de corte definidos apenas para as seis espécies mais usuais do gênero *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) para os antifúngicos anidulafungina, caspofungina, micafungina, fluconazol e voriconazol. Não existem pontos de corte definidos para nenhum fungo filamentosos, exceto para *Aspergillus fumigatus* com voriconazol (33).

O estabelecimento de pontos de corte é um processo complexo que requer uma grande quantidade de dados, para permitir uma correlação *in vitro-in vivo* das CIMs (208). O principal limitador para definição de pontos de corte para leveduras menos comuns e fungos filamentosos é a falta de ensaios clínicos que correlacionem os valores de CIM com os desfechos de pacientes tratados com o antifúngico (209). Além disso, existem diversos fatores confundidores em pacientes com infecções fúngicas, uma vez que muitas vezes eles apresentam outras comorbidades. Dessa maneira, não é possível estabelecer pontos de corte para diversas espécies de fungos (33,208).

Para superar o problema da falta de pontos de corte, foi proposto recentemente o uso de valores de corte epidemiológicos (*epidemiological cutoff values – ECVs*). O ECV distingue isolados *wild-type* (selvagens) de isolados *non-WT* (não-selvagens). Isolados WT são aqueles que não apresentam nenhum mecanismo de resistência antifúngica. Isolados não-WT possuem mecanismos de resistência adquiridos, apresentando CIM maior que o ECV definido da espécie e agente antifúngico que estão sendo testados. Porém, as classificações de WT e não-WT não são sinônimos de “sensível” e “resistente” e devem ser interpretados com cautela, pois são baseados apenas em dados *in vitro*. As aplicações clínicas dos ECVs ainda precisam ser mais bem definidas, mas esses valores auxiliam na interpretação das CIMs quando não existem pontos de corte (209). Já foram definidos ECVs para *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gatti* (210), *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* (211), *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* (212).

A determinação dos pontos de corte e dos ECVs é essencial para transpor os resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica para a prática clínica, além da compilação de dados epidemiológicos sobre o crescente problema de resistência antifúngica. Em geral, é recomendada a realização de testes *in vitro* em situações de uso prologado de terapia antifúngica, infecções recalcitrantes e recorrentes ou quando a escolha de determinado medicamento é fundamental no manejo do paciente (213). Os resultados dos testes de suscetibilidade antifúngica já se mostraram clinicamente úteis em casos de candidemia, para

identificação de isolados resistentes aos principais antifúngicos e previsão do desfecho clínico. Para o gênero *Aspergillus*, os testes *in vitro* são menos realizados, mas podem ser indicados em determinadas situações. Porém, para fungos filamentosos de outros gêneros, como *Fusarium*, *Mucor* e *Scedosporium*, é recomendado cautela, pois as CIMs não são boas preditoras do desfecho clínico, além dos mecanismos de resistência ainda serem pouco conhecidos (214,215). Para esses fungos, o resultado do tratamento parece estar relacionado diretamente com os mecanismos intrínsecos de resistência, e não aqueles desenvolvidos durante a terapia (216).

Outro fator que dificulta a aplicação clínica dos testes de suscetibilidade antifúngica é a demora para obtenção dos resultados (217). Além de exigir profissionais qualificados e ter custo elevado, o método de microdiluição em caldo do CLSI exige períodos de incubação que vão de 24 horas, para leveduras, até quatro dias, para fungos filamentosos dermatófitos (33). Essas desvantagens dificultam a realização dos testes de suscetibilidade antifúngica de maneira rotineira em laboratórios clínicos. Existem métodos comerciais, como o Sensitre™ YeastOne™ (ThermoFischer Scientific) e o Vitek® 2, que possuem execução mais simples e rápida, mas foram desenvolvidos para espécies de *Candida*, não incluindo outras leveduras e fungos filamentosos.

Nesse sentido, novas metodologias surgiram nos últimos anos, como a técnica de MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry* ou Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo) (218,219), plataformas baseadas na análise de ácidos nucleicos (220), citometria de fluxo (221) e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (222). Para fungos causadores de dermatomicoses, já foi também proposto um ensaio de corneofungimetria, no qual o teste de suscetibilidade é realizado *in vitro* em camadas do estrato córneo humano, permitindo a incorporação de alguns fatores presentes *in vivo* (223). Todas essas técnicas são promissoras para permitir a realização de testes de suscetibilidade antifúngica na rotina de laboratórios clínicos.

2.3.1 Testes de suscetibilidade antifúngica de fungos causadores de micoses superficiais

Na literatura, estudos avaliando a suscetibilidade antifúngica são mais comuns com isolados de *Candida* spp. provenientes de casos de candidemia e infecções vulvovaginais. Para fungos filamentosos dermatófitos, fungos filamentosos não-dermatófitos, isolados de

Candida spp. e leveduras de outros gêneros causando micoses superficiais, as pesquisas sobre suscetibilidade antifúngica são mais escassas. Possivelmente, isso decorre do fato de que infecções sistêmicas causadas por leveduras do gênero *Candida* são graves e associadas com alta mortalidade, necessitando de tratamento antifúngico imediato e adequado (215). No entanto, as micoses superficiais são muito prevalentes e, considerando o crescente problema da resistência antifúngica e a toxicidade de tratamentos com antifúngicos orais, é relevante conhecer o perfil de suscetibilidade dos fungos causadores das micoses superficiais para direcionar um melhor tratamento e utilização racional de medicamentos (224). Além disso, em alguns casos específicos, como em pacientes imunossuprimidos, fungos causadores de micoses superficiais podem invadir a derme e causar infecções invasivas com alta mortalidade (169).

Os resultados dos estudos encontrados avaliando a suscetibilidade antifúngica de fungos filamentosos dermatófitos, fungos filamentosos não-dermatófitos, leveduras do gênero *Candida* e leveduras não-*Candida* de casos de micoses superficiais estão incluídos nos quadros 3, 4, 5 e 6, respectivamente. Foram incluídos apenas estudos que realizaram os testes com métodos de microdiluição em caldo (com protocolos do CLSI/EUCAST), para permitir uma melhor comparação dos resultados. Apenas para a espécie *Rhodotorula mucilaginosa* foi incluído um estudo que utilizou um método de tiras com antifúngicos (ATB Fungus 3 System, ATBF3, bioMérieux), pois foi o único encontrado com essa levedura emergente em casos de onicomicose (225). Mesmo que sejam uma possível fonte de contaminação para humanos (226), também não foram incluídos estudos que avaliaram a suscetibilidade de isolados fúngicos provenientes de micoses em outros animais, como cachorros e gatos. Além disso, também foram excluídos estudos que definiram critérios de suscetibilidade e resistência de fungos filamentosos dermatófitos, sem incluir os valores de CIM, pois não existem critérios oficiais para essas definições.

Para fins de melhor visualização dos dados, os resultados para alguns antifúngicos menos usuais que foram avaliados apenas em poucos estudos não foram incluídos nas tabelas; foram acrescentados apenas aqueles mais utilizados na prática clínica. Para as equinocandinas caspofungina, micafungina e anidulafungina, são avaliados os valores das concentrações efetivas mínimas (CEMs), e não das CIMs. A CEM é a menor concentração do antifúngico que leva ao crescimento de formas de hifas pequenas, arredondadas e compactas quando comparado com as hifas no poço de controle de crescimento (197). Esse ponto de corte

também é medido em $\mu\text{g/mL}$ e se correlaciona melhor com a atividade *in vivo* das equinocandinas (227).

Para fungos filamentosos dermatófitos, a espécie mais testada foi *Trichophyton rubrum* (Quadro 3), o que está de acordo com a prevalência global dessa espécie em casos de dermatofitoses (228). A segunda espécie mais testada foi *T. interdigitale/mentagrophytes*. Essas espécies foram incluídas em conjunto pois formam um complexo de difícil separação, mesmo com técnicas de biologia molecular (144). Os gêneros *Microsporum* e *Epidermophyton* foram encontrados em poucos estudos. O antifúngico mais testado foi a terbinafina e este foi o que apresentou menores MICs, com valores chegando a $0,001 \mu\text{g/mL}$ para *T. interdigitale/mentagrophytes* (159). De fato, a terbinafina é o antifúngico utilizado como terapia primária para dermatofitoses (228). O itraconazol foi o segundo antifúngico mais testado e também apresentou valores baixos de CIM, porém alguns isolados de *T. rubrum* e *T. interdigitale/mentagrophytes* tiveram valores altos acima de $16 \mu\text{g/mL}$ (159,229,230). O fluconazol foi o antifúngico menos eficaz, o que é esperado, pois fungos filamentosos usualmente não são suscetíveis a esse antifúngico (197).

Para fungos filamentosos não-dermatófitos (FNDs), o gênero mais testado foi *Aspergillus*, seguido de *Fusarium* e *Scopulariopsis* (Quadro 4), que estão entre os gêneros de FNDs mais usuais em casos de micoses superficiais (113,229,231). Outros gêneros de destaque são *Arthriniium*, *Cladosporium* e *Acremonium* (27). Itraconazol e terbinafina foram os dois antifúngicos testados em todos os estudos. Apesar de terem apresentado boa ação *in vitro* contra alguns isolados, destaca-se o grande número de isolados que tiveram altos valores de CIM, chegando a mais que $64 \mu\text{g/mL}$ principalmente para o gênero *Fusarium* (232). Considerando que estes são dois antifúngicos de primeira linha no tratamento de onicomicoses, por exemplo (Tsang et al. 2019), esses dados são relevantes. Nesse contexto, foram testados outros antifúngicos, como a anidulafungina, que mostrou valores muito baixos de CEM para várias espécies do gênero *Aspergillus*, abaixo de $0,008 \mu\text{g/mL}$ (153). No entanto, algumas espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos menos usuais, como *Purpureocillium lilacinum*, *Microascus gracilis* (27) e *Fusarium oxysporum* (229) apresentaram valores de CIM/CEM altos para todos os antifúngicos testados, chegando a $16 \mu\text{g/mL}$ até mesmo para a terbinafina, ressaltando a importância da realização de testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro* com FNDs.

O gênero *Candida* foi o mais amplamente testado nos estudos encontrados, com 17 espécies representadas por ao menos um isolado (Quadro 5). *C. albicans* foi a espécie mais

testada, seguida de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Para esse gênero, conforme descrito anteriormente, existem pontos de corte definidos para alguns antifúngicos e algumas espécies nos protocolos do CLSI e EUCAST. Por esse motivo, além dos valores de CIM/CEM, foram incluídos na tabela os critérios sensível/sensível dose dependente/intermediário/resistente, quando estes foram descritos no estudo em análise. De acordo com o CLSI, esses critérios têm o seguinte significado: **sensível** – o isolado é inibido quando a concentração indicada de antifúngico é utilizada, sendo este adequado para o tratamento; **sensível dose dependente** – a inibição do isolado depende da dose utilizada, sendo que são necessárias doses mais altas que as usuais para que o tratamento seja efetivo; **intermediário** – inclui isolados que são moderadamente suscetíveis ao antifúngico, ou para os quais não existem dados suficientes para classifica-los como sensíveis ou resistentes; **resistente** – o isolado não é inibido pelo antifúngico, independentemente da dose ou do local de infecção, e o tratamento com esse agente não é indicado (196).

Observa-se que a suscetibilidade do gênero *Candida* é bastante variada, até mesmo entre isolados de uma mesma espécie, dependendo de sua origem e infecção associada. O fluconazol é o antifúngico mais utilizado no tratamento de infecções por *Candida*, o qual foi testado em todos os estudos encontrados, sendo que seu uso indiscriminado é um dos fatores responsáveis pelo surgimento de isolados resistentes (233). *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis* foram as espécies que apresentaram isolados resistentes ao fluconazol. Para os outros agentes azólicos itraconazol, voriconazol e cetoconazol, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* também apresentaram isolados resistentes. O maior número de isolados resistentes, entre todas as espécies, foi para a terbinafina, pois diferentemente de fungos filamentosos, esse antifúngico apresenta baixa eficácia contra o gênero *Candida* (234,235).

Foram encontrados poucos estudos com leveduras não-*Candida* causadoras de micoses superficiais (Quadro 6). Para o gênero *Malassezia*, foram avaliadas sete espécies, as quais apresentaram perfil de suscetibilidade variado. Uma das principais espécie do gênero, *M. furfur*, apresentou isolados com altos valores de CIM para anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol e cetoconazol, possivelmente apresentando resistência *in vitro* a esses antifúngicos (236). *Rhodotorula mucilaginosa* apresentou valores altos de CIM para fluconazol, itraconazol, voriconazol e terbinafina (225). Isolados de três espécies de *Trichosporon* apresentaram perfil de suscetibilidade variado, com alguns apresentando valores altos de CIM para fluconazol, itraconazol e voriconazol (237).

Quadro 3. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de fungos filamentosos dermatófitos de casos de micoses superficiais.

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | | Ref. | |
|--|----|--------------|-----------------|-----------|-------------|--------------|--------------|-------------|-----------|-----------|-----------|--------|---------|-----------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | MCZ | | |
| <i>Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale</i> # | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A | 39 | Faixa de CIM | - | 0,25 - 8 | 0,031-0,25 | - | 0,031-0,5 | - | - | - | - | - | - | - | (238) |
| CLSI M38-A2 | 27 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,003-1 | - | - | 0,03-64 | - | - | - | - | (239) |
| CLSI M38-A2 | 61 | Faixa de CIM | - | 0,3-32 | 0,003->16 | 0,06-8 | 0,001-2 | - | 0,03-4 | 0,125->64 | 0,25-32 | - | - | - | (159) |
| CLSI M38-A2 | 20 | Faixa de CIM | - | 0,5-4 | 0,0313-1 | - | 0,0313-1 | - | - | - | - | - | - | - | (240) |
| CLSI M38-A2 | 73 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,008-4 | - | - | 0,0312-8 | - | - | - | - | (241) |
| CLSI M38-A2 | 5 | Faixa de CIM | - | 1->64 | <0,031-0,5 | - | <0,031 | - | - | 2->16 | - | - | - | - | (229) |
| CLSI M38-A2 | 21 | Faixa de CIM | 4-32 | 2-64 | <0,06-0,06 | <0,125-0,125 | <0,06-1 | - | - | 0,06-4 | - | - | - | - | (230) |
| CLSI M38-P | 7 | CIM média | - | 1,311 | 0,124 | - | 0,018 | - | - | - | - | - | - | - | (242) |
| CLSI M38-P | 4 | CIM média | - | 1,27±0,9 | 0,028±0,02 | - | 0,0078±0,005 | - | - | - | - | - | - | - | (243) |
| CLSI M38-A3 | 17 | Faixa de CIM | 0,06-0,5 | 0,06-32 | 0,06-2 | - | 0,004-2 | - | 0,06-2 | - | - | - | - | - | (244) |
| CLSI M38-A2 | 24 | Faixa de CIM | - | 2≥64 | ≤0,031-2 | ≤0,031-1 | ≤0,031 | - | ≤0,031≥16 | 0,125->64 | - | - | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 19 | Faixa de CIM | - | 0,125-64 | 0,015-0,25 | - | 0,003-0,25 | 0,007-0,125 | - | - | - | - | - | - | (246) |
| <i>T. rubrum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38 | 7 | Faixa de CIM | - | 2-8 | 0,031-0,125 | - | 0,031-0,25 | - | - | - | - | - | - | - | (238) |
| CLSI M38-A2 | 20 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,003-0,5 | - | - | 0,06-64 | - | - | - | - | (239) |
| CLSI M38-A2 | 13 | Faixa de CIM | - | 1-32 | 0,06->16 | 0,03-4 | 0,01-0,12 | - | 0,03-4 | 0,12-8 | 0,5-2 | - | - | - | (159) |
| CLSI M38-A2 | 10 | Faixa de CIM | - | 0,5-4 | 0,0313-1 | - | 0,0313-1 | - | - | - | - | - | - | - | (240) |
| CLSI M38-A2 | 45 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,0156-4 | - | - | 0,0625-4 | - | - | - | - | (241) |
| CLSI M38-A2 | 21 | Faixa de CIM | - | 2->64 | <0,031->16 | - | <0,031 | - | - | 2->16 | - | - | - | - | (229) |
| CLSI M38-A2 | 4 | Faixa de CIM | 4->64 | 1-64 | <0,06-16 | <0,125-4 | <0,06-0,5 | - | - | 0,25-16 | - | - | - | - | (230) |
| CLSI M38-P | 43 | CIM média | - | 0,585 | 0,035 | - | <0,008 | - | - | - | - | - | - | - | (242) |
| CLSI M38-P | 39 | Faixa de CIM | - | 0,03-2 | 0,008-0,12 | - | ≤0,008-0,015 | - | - | - | - | - | - | - | (243) |
| CLSI M38-A | 20 | Faixa de CIM | - | 4->64 | 0,0625-0,5 | - | - | - | 0,0625-1 | 0,125-2 | 0,0625-1 | - | - | 0,031-0,5 | (247) |
| CLSI M38-P | 1 | CIM | - | 1 | 0,0625 | - | - | - | - | 4 | - | - | - | - | (248) |
| CLSI M38-P | 30 | CIM média | 1,83±0,8 | - | - | - | - | - | 1,15±0,74 | 1±1,7 | 1,13±0,59 | - | - | 1,02±0,64 | (249) |
| CLSI M38-A2 | 37 | Faixa de CIM | - | 2≥64 | ≤0,031-1 | ≤0,031-4 | ≤0,031-0,062 | - | ≤0,031-4 | 0,25->64 | - | - | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 73 | Faixa de CIM | - | 0,125->64 | 0,015->8 | - | 0,003->2 | 0,007-0,5 | - | - | - | - | - | - | (246) |
| <i>T. schoenleinii</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.DEF.9.3 | 49 | Faixa de CIM | - | 0,5-32 | 0,0625-2 | - | 0,03 | - | 0,0625-1 | 0,25-8 | - | - | - | 0,0625-1 | (250) |
| CLSI M38-A2 | 55 | Faixa de CIM | 0,031-0,5 | 4-64 | 0,063-4 | 0,063-4 | 0,016-0,125 | 0,031-0,5 | 0,125-1 | 0,05-2 | - | 0,25-1 | 0,125-1 | - | (251) |

Continuação do quadro na próxima página

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | Ref. | |
|--|-----|--------------|-----------------|---------|--------------|-------------|--------------|-------------|----------|------------|----------|------------|------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | | MCZ |
| <i>Microsporium canis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 10 | Faixa de CIM | - | 4-64 | 0,25-4 | 0,008-0,06 | 0,008-0,25 | 0,008-0,125 | 0,06-2 | 0,125-0,5 | - | - | - | (252) |
| CLSI M38-A2 | 36 | Faixa de CIM | - | 4-128 | 0,25-8 | - | - | - | - | - | - | - | - | (253) |
| CLSI M38-A2 | 9 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,0625-1 | - | - | 0,125-1 | - | - | - | (241) |
| CLSI M38-P | 22 | Faixa de CIM | - | 1-16 | 0,25-1 | - | - | - | 0,125-1 | 0,25-1 | - | - | - | (254) |
| <i>T. tonsurans</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 29 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,003-1 | - | - | 0,03-64 | - | - | - | (239) |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | - | >64 | 0,5 | 0,25 | 0,0625 | - | 4 | 2 | 2 | - | - | (159) |
| CLSI M38-A2 | 4 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,0156-0,125 | - | - | 0,125-1 | - | - | - | (241) |
| CLSI M27-A | 17 | Faixa de CIM | - | 0,25-32 | 0,015-0,5 | - | 0,003-2 | 0,007-1 | - | - | - | - | - | (246) |
| <i>Epidermophyton floccosum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 23 | Faixa de CIM | - | - | - | - | - | - | - | 0,03-64 | - | - | - | (239) |
| CLSI M38-A2 | 40 | Faixa de CIM | - | - | 0,016-0,125 | 0,016-0,25 | 0,004-0,125 | 0,008-0,063 | 0,063-2 | 0,125-4 | - | 0,063-0,5 | - | (255) |
| CLSI M38-A2 | 23 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,0156-1 | - | - | 0,125-2 | - | - | - | (241) |
| CLSI M27-A | 5 | Faixa de CIM | - | 0,5-64 | 0,015-8 | - | 0,007->2 | 0,007-1 | - | - | - | - | - | (246) |
| <i>M. gypseum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A | 7 | Faixa de CIM | - | 0,25-4 | 0,0312-0,125 | - | 0,031-0,25 | - | - | - | - | - | - | (238) |
| CLSI M38-A2 | 4 | Faixa de CIM | - | - | - | - | 0,0625-0,25 | - | - | 0,125-0,25 | - | - | - | (241) |
| <i>T. benhamie</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 22 | Faixa de CIM | - | - | 0,016-0,125 | 0,016-0,25 | 0,008-0,125 | 0,008-0,125 | 0,063-4 | 0,125-4 | - | 0,125-0,5 | - | (256) |
| CLSI M38-A2 | 102 | Faixa de CIM | - | - | 0,06-2 | - | 0,008-0,125 | - | - | 0,25-4 | 0,03-0,5 | - | - | (257) |
| <i>T. eriotrephon</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | - | - | 0,032/0,063 | 0,125 | 0,063 | 0,063 | 0,25/0,5 | 0,5 | - | 0,125/0,25 | - | (256) |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | - | - | 0,25 | - | 0,008 | - | - | 1 | 0,5 | - | - | (257) |
| <i>T. violaceum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | - | - | - | - | 0,0156/0,125 | - | - | 0,125/0,25 | - | - | - | (241) |
| CLSI M38-A2 | 62 | Faixa de CIM | 0,064-0,25 | 0,5-16 | 0,016-1 | 0,016-0,125 | 0,016-0,125 | 0,016-0,064 | - | - | - | 0,125-1 | - | (258) |
| <i>Nannizia fulva</i> (anterior <i>M. fulvum</i>) | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 12 | Faixa de CIM | - | - | 0,0625-1 | - | <0,03125-0,5 | - | - | - | - | - | - | (259) |
| <i>T. europaeum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 29 | Faixa de CIM | - | - | 0,125-1 | - | 0,008-0,06 | - | - | 0,25-2 | 0,06-0,5 | - | - | (257) |
| <i>T. erinacei</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 23 | Faixa de CIM | - | - | 0,25-2 | - | 0,008-0,06 | - | - | 0,5-4 | 0,06-0,5 | - | - | (257) |

Continuação do quadro na próxima página

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | | Ref. | |
|-----------------------------|----|--------------|-----------------|-----|----------|-----|------------|-----|-----|-----|--------|----------|-----|------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | MCZ | | |
| <i>T. japonicum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 10 | Faixa de CIM | - | - | 0,25-0,5 | - | 0,008-0,06 | - | - | - | 0,25-2 | 0,06-0,5 | - | - | (257) |
| <i>M. ferruginum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | - | - | - | - | 0,0625 | - | - | - | 1 | - | - | - | (241) |

Fonte: elaborado pelo autor.

CIM: concentração inibitória mínima; CEM: concentração efetiva mínima; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; TRB: terbinafina; POS: posaconazol; KTC: cetoconazol; GSF: griseofulvina; CPX: ciclopirox olamine; CAS: caspofungina; MCZ: miconazol. *Concentração efetiva mínima (CEM) usada apenas para a caspofungina; #Espécies incluídas em conjunto pela complexidade de diferenciação, mesmo com técnicas de biologia molecular.

Quadro 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos de casos de micoses superficiais.

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | | Ref. |
|--------------------------------------|----|--------------|-----------------|------|------------|----------|------------|-------------|-----|-----|-----|-------------|-------------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | ANI* | |
| <i>Aspergillus sydowii</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 4 | Faixa de CIM | - | >16 | 0,5 | 1 | 2-4 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| <i>Aspergillus hongkongensis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | - | >16 | 0,25 | 0,5 | 4 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| <i>Aspergillus flavus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | - | >16 | 0,25 | 0,5 | 4 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| CLSI M38-A3 | 38 | Faixa de CIM | 1-4 | - | 0,25-1 | 0,25-0,5 | 0,03-0,063 | 0,03-0,5 | - | - | - | 0,063-0,25 | 0,008-0,015 | (153) |
| <i>Aspergillus terreus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 2 | CIM | - | >16 | 0,125/0,25 | 1 | 4/8 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| CLSI M38-A3 | 3 | Faixa de CIM | 0,5-1 | - | 0,25-0,5 | 0,25-0,5 | 0,25 | 0,063-0,125 | - | - | - | 0,25 | ≤0,008 | (153) |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | - | >64 | <0,031 | - | <0,031 | - | - | >16 | - | - | - | (229) |
| <i>Aspergillus tubigenis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | - | >16 | >16 | 2 | 8 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| CLSI M38-A3 | 2 | CIM | 0,25/1 | - | 1 | 0,25 | 0,03/0,5 | 0,25/1 | - | - | - | 0,063/0,125 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus unguis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | - | >16 | >16 | 1 | 0,5 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| <i>Aspergillus welwitschiae</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 3 | Faixa de CIM | - | >16 | 0,25-0,5 | 1 | 0,125-1 | - | - | - | - | - | - | (260) |
| CLSI M38-A3 | 1 | CIM | 0,5 | - | 0,5 | 0,25 | 0,03 | 0,5 | - | - | - | 0,125 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus minisclerotigenes</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A3 | 1 | CIM | 1 | - | 0,25 | 0,25 | 0,03 | 0,5 | - | - | - | 0,125 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus niger</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A3 | 1 | CIM | 1 | - | 0,5 | 0,25 | 0,03 | 0,5 | - | - | - | 0,125 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus citrinoterreus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A3 | 1 | CIM | 4 | - | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,03 | - | - | - | 0,25 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus ochraceus</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A3 | 1 | CIM | 2 | - | 0,25 | 0,5 | 0,03 | 0,03 | - | - | - | 0,25 | ≤0,008 | (153) |
| <i>Aspergillus keratitidis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 2 | >16 | 0,125 | 2 | 0,25 | 0,06 | - | - | - | 4 | 2 | (27) |
| <i>Fusarium petrophilum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | 1/8 | >128 | 1/>64 | 8/16 | >64 | - | - | - | - | - | - | (232) |

Continuação do quadro na próxima página

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | | Ref. |
|--|----|--------------|-----------------|---------|---------|----------|--------|------|------|-----|------|------|----------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | ANI* | |
| <i>Fusarium solani</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 3 | Faixa de CIM | 0,125-16 | 32->128 | 1->64 | 0,5->32 | >64 | - | - | - | - | - | - | (232) |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | - | >64 | >16 | - | >16 | - | - | >16 | - | - | - | (229) |
| <i>Fusarium keratoplasticum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 17 | Faixa de CIM | 1->16 | 32->128 | >64 | 0,5->32 | >64 | - | - | - | - | - | - | (232) |
| <i>Fusarium falciforme</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | 4/8 | >128 | >64 | 0,5/16 | >64 | - | - | - | - | - | - | (232) |
| <i>Fusarium oxysporum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 10 | Faixa de CIM | 0,5-16 | 64->128 | 0,5->64 | 0,125-32 | 16->64 | - | - | - | - | - | - | (232) |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | - | >64 | >16 | - | 4/16 | - | - | >16 | - | - | - | (229) |
| <i>Scopulariopsis sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A | 11 | Faixa de CIM | - | 128 | 16 | - | 1-64 | - | - | - | 2-12 | - | - | (261) |
| <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 3 | Faixa de CIM | - | >64 | >16 | - | 0,25-4 | - | - | >16 | - | - | - | (229) |
| CLSI M38-A2 | 26 | GM de CIM | - | 211,92 | 4,3 | - | 1 | - | 4,51 | - | - | - | - | (262) |
| <i>Arthrinium arundinis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | 0,5 | >64 | >16 | 16 | 0,0312 | 1 | 8 | >64 | 8 | >16 | - | (263) |
| <i>Arthrinium sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 0,25 | >16 | >8 | 16 | 0,5 | >8 | - | - | - | 0,5 | 0,03 | (27) |
| <i>Neocosmospora rubicola</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | 4 | >128 | >64 | 8 | >64 | - | - | - | - | - | - | (232) |
| <i>Chrysosporium keratinophilum</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 2 | CIM | - | 8/16 | <0,031 | - | <0,031 | - | - | 1-8 | - | - | - | (229) |
| <i>Neoscytalidium novaehollandiae</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M38-A2 | 1 | CIM | 0,5 | 32 | 4 | 0,125 | >0,5 | - | - | - | - | - | - | (155) |
| <i>Paracremonium sp.</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 2 | >16 | >8 | 4 | 16 | >8 | - | - | - | >16 | >16 | (27) |
| <i>Cephalotheca foveolata</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 2 | CIM | 4/>16 | >16 | >8 | 2/8 | 4->16 | 8/>8 | - | - | - | 0,03 | 0,25/0,5 | (27) |
| <i>Didymella gardeniae</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 2 | 16 | >8 | 4 | 4 | 0,5 | - | - | - | 16 | >16 | (27) |
| <i>Microascus gracilis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | >16 | >16 | >8 | >16 | 16 | >8 | - | - | - | >16 | >16 | (27) |

Continuação do quadro na próxima página

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | | Ref. | |
|---|---|--------------|-----------------|---------|---------|------|-------|----------|-----|-----|-----|---------|---------|------|--|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | GSF | CPX | CAS* | ANI* | | |
| <i>Pyrenochaetopsis</i> sp. | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 0,25 | >16 | 0,06 | 1 | 0,5 | 0,06 | - | - | - | 8 | 0,03 | (27) | |
| <i>Penicillium</i> sp. | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 1 | >16 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,06 | - | - | - | 0,125 | 0,06 | (27) | |
| <i>Acremonium egyptiacum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 16 | >16 | >8 | 4 | 0,5 | >8 | - | - | - | >16 | >16 | (27) | |
| <i>Rhinochadiella similis</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 2 | CIM | 4/4 | >16/>16 | 0,5/0,5 | 4/4 | 1/1 | >8/0,125 | - | - | - | >16/>16 | >16/>16 | (27) | |
| <i>Pseudophthomyces maydicus</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 1 | >16 | 0,125 | 0,5 | 0,5 | 0,125 | - | - | - | 4 | >16 | (27) | |
| <i>Cladosporium halotolerans</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 3 | Faixa de CIM | 2->16 | >16 | 0,25-2 | 2 | 1-2 | 0,125 | - | - | - | 4-8 | 0,25-8 | (27) | |
| <i>Cladosporium lebrasiae</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 0,5 | >16 | 0,06 | 1 | 1 | 0,015 | - | - | - | 4 | 0,25 | (27) | |
| <i>Chaetomium globosum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 1 | >16 | 0,5 | 1 | >16 | 0,25 | - | - | - | 16 | 0,25 | (27) | |
| <i>Exophiala oligosperma</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | 2 | >16 | 0,015 | 0,25 | 0,125 | 0,015 | - | - | - | >16 | >16 | (27) | |
| <i>Purpureocillium lilacinum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | >16 | >16 | >8 | 1 | 2 | 1 | - | - | - | >16 | >16 | (27) | |
| <i>Simplicillium obclavatum</i> | | | | | | | | | | | | | | | |
| EUCAST E.Def 9.3.1 | 1 | CIM | >16 | >16 | >8 | 0,25 | 0,125 | 0,5 | - | - | - | >16 | >16 | (27) | |

Fonte: elaborado pelo autor.

CIM: concentração inibitória mínima; CEM: concentração efetiva mínima; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; TRB: terbinafina; POS: posaconazol; KTC: cetoconazol; GSF: griseofulvina; CPX: ciclopirox olamine; CAS: caspofungina; ANI: anidulafungina; GM: média geométrica. *Concentração efetiva mínima (CEM) usada para caspofungina e anidulafungina.

Quadro 5. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs)/concentrações efetivas mínimas (CEMs) de 11 antifúngicos para diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida* de casos de micoses superficiais.

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | Ref. |
|-------------------------------|-----|------------------------|-----------------------|---|--|--|--------------------------|-------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | 5FC | CPX | CAS* | |
| <i>C. albicans</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 70 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,016-0,125 100% S | 0,125-64 61.4% S 27.1% SDD 11.4% R | 0,031-4 65.7% S 25.7% SDD 8.6% R | 0,016-0,125 100% S | - | - | - | - | - | - | (264) |
| CLSI M27-A3 | 23 | GM de CIM S/SDD/R | - | 0,9 96% S 4% R | - | 0,57 56% S 44% R | - | - | - | - | - | - | (151) |
| CLSI M27-A3 | 18 | Faixa de CIM S/I/R | 0,5-1 100% S | 0,12-8 94.44% S 5.55% R | 0,015-0,25 88.89% S 11.11% I | 0,015-0,5 100% S | 8 | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A4 | 35 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,031-2 | 0,012-2 100% S | 0,062-4 51.4% S 34.3% SDD 14.3% R | 0,062-8 71.4% S 20% SDD 8.6% R | - | 0,031-16 | 0,031-4 | - | - | 0,031-4 48.6% S 14.3% SDD 37.1% R | (265) |
| CLSI M27-A3 | 13 | Faixa de CIM | - | 0,5-0,06 | 0,06-1 | 0,06-0,125 | - | - | 0,06-0,25 | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A2 | 63 | Faixa de CIM S/SDD/R | - | 0,125-64 73% S 11.1% SDD 15.9% R | 0,015-2 81% S 6.3% SDD 12.7% R | - | 1-4 6.4% S 93.6% R | - | 0,015-4 98.4% S 1.6% R | - | 1-4 98.4% S 1.6% SDD 6.4% R | - | (266) |
| CLSI M27-A3 | 4 | Faixa de CIM | 0,25-0,5 | 0,12-2 | 0,015-0,06 | - | 0,25-0,5 | - | - | - | - | - | (267) |
| CLSI M27-A3 | 9 | Faixa de CIM | - | 0,125-4 | ≤0,031-0,5 | ≤0,031-0,25 | 2->16 | - | ≤0,031-0,25 | - | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 125 | Faixa de CIM S/SDD/I/R | 2-4 | 0,125-2 100% S | 0,031-4 48% S 48% SDD 4% R | 0,125-8 96% S 2.4% SDD 1.6% R | - | - | 0,031-8 40% S 28% SDD 33% R | 0,031-32 92% S 4% I 4% R | - | 0,062-1 | (152) |
| CLSI M27-A2 | 37 | S/SDD/R | - | 97,3% S 2,7% R | 91,9% S 8,1% R | - | - | - | 91,9% S 8,1% R | - | - | - | (268) |
| <i>C. parapsilosis</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 44 | GM de CIM S/SDD/R | - | 0,8 93% S 4% SDD 3% R | - | 0,07 95% S 5% R | - | - | - | - | - | - | (151) |
| CLSI M27-A3 | 10 | Faixa de CIM S/I/R | 0,5-1 100% S | 0,25-2 100% S | 0,03-0,12 100% S | 0,015-0,5 100% S | 1-8 | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A4 | 29 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,12-4 | 0,12-2 100% S | 0,062-2 | 0,062-2 24.1% S 62.1% SDD 13.8% R | - | 0,031-0,062 | 0,031-1 | - | - | 0,062-8 96.96% S 3.4% R | (265) |
| CLSI M27-A3 | 23 | Faixa de CIM | - | 0,06-16 | 0,06-4 | - | 0,06-0,6 | - | 0,06-0,6 | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A2 | 81 | Faixa de CIM S/SDD/R | - | 0,25-8 100% S | 0,015-0,5 96.3% S 3.7% SDD | - | 1-4 92.6% S 7.4% R | - | 0,03-1 100% S | - | 1-4 98.8% S 1.2% R | - | (266) |
| CLSI M27-A3 | 3 | Faixa de CIM | 0,5-1 | 0,5-2 | 0,06-0,12 | - | 0,06-0,12 | - | - | - | - | - | (267) |
| CLSI M27-A3 | 52 | Faixa de CIM | - | 0,25-16 | ≤0,031-0,5 | ≤0,031-0,125 | 0,125->16 | - | ≤0,031-0,25 | - | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 20 | Faixa de CIM S/SDD/R | 4-8 | 0,125-2 100% S | 0,031-0,5 65% S 35% SDD | 1-2 100% SDD | - | - | 0,031-0,062 55% S 45% SDD | 1-4 100% S | - | 0,25-4 | (152) |
| CLSI M27-A2 | 53 | S/SDD/R | - | 98,12% S 1,88% SDD | 96,23% S 3,77% R | - | - | - | 98,12% S 1,88% R | - | - | - | (268) |

Continuação do quadro na próxima página

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | Ref. |
|--------------------------------|----|------------------------|-----------------|---|---|--|--------------------------|------------|--|------------------------------|-----------------|---|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | 5FC | CPX | CAS* | |
| <i>C. tropicalis</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 13 | GM de CIM S/SDD/R | - | 8,9 61% S 7% SDD 32% R | - | 1,06 46% S 54% R | - | - | - | - | - | - | (151) |
| CLSI M27-A3 | 2 | Faixa de CIM S/I/R | 0,5-1 100% S | 1 100% S | 0,06 100% S | 0,015-0,03 100% S | 1 | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A4 | 7 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,062-4 | 0,25-16 85,7% S 14,3% R | 0,062-0,5 | 0,062-1 14,3% S 57,1% SDD 28,6% R | - | 0,031-0,25 | 0,062-0,25 | - | - | 0,12-4 57,1% S 14,3% SDD 28,6% R | (265) |
| CLSI M27-A3 | 4 | Faixa de CIM | - | 0,125-16 | 0,06-4 | 0,06-0,25 | - | - | 0,06-0,25 | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A2 | 52 | Faixa de CIM S/SDD/R | - | 0,5-64 53,8% S 15,4% SDD 30,8% R | 0,03-2 57,7% S 17,3% SDD 25% R | - | 2-4 3,8% S 96,2% R | - | 0,06-4 90,4% S 9,6% R | - | 0,5-2 100% S | - | (266) |
| CLSI M27-A3 | 17 | Faixa de CIM | - | 0,25-8 | ≤0,031-0,25 | ≤0,031-0,062 | 1->16 | - | - | ≤0,031 | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 5 | Faixa de CIM S/SDD/R | 4-8 | 0,125-1 100% S | 0,031-1 60% S 40% SDD | 0,5-2 80% S 20% SDD | - | - | 0,062-0,25 60% S 40% SDD | 0,031-16 80% S 20% SDD | - | 0,25-1 | (152) |
| CLSI M27-A2 | 7 | S/SDD/R | - | 85,8% S 14,2% R | 85,8% S 14,2% R | - | - | - | 85,8% S 14,2% R | - | - | - | (268) |
| <i>C. krusei</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 6 | GM de CIM S/SDD/R | - | 0,71 100% S | - | 0,06 100% S | - | - | - | - | - | - | (151) |
| CLSI M27-A3 | 10 | Faixa de CIM S/I/R | 0,5-1 100% S | 0,12-16 90% S 10% I | 0,015-0,12 100% S | 0,015-0,12 100% S | 1-8 | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A3 | 2 | Faixa de CIM | - | 2-16 | 0,25-4 | 0,125-0,25 | - | - | 0,125-0,25 | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | 1 | 64 | 0,12 | - | 4 | - | - | - | - | - | (267) |
| CLSI M27-A | 8 | Faixa de CIM S/SDD/I/R | 2-4 | 8-64 50% S 25% SDD 25% R | 0,031-1 50% S 25% SDD 25% R | 0,25-8 62,5% S 37,5% R | - | - | 0,062-1 25% S 25% SDD 50% R | 0,25-8 62,5% S 37,5% I | - | 0,062-8 | (152) |
| <i>C. glabrata</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 7 | GM de CIM S/SDD/R | - | 1,8 100% S | - | 0,14 100% S | - | - | - | - | - | - | (151) |
| CLSI M27-A4 | 4 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,031-2 | 0,25-64 75% SDD 25% R | 0,5-1 | 2-8 | - | 0,031-0,12 | 0,12-4 | - | - | 0,031-1 25% S 75% R | (265) |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | - | 2 | 4 | 0,06 | - | - | 0,125 | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A | 8 | Faixa de CIM S/SDD/R | 2-4 | 2-32 75% S 25% SDD | 0,25-1 37,5% SDD 62,5% R | 0,5-2 62,5% S 37,5% SDD | - | - | 0,031-4 37,5% S 12,5% SDD 50% R | 2-16 75% S 25% SDD | - | 1-16 | (152) |
| CLSI M27-A2 | 4 | S/SDD/R | - | 100% R | 100% R | - | - | - | 100% R | - | - | - | (268) |
| <i>C. dubiniensis</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM S/SDD/R | - | 16 100% R | - | 0,5 100% SDD | - | - | - | - | - | - | (151) |
| <i>C. orthopsilosis</i> | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A4 | 9 | Faixa de CIM | 0,12-2 | 0,25-4 | 0,12-2 | 0,25-2 | - | 0,031-0,12 | 0,062-0,5 | - | - | 0,031-2 | (265) |

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM/CEM (µg/mL) | | | | | | | | | | Ref. | |
|--------------------------------|----|----------------------|-----------------|--------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------|---------|--------------------------------------|-----------------------------|-----|------------------|-------|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | 5FC | CPX | CAS* | | MFG* |
| <i>C. guiliermondii</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 7 | GM de CIM S/SDD/R | - | 1,41 71% S 29% SDD | - | 0,5 100% S | - | - | - | - | - | - | (151) | |
| CLSI M27-A4 | 4 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,12-1 | 0,062-8 | 0,062-0,5 | 0,062-4 | - | 0,12-16 | 0,031-0,5 | - | - | 0,25-1 100% S | - | (265) |
| CLSI M27-A3 | 4 | Faixa de CIM | - | 0,06-2 | 0,06-2 | 0,06-0,25 | - | - | 0,06-0,25 | - | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A3 | 2 | CIM | 1 | 4/8 | 0,25-0,5 | - | 4 | - | - | - | - | - | - | (267) |
| CLSI M27-A3 | 24 | Faixa de CIM | - | 0,125-4 | ≤0,031-0,5 | ≤0,031-0,125 | 0,25->16 | - | ≤0,031-0,12 | - | - | - | - | (245) |
| CLSI M27-A | 5 | Faixa de CIM S/SDD/R | 0,25-4 | 2-16 60% S 40% SDD | 0,25-1 40% S 40% SDD 20% R | 0,062-2 40% S 60% SDD | - | - | 0,031-4 60% S 20% SDD 20% R | 0,062-8 60% S 40% SDD | - | 0,062-4 | - | (152) |
| CLSI M27-A2 | 21 | S/SDD/R | - | 90,5% S 9,5% SDD | 57,2% S 42,8% R | - | - | - | 100% S | - | - | - | - | (268) |
| <i>C. famata</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 3 | Faixa de CIM S/I/R | 0,5-1 100% S | 0,5-4 100% S | 0,3-0,6 100% S | 0,3-0,6 100% S | 0,5-1 | - | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A2 | 11 | S/SDD/R | - | 91% S 9% SDD | 45,5% S 54,5% R | - | - | - | 100% S | - | - | - | - | (268) |
| <i>C. lusitaniae</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM S/I/R | 0,5 100% S | 0,5 100% S | 0,06 100% S | 0,06 100% S | >8 | - | - | - | - | - | - | (233) |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | - | 0,25 | 0,25 | 0,06 | - | - | 0,06 | - | - | - | - | (150) |
| <i>C. zeylanoides</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM S/I/R | 0,5 100% S | 0,25 100% S | 0,015 100% S | 0,015 100% S | 2 | - | - | - | - | - | - | (233) |
| <i>C. sake</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | - | 0,25 | 0,25 | 0,06 | - | - | 0,06 | - | - | - | - | (150) |
| CLSI M27-A | 1 | CIM S/SDD/R | 4 | 0,5 100% S | 0,031 100% S | 1 100% SDD | - | - | 0,031 100% S | 1 100% S | - | 1 | - | (152) |
| <i>C. kefyr</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | - | 0,25 | 1 | 0,06 | - | - | 0,06 | - | - | - | - | (150) |
| <i>C. metapsilosis</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 2 | CIM | 0,5 | 2/4 | 0,06/0,12 | - | 0,12-0,25 | - | - | - | - | - | - | (267) |
| <i>C. africana</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | 0,25 | 0,12 | 0,03 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | (267) |
| <i>C. rugosa</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | 1 | 1 | 0,12 | - | 4 | - | - | - | - | - | - | (267) |
| <i>C. intermedia</i> | | | | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A | 1 | CIM S/SDD/R | 16 | 2 100% S | 8 100% R | 1 100% SDD | - | - | 0,031 100% S | 1 100% S | - | 1 | - | (152) |

Fonte: elaborado pelo autor.

CIM: concentração inibitória mínima; CEM: concentração efetiva mínima; S: sensível; SDD: sensível dose-dependente; I: intermediário; R: resistente; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; TRB: terbinafina; POS: posaconazol; KTC: cetoconazol; 5FC: 5-flucitosina; CPX: ciclopirox olamine; CAS: caspofungina; MFG: micafungina. *Concentração efetiva mínima (CEM) usada para caspofungina e micafungina.

Quadro 6. Concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de oito antifúngicos para diferentes espécies de leveduras não-*Candida* de casos de micoses superficiais.

| Espécie/Protocolo | n | Parâmetro | CIM (µg/mL) | | | | | | | | Ref. |
|--|-----|--------------|-------------|-----------|-----------|------------|-----|-----|------------|-----|-------|
| | | | AMB | FLC | ITC | VRC | TRB | POS | KTC | 5FC | |
| <i>Malassezia furfur</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 241 | Faixa de CIM | ≤0,03-16 | ≤0,12->64 | ≤0,03-16 | ≤0,03-16 | - | - | ≤0,03-8 | - | (236) |
| <i>Malassezia globosa</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 27 | Faixa de CIM | ≤0,03-0,5 | ≤0,12-8 | ≤0,03-8 | ≤0,03-8 | - | - | ≤0,03-1 | - | (236) |
| <i>Malassezia restricta</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 8 | Faixa de CIM | ≤0,03-4 | ≤0,12-2 | ≤0,03-1 | 0,06-8 | - | - | 0,06-0,25 | - | (236) |
| <i>Malassezia obtusa</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 7 | Faixa de CIM | ≤0,03-0,12 | ≤0,25-8 | ≤0,03-0,5 | 0,06-0,5 | - | - | ≤0,03-0,12 | - | (236) |
| <i>Malassezia sympodialis</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 5 | Faixa de CIM | ≤0,03-0,5 | ≤0,12-1 | ≤0,03-1 | ≤0,03-0,25 | - | - | ≤0,03-0,25 | - | (236) |
| <i>Malassezia slooffiae</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | 0,06 | 1 | 0,25 | 0,5 | - | - | 0,5 | - | (236) |
| <i>Malassezia japonica</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 1 | CIM | 0,5 | 1 | ≤0,03 | 0,06 | - | - | 0,5 | - | (236) |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | | | | | | | | | | | |
| ATB Fungus 3 System# | 1 | CIM | ≤0,5 | ≥128 | ≥4 | 4 | 16 | - | - | ≤4 | (225) |
| <i>Trichosporon spp.*</i> | | | | | | | | | | | |
| CLSI M27-A3 | 9 | Faixa de CIM | - | 0,06-256 | 0,125-32 | 0,25-4 | - | - | 0,125-0,5 | - | (237) |

Fonte: elaborado pelo autor.

CIM: concentração inibitória mínima; AMB: anfotericina B; FLC: fluconazol; ITC: itraconazol; VRC: voriconazol; TRB: terbinafina; POS: posaconazol; KTC: cetoconazol; 5FC: 5-fluocitosina. #Técnica com uso de tiras de antifúngicos;

*Espécies incluídas: *T. asahii*, *T. dermatis* e *T. ovoides*.

2.3.2 Resistência antifúngica de fungos causadores de micoses superficiais

Nenhuma classe nova de antifúngicos foi disponibilizada nos últimos 20 anos, enquanto espécies de fungos não usuais estão sendo frequentemente identificadas em casos de infecções fúngicas, as quais são usualmente resistentes aos tratamentos existentes (29,177,269). Além disso, o surgimento de resistência em isolados de *Candida* sp. (30) e *Aspergillus* sp. (31), e também a preocupante questão da levedura multirresistente *Candida auris* (270), tornam a questão da escassez de diferentes classes de antifúngicos preocupante. A resistência antifúngica pode ser microbiológica, clínica, ou um conjunto de ambas. A resistência microbiológica se refere a características estruturais ou funcionais inerentes ou adquiridas de uma determinada espécie fúngica, que lhe permitem resistir a um determinado antifúngico; enquanto a resistência clínica é a continuidade da infecção mesmo com o uso do tratamento correto (25). Há também o conceito de tolerância antifúngica, que ocorre quando subpopulações de células tolerantes de um isolado fúngico conseguem crescer mesmo na presença de uma dose adequada de antifúngico. A tolerância pode levar a falhas inesperadas no tratamento (271).

A resistência antifúngica e seus mecanismos são bem conhecidos e descritos para espécies do gênero *Candida* (272). Os mecanismos de resistência já foram explorados para *C. albicans* (30), *C. tropicalis* (273), *C. glabrata* (274), entre outras espécies, e incluem principalmente mutações que levam a uma menor afinidade do antifúngico com seu alvo, superexpressão de bombas de efluxo e mutações no gene FKS, que codifica a glucanossintetase (275). A exposição a diferentes antifúngicos durante o tratamento também pode levar à resistência, como já foi documentado para *C. lusitaniae* (276); assim como interações com outros medicamentos que o paciente utiliza, levando a falhas no tratamento que não seriam esperadas (277). No gênero *Candida*, estudos recentes têm focado principalmente na espécie *C. auris*, que é considerada resistente a todos os antifúngicos comumente usados em casos de infecções invasivas e representa um grande risco à saúde humana (278,279).

Historicamente, a questão da resistência antifúngica sempre teve foco em infecções invasivas causadas principalmente pelo gênero *Candida*. No entanto, recentemente, a resistência em casos de micoses superficiais começou a ser relatada e descrita de maneira crescente e preocupante (32). Essa questão começou a ganhar atenção devido à grande epidemia de dermatofitoses na Índia. No país, a espécie mais prevalente era *T. rubrum*, mas a presença de *T. mentagrophytes/interdigitale* aumentou nos últimos anos, se tornando a

espécie dominante e causando lesões mais inflamatórias. Além disso, a prescrição e uso incorreto de antifúngicos e a utilização indiscriminada de cremes de combinação esteroide-antifúngico-antibiótico são considerados os principais fatores que estão causando a epidemia indiana de dermatofitoses recalcitrantes, pois eles podem levar à resistência antifúngica (166).

Em relação à resistência antifúngica de dermatófitos, uma das maiores preocupações é a descrição de casos que não respondem ao tratamento com terbinafina, indicando resistência a esse antifúngico (280). A terbinafina inibe a enzima esqualeno epoxidase (SQLE), necessária na via de biossíntese do ergosterol. Mutações no gene dessa enzima, que levam a substituições de aminoácidos principalmente em quatro posições (Leu393, Phe397, Phe415 e His4440), acarretam resistência à terbinafina (281,282). Recentemente, dois isolados de *T. interdigitale/mentagrophytes* altamente resistentes à terbinafina (CIM > 32 µg/mL) foram isolados de um paciente na Índia, os quais apresentavam a mutação Phe397Leu na enzima esqualeno epoxidase. Nesse estudo, os autores sugeriram que esse isolado deveria ser considerado uma nova espécie, denominada *T. indotineae* (283).

É importante destacar que, devido à nova taxonomia de dermatófitos ainda não ser totalmente implementada (137), há algumas denominações equivocadas de espécies. Alguns dos isolados de *T. interdigitale* que são altamente resistentes à terbinafina são, na verdade, um genótipo específico de *T. mentagrophytes*, que é o *T. mentagrophytes* ITS genótipo VIII (284). A presença desse genótipo na Índia é um dos fatores responsáveis pela epidemia de dermatofitoses. No entanto, ele também já foi detectado de maneira crescente em outros países, causando casos com lesões extensas e recalcitrantes, como no Irã (285), na Grécia (286), e também na Alemanha e outros países europeus (287). A distribuição mundial do *T. mentagrophytes* ITS genótipo VIII é atribuída a viagens internacionais e migração (287), o que é preocupante pela alta resistência desse genótipo à terbinafina. Destaca-se também que as opções alternativas ao uso desse antifúngico são limitadas, pois muitos casos de dermatofitoses também são resistentes aos azólicos (32). Esses fatores ressaltam a importância da realização de testes de suscetibilidade antifúngica principalmente em casos de dermatofitoses recalcitrantes (284).

Além das mutações no gene da esqualeno epoxidase, que leva à alteração do alvo da terbinafina, existem outros mecanismos de resistência antifúngica adquirida em fungos dermatófitos, que estão demonstrados na Figura 13 (32). Esses mecanismos podem acarretar resistência contra outras classes de antifúngicos, limitando as opções de tratamento. Destaca-se também que os dermatófitos, assim como as leveduras do gênero *Candida*, são capazes de formar biofilmes, comunidades microbianas que se formam dentro de uma matriz de

substâncias poliméricas extracelulares (288,289). As células microbianas presentes em biofilmes podem se tornar de 10 a 1000 vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos (290), e esse fator apenas recentemente começou a ser explorado em relação à resistência antifúngica de dermatófitos (288).

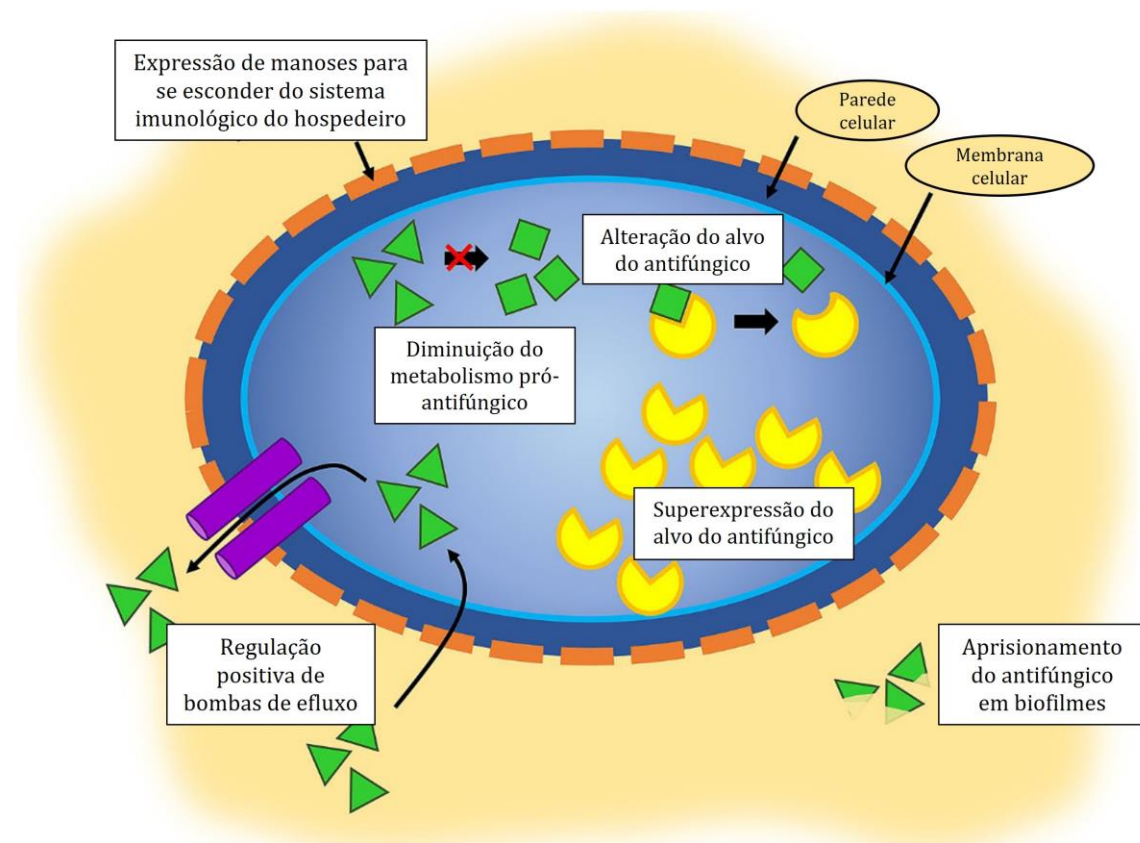


Figura 13. Mecanismos de resistência antifúngica adquirida em fungos dermatófitos.

Ref.: adaptado de Gupta et al. 2021 (32)

2.4 Relação da hanseníase com as micoses superficiais

Os pacientes com hanseníase apresentam diversas lesões na pele e danos em outros tecidos, o que causa predisposição para infecções secundárias oportunistas (19). Além disso, o uso sistêmico de corticosteroides, como a prednisona, aumenta o risco de desenvolvimento de micoses, através da alteração da composição lipídica da superfície cutânea ou pelo seu próprio caráter imunossupressor (20). Como já discutido, a prednisona é amplamente utilizada no tratamento da hanseníase e suas reações imunológicas, o que, juntamente com a presença de lesões na pele, coloca esses pacientes em risco para desenvolvimento de micoses. O uso de

antibióticos sistêmicos também é um fator que leva a um maior risco de desenvolvimento de micoses, principalmente causadas pelo gênero *Candida*, pois eles suprimem o crescimento da flora bacteriana normal (21).

Apesar disso, a relação entre a hanseníase e as micoses superficiais é pouco abordada na literatura. Um dos assuntos mais abordados são as onicomicoses, devido às alterações causadas pela hanseníase nas unhas. Além disso, a onicomicoses também pode ser fonte de infecção para o desenvolvimento de *tinea corporis* e/ou *tinea cruris* no mesmo paciente com hanseníase (291). As alterações nas unhas não são específicas, mas são altamente características, sendo causadas por vários fatores, principalmente pela neuropatia, além de traumas repetidos, comprometimento vascular, efeitos adversos de medicamentos e infecções (292). Estima-se que há envolvimento das unhas em até três de quatro pacientes com hanseníase (293).

Enquanto alguns autores relataram a presença de onicomicoses em 20 a 30% dos pacientes com hanseníase, outros encontraram percentuais consideravelmente menores, em torno de 5% ou menos (291,292), ou até mesmo não encontraram nenhum caso de onicomicoses (293,294). Alguns autores destacam também que, possivelmente, mais casos de onicomicoses seriam detectados com a realização de estudos prospectivos com um maior número de pacientes (295). Em pacientes com hanseníase, foram encontrados quatro relatos de caso de onicomicoses na literatura, um deles associado com *tinea corporis* (263,296–298). A identificação do agente etiológico foi feita em três desses casos, sendo *Arthrimum arundinis* (263), *Microsporum nanum* (297) e *Curvularia lunata* (298). Infelizmente, nas séries de casos citadas acima não foi feita a identificação dos agentes etiológicos.

Em relação a outros tipos de micoses superficiais, os relatos são escassos. A relação da pitiríase versicolor com a hanseníase é conhecida e, inclusive, a diferenciação entre as duas doenças muitas vezes não é clara, pois ambas podem ter manifestações semelhantes na pele (299–301). Foram encontrados três relatos de pitiríase versicolor associada à hanseníase, sendo que, em um deles, as lesões da pitiríase estavam localizadas junto com as da hanseníase (300,302,303). Além da pitiríase, também foi encontrado um caso de *tinea barbae* em um paciente já tratado para hanseníase e curado (304), e um caso de dermatofitose disseminada em paciente com reação hansênica tipo 2 (28). Esse último caso possivelmente é atribuído ao uso de corticosteroides, juntamente com a clofazimina, que possui como efeito adverso a ictiose, um fator que pode contribuir na disseminação e proliferação de fungos dermatófitos. Os autores ressaltam que, embora a associação entre hanseníase e dermatofitose disseminada seja rara na literatura, isso pode decorrer de diagnósticos incorretos, pois as dermatofitoses

podem ser confundidas com outras infecções e também com próprias reações imunológicas e recidivas da hanseníase (28). Esse pode ser um dos fatores responsáveis pela escassez de relatos de micoses superficiais em pacientes com hanseníase.

A maior parte dos relatos encontrados é em relação à presença de micoses subcutâneas em pacientes com hanseníase, as quais, além de afetar a pele, também afetam tecidos subcutâneos. Elas também são decorrentes principalmente da imunossupressão e apresentam em geral maior gravidade que as micoses superficiais, o que pode explicar o maior número de relatos (304). Foi encontrada associação com cromoblastomicose (305–308), mucormicose (306), esporotricose (309,310), criptococose cutânea (311) e feo-hifomicose (312). Cabe destacar também que, apesar de não ter sido encontrado nenhum relato com hanseníase, as próprias micoses superficiais podem invadir o tecido subcutâneo e se tornar invasivas, representando um grande risco para a saúde do paciente imunocomprometido (313).

Além da pele, também foram encontrados estudos que analisaram a presença oral de diferentes espécies de *Candida* em pacientes com hanseníase, em comparação com pacientes saudáveis. Em geral, o grupo com hanseníase apresentou uma prevalência maior de *Candida* oral, indicando uma predisposição para infecções oportunistas. *C. albicans* é a espécie mais predominante, seguida de *C. krusei* e *C. glabrata*. No entanto, a presença de outras espécies menos usuais, como *C. lusitaniae* e *C. nivariensis*, é preocupante pela menor suscetibilidade aos antifúngicos (314,315). Em um estudo, realizado no Brasil, não foi encontrada diferença entre a prevalência de *Candida* oral em pacientes com hanseníase e pacientes saudáveis (316). Outros autores também avaliaram a microbiota fúngica da conjuntiva ocular em pacientes de hanseníase, tendo encontrado prevalência do gênero *Candida*, fato que foi atribuído à imunossupressão, presença de olho seco e uso de antibióticos sistêmicos (21).

3 MARCO CONCEITUAL

O marco conceitual está esquematizado e ilustrado pela Figura 14, que elenca os conceitos-chave da pesquisa realizada.

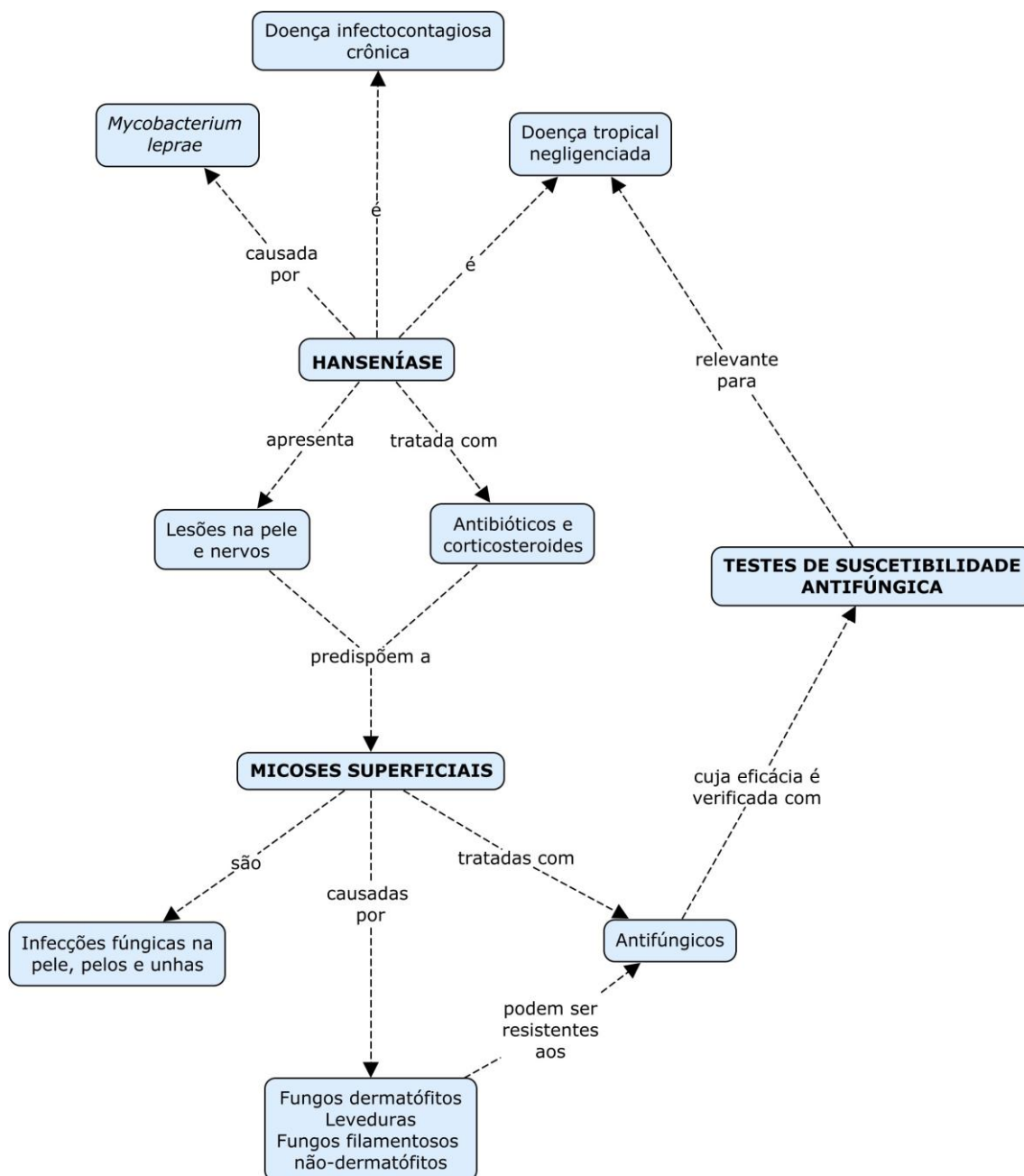


Figura 14. Marco conceitual da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em pacientes com hanseníase em um ambulatório de referência de Porto Alegre”, Porto Alegre, 2021.

4 JUSTIFICATIVA

Mesmo sendo uma doença milenar, ainda existem muitas lacunas de pesquisas relacionadas à hanseníase e muitos pontos que precisam ser mais bem compreendidos, como as rotas de transmissão, a patogênese e a relação com o sistema imune do hospedeiro. Além disso, estudos envolvendo micoses superficiais associados à hanseníase são raros na literatura, apesar de reconhecido que essas micoses são doenças comuns na população hígida, e que os pacientes hansênicos apresentam uma maior predisposição ao seu desenvolvimento. Assim, este estudo é pioneiro em relação à análise da prevalência de micoses superficiais em pacientes com hanseníase e à avaliação da sensibilidade dos isolados destes pacientes aos antifúngicos utilizados rotineiramente. Deste modo, este estudo deverá contribuir com um aumento do conhecimento da relação entre estas doenças, além de criar novas hipóteses e provocar o estímulo ao desenvolvimento de novas pesquisas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo primário

Avaliar as micoses superficiais em pacientes com Hanseníase atendidos no Serviço de Hanseníase do Ambulatório de Dermatologia Sanitária de Porto Alegre.

5.2 Objetivos secundários

- Identificar, molecularmente, as espécies de fungos causadores de micoses superficiais em pacientes com hanseníase;
- Comparar prevalências de micoses superficiais entre pacientes com hanseníase e pacientes não expostos à hanseníase;
- Estudar a relação entre determinado gênero ou espécie de fungo com hanseníase;
- Avaliar a susceptibilidade dos fungos isolados dos pacientes aos antifúngicos utilizados na clínica.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 2004; 363(9416):1209–19.
2. Foss NT, Motta ACF. Leprosy, a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(suppl 1):28–33.
3. Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2017; 15(8):801–27.
4. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. 2014; 89(2):205–18.
5. Niitsuma ENA, Bueno I de C, Arantes EO, Carvalho APM, Xavier Junior GF, Fernandes G da R, et al. Fatores associados ao adoecimento por hanseníase em contatos: revisão sistemática e metanálise. *Rev Bras Epidemiol*. 2021; 24:e210039.
6. Cambri G, Mira MT. Genetic Susceptibility to Leprosy—From Classic Immune-Related Candidate Genes to Hypothesis-Free, Whole Genome Approaches. *Front Immunol*. 2018; 20(9):1674.
7. Van Hoang M, Van Bui D, Phung TL. Clinical Characteristics and Treatment of Leprosy. *Curr Trop Med Reports*. 2016; 3(4):138–43.
8. Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - Searching for the perfect solution? *Lepr Rev*. 2007; 78(4):317–20.
9. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical report series 675. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 1982. 36 p. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/38984/WHO_TRS_675.pdf?sequence=1&isAllowed=y
10. Gaschignard J, Grant AV, Thuc N Van, Orlova M, Cobat A, Huong NT, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(5):e0004345.
11. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol*. 2015; 33(1):26–37.
12. Maymone MBC, Venkatesh S, Laughter M, Abdat R, Hugh J, Dacso MM, et al. Leprosy: Treatment and management of complications. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 83(1):17–30.

13. Alemu Belachew W, Naafs B. Position statement: Leprosy: Diagnosis, treatment and follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019; 33(7):1205–13.
14. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, Dacso MM, Rao PN, Stryjewska BM, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 83(1):1–14.
15. Virmond M, Grzybowski A, Virmond L. Leprosy: A glossary. *Clin Dermatol*. 2015; 33(1):8–18.
16. Maciel LR, Oliveira MLW-R de, Gallo MEN, Damasco MS. Memories and history of Hansen's disease in Brazil told by witnesses (1960-2000). *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*. 2003; 10(suppl 1):308–36.
17. Smith CS, Aerts A, Saunderson P, Kawuma J, Kita E, Virmond M. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(9):e293–7.
18. Lockwood DN, Saunderson PR. Nerve damage in leprosy: A continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. *Int Health*. 2012; 4(2):77–85.
19. Scollard DM, Stryjewska BM, Prestigiaco JF, Gillis TP, Waguespack-Labiche J. Hansen's disease (leprosy) complicated by secondary mycobacterial infection. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 64(3):593–6.
20. Da Fraga CMM, de Cássia Birschiner R, Naseri AP, Diniz LM. Influence of systemic corticotherapy on the triggering of pityriasis versicolor. *Mycoses*. 2014; 57(9):565–71.
21. dos Santos PM, de Melo CM, Rebouças Martins SA, de Almeida Chaves A, de Sá DSP, dos Santos RCR. Study of ocular fungal microbiota in patients with Hansen's disease and in individuals who deal with them. *Arq Bras Oftalmol*. 2006; 69(6):915–8.
22. Kaushik N, Pujalte GGA, Reese ST. Superficial Fungal Infections. *Prim Care - Clin Off Pract*. 2015; 42(4):501–16.
23. Tchernev G, Penev PK, Nenoff P, Zisova LG, Cardoso JC, Taneva T, et al. Onychomycosis: modern diagnostic and treatment approaches. *Wien Med Wochenschr*. 2013; 163(1–2):1–12.
24. Degreef H. Clinical Forms of Dermatophytosis (Ringworm Infection). *Mycopathologia*. 2008; 166(5–6):257–65.
25. Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, Shear NH, Piguet V, Tosti A, et al. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2020; 34(9):1972–90.
26. Jayatilake JAMS, Tilakaratne WM, Panagoda GJ. Candidal onychomycosis: A Mini-Review. *Mycopathologia*. 2009; 168(4):165–73.

27. Tsang C-C, Tang JYM, Chan K-F, Lee C-Y, Chan JFW, Ngan AHY, et al. Diversity of phenotypically non-dermatophyte, non-*Aspergillus* filamentous fungi causing nail infections: importance of accurate identification and antifungal susceptibility testing. *Emerg Microbes Infect.* 2019; 8(1):531–41.
28. Rodrigues FT, Cardozo MRP, Da Costa Nery JA. Images in clinical tropical medicine: Widespread dermatophytosis in a patient treated for leprosy type II reactional state after MDT/WHO-MB release. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99(4):813–4.
29. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, Arastehfar A, Cornely OA, Krause R, et al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs.* 2021; 81(15):1703-29.
30. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, Nishimoto AT, Barker KS, Rogers PD. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans* *Candida* Species. *Front Microbiol.* 2017; 7:2173.
31. Schauwvlieghe AFAD, de Jonge N, van Dijk K, Verweij PE, Brüggemann RJ, Biemond BJ, et al. The diagnosis and treatment of invasive aspergillosis in Dutch haematology units facing a rapidly increasing prevalence of azole-resistance. A nationwide survey and rationale for the DB-MSG 002 study protocol. *Mycoses.* 2018; 61(9):656–64.
32. Gupta AK, Renaud HJ, Quinlan EM, Shear NH, Piguet V. The Growing Problem of Antifungal Resistance in Onychomycosis and Other Superficial Mycoses. *Am J Clin Dermatol.* 2021; 22(2):149–57.
33. Berkow EL, Lockhart SR, Ostrosky-Zeichner L. Antifungal Susceptibility Testing: Current Approaches. *Clin Microbiol Rev.* 2020; 33(3):e00069-19.
34. Eidt LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Soc.* 2004; 13(2):76–88.
35. Eidt LM. Hanseniasis. In: Bonamigo RR, Dornelles SIT, editors. *Dermatology in Public Health Environments*. Switzerland: Springer, Cham; 2018. p. 61–85.
36. Brasil. LEI Nº 9.010, DE 29 DE MARÇO DE 1995 [Internet]. 1995. Disponível em: <https://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1995/lei-9010-29-marco-1995-348623-publicacaooriginal-1-pl.html>
37. Deps P, Cruz A. Why we should stop using the word leprosy. *Lancet Infect Dis.* 2020; 20(4):e75–8.

38. Terencio De Las Aguas J. History and epidemiology of leprosy in America. *Med Cutan Ibero Lat Am.* 2006; 34(4):179–94.
39. Couto Dal Secco RG, França K, Castillo D, AlHarbi M, Lotti T, Fioranelli M, et al. A synopsis of the history of Hansen’s disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2017; 167(S1):27–30.
40. Kar HK, Gupta R. Treatment of leprosy. *Clin Dermatol.* 2015; 33(1):55–65.
41. Arba IF, Hidayati AN, Soetjipto, Damayanti. Stigma towards leprosy: A systematic review. *J Pakistan Assoc Dermatologists.* 2021; 31(2):250–61.
42. Oliveira IVP de M, Dets PD, Antunes JMA de P. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2019; 61:e44.
43. Cole ST, Eiglmeier K, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001; 409:1007–11.
44. Han XY, Aung FM, Choon SE, Werner B. Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. *Am J Clin Pathol.* 2014; 142(4):524–32.
45. Donoghue HD. Tuberculosis and leprosy associated with historical human population movements in Europe and beyond – an overview based on mycobacterial ancient DNA. *Ann Hum Biol.* 2019; 46(2):120–8.
46. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nat Genet.* 2009; 41(12):1282–9.
47. Franco-Paredes C, Rodriguez-Morales AJ. Unsolved matters in leprosy: a descriptive review and call for further research. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016; 15(1):33.
48. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol.* 2008; 130(6):856–64.
49. Sotiriou MC, Stryjewska BM, Hill C. Two Cases of Leprosy in Siblings Caused by *Mycobacterium lepromatosis* and Review of the Literature. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 95(3):522–7.
50. Mazini PS, Alves H V, Reis PG, Lopes AP, Sell AM, Santos-Rosa M, et al. Gene association with leprosy: A review of published data. *Front Immunol.* 2016; 6:658.
51. Smith WCS, Aerts A. Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of

leprosy transmission. *Leprosy Review*. 2014; 85:2-17

52. Pierneef L, van Hooij A, Taal A, Rumbaut R, Nobre ML, van Brakel W, et al. Detection of anti-*M. leprae* antibodies in children in leprosy-endemic areas: A systematic review. Converse PJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis* . 2021; 15(8):e0009667.
53. Ogunsumi DO, Lal V, Puchner KP, van Brakel W, Schwienhorst-Stich E-M, Kasang C, et al. Measuring endemicity and burden of leprosy across countries and regions: A systematic review and Delphi survey. Nery JS, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15(9):e0009769.
54. Cruz RC da S, Bühner-Sékula S, Penna MLF, Penna GO, Talhari S. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *An Bras Dermatol*. 2017; 92(6):761–73.
55. World Health Organization. World Health Assembly, Elimination of leprosy: resolution of the 44th World Health Assembly. Geneva: World Health Organization; 1991.
56. Nsagha D, Bamgboye E, Assob J, Njunda A, Kanga H, Zoung-Kanyi Bissek A, et al. Elimination of Leprosy as a public health problem by 2000 AD: an epidemiological perspective. *Pan Afr Med J*. 2011; 9(1):4.
57. World Health Organization. Weekly epidemiological record. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. *Wkly Epidemiol Rec*. 2019; 94:389–412. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf>
58. Organização Mundial da Saúde. Rumo à zero hanseníase - Estratégia Global de Hanseníase 2021-2030. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático; 2021. 1–30 p. Disponível em: <http://apps.who.int/bookorders>.
59. Reveiz L, Buendía JA, Téllez D. Chemoprophylaxis in contacts of patients with leprosy: systematic review and meta-analysis. *Rev Panam Salud Publica*. 2009; 26(4):341–9.
60. Richardus JH, Tiwari A, Barth-Jaeggi T, Arif MA, Banstola NL, Baskota R, et al. Leprosy post-exposure prophylaxis with single-dose rifampicin (LPEP): an international feasibility programme. *Lancet Glob Heal*. 2021; 9(1):e81–90.
61. Richardus JH, Oskam L. Protecting people against leprosy: Chemoprophylaxis and immunoprophylaxis. *Clin Dermatol*. 2015; 33(1):19–25.
62. Richardus J. Towards zero leprosy: Dream or vision? *Indian J Med Res*. 2021; 153(4):401–3.
63. Williams DL, Gillis TP. Drug-resistant leprosy: monitoring and current status. *Lepr Rev*. 2012; 83(3):269–81.

64. Naaz F, Mohanty P, Bansal A, Kumar D, Gupta U. Challenges beyond elimination in leprosy. *Int J Mycobacteriology*. 2017; 6(3):222.
65. Sermrittirong S, Van Brakel WH. Stigma in leprosy: concepts, causes and determinants. *Lepr Rev*. 2014; 85(1):36–47.
66. Smith WC, van Brakel W, Gillis T, Saunderson P, Richardus JH. The Missing Millions: A Threat to the Elimination of Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(4):2–5.
67. Krishnan SP, Kamalanathan A, John J, Gopalakrishnan S. A reminiscent review on leprosy. *Rev Med Microbiol*. 2015; 26(1):8–13.
68. Deps P, Antunes JMA de P, Collin SM. Zoonotic risk of Hansen’s disease from community contact with wild armadillos: A systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health*. 2021; 68(2):153–64.
69. Ploemacher T, Faber WR, Menke H, Rutten V, Pieters T. Reservoirs and transmission routes of leprosy; A systematic review. Franco-Paredes C, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(4):e0008276.
70. Pescarini JM, Strina A, Nery JS, Skalinski LM, Andrade KVF de, Penna MLF, et al. Socioeconomic risk markers of leprosy in high-burden countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(7):e0006622.
71. Leano HA de M, Araújo KM da FA, Bueno I de C, Niitsuma ENA, Lana FCF. Socioeconomic factors related to leprosy: an integrative literature review. *Rev Bras Enferm*. 2019; 72(5):1405–15.
72. Dwivedi VP, Banerjee A, Das I, Saha A, Dutta M, Bhardwaj B, et al. Diet and nutrition: An important risk factor in leprosy. *Microb Pathog*. 2019; 137:103714.
73. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico da Hanseníase - 2021. Brasília: Ministério da Saúde; 2021. 64 p. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2021/boletim-epidemiologico-hansenia-se-2021>
74. Pescarini JM, Teixeira CSS, da Silva NB, Sanchez MN, da Natividade MS, Rodrigues LC, et al. Epidemiological characteristics and temporal trends of new leprosy cases in Brazil: 2006 to 2017. *Cad Saude Publica*. 2021; 37(7):e00130020.
75. Ministério da Saúde. Estratégia Nacional para Enfrentamento da Hanseníase 2019-2022. Brasília: Ministério da Saúde; 2019. 116 p. Disponível em: <http://www.aids.gov.br/pt-br/pub/2020/estrategia-nacional-para-enfrentamento-da-hansenia-se-2019-2022>
76. Vieira MCA, Nery JS, Paixão ES, Freitas de Andrade KV, Oliveira Penna G, Teixeira MG.

Leprosy in children under 15 years of age in Brazil: A systematic review of the literature. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018; 12(10):e0006788.

77. Silva CLM, Fonseca SC, Kawa H, Palmer D de OQ. Spatial distribution of leprosy in Brazil: a literature review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(4):439–49.
78. Nazario AP, Ferreira J, Schuler-Faccini L, Fiegenbaum M, Artigalás O, Vianna FSL. Leprosy in Southern Brazil: A twenty-year epidemiological profile. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017; 50(2):251–5.
79. Moraes PC de, Eidt LM, Koehler A, Pagani DM, Scroferneker ML. Epidemiological characteristics and trends of leprosy in children and adolescents under 15 years old in a low-endemic State in Southern Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021; 63:e80.
80. Ministério da Saúde. Guia prático sobre a hanseníase. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância e Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. 70 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_pratico_hanseníase.%0Apdf
81. de Macedo CS, de Carvalho FM, Amaral JJ, de Mendonça Ochs S, Assis EF, Sarno EN, et al. Leprosy and its reactional episodes: Serum levels and possible roles of omega-3 and omega-6-derived lipid mediators. *Cytokine*. 2018; 112:87–94.
82. Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 2014; 71(4):795–803.
83. Nery JA da C, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Machado AM. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: Uma abordagem prática. *An Bras Dermatol*. 2006; 81(4):367–75.
84. Geluk A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. *Semin Immunol*. 2018; 39:111–8.
85. Nery JA da C, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira S de SC, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013; 88(5):787–92.
86. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol*. 2008; 83(1):75–82.
87. Lockwood DNJ. Chronic aspects of leprosy—neglected but important. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2019; 113(12):813–7.
88. Voorend CGN, Post EB. A Systematic Review on the Epidemiological Data of Erythema Nodosum Leprosum, a Type 2 Leprosy Reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2440.

89. Ministério da Saúde. Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como problema de saúde pública: manual técnico-operacional. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2016. 58 p. Disponível em: http://lproweb.procempa.com.br/pmpa/prefpoa/cgvs/usu_doc/diretrizes_hanseniaese.pdf
90. Kundakci N, Erdem C. Leprosy: A great imitator. *Clin Dermatol*. 2019; 37(3):200–12.
91. Torres RT, Fachi MM, Böger B, Marson BM, Ferreira VL, Pontarolo R, et al. Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021; 100(2):115337.
92. Hooij A, Geluk A. In search of biomarkers for leprosy by unraveling the host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev*. 2021; 301(1):175–92.
93. Chan MMF, Smoller BR. Overview of the Histopathology and Other Laboratory Investigations in Leprosy. *Curr Trop Med Reports*. 2016; 3(4):131–7.
94. Joshi R. Limitations of histopathology in diagnosis and management of patients with leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2014; 80(5):389–91.
95. Gama RS, Leite LA, Colombo LT, Fraga LA de O. Prospects for new leprosy diagnostic tools, a narrative review considering ELISA and PCR assays. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020; 53:e20200197.
96. de Oliveira ALG, Fraga VG, Sernizon-Guimarães N, Cardoso MS, Viana AG, Bueno LL, et al. Diagnostic accuracy of tests using recombinant protein antigens of *Mycobacterium leprae* for leprosy: A systematic review. *J Infect Public Health*. 2020; 13(8):1078–88.
97. Sengupta U. Recent Laboratory Advances in Diagnostics and Monitoring Response to Treatment in Leprosy. *Indian Dermatol Online J*. 2019; 10(2):106–14.
98. Da Silva Souza C, Bacha JT. Delayed diagnosis of leprosy and the potential role of educational activities in Brazil. *Lepr Rev*. 2003; 74(3):249–58.
99. Somar P, Waltz M, van Brakel W. The impact of leprosy on the mental wellbeing of leprosy-affected persons and their family members – a systematic review. *Glob Ment Heal*. 2020; 7:e15.
100. Organização Mundial da Saúde. Diretrizes para o diagnóstico, tratamento e prevenção da hanseníase [Internet]. Nova Delhi: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático; 2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274127>
101. Cambau E, Saunderson P, Matsuoka M, Cole ST, Kai M, Suffys P, et al. Antimicrobial

resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009–15. *Clin Microbiol Infect.* 2018; 24(12):1305–10.

102. Singh H, Nel B, Dey V, Tiwari P, Dulhani N. Adverse effects of multi-drug therapy in leprosy, a two years' experience (2006-2008) in tertiary health care centre in the tribal region of Chhattisgarh state (Bastar, Jagdalpur). *Lepr Rev.* 2011; 82(1):17–24.
103. Goulart IMB, Arbex GL, Carneiro MH, Rodrigues MS, Gadia R. Efeitos adversos da poliquimioterapia em pacientes com hanseníase: um levantamento de cinco anos em um Centro de Saúde da Universidade Federal de Uberlândia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35(5):453–60.
104. Habiballa Ahmed MM, Anuradha, Wadhwa P. A review on agents for the treatment of Leprosy infection. *Asian J Pharm Clin Res.* 2021; 14(3):25-29.
105. Lemes RMR, Pessolani MC V, De MacEdo CS. High-density lipoprotein as a new target for leprosy therapy. *Future Microbiol.* 2020; 15(13):1197–9.
106. Chaves LL, Patriota Y, Soares-Sobrinho JL, Vieira ACC, Lima SAC, Reis S. Drug Delivery Systems on Leprosy Therapy: Moving Towards Eradication? *Pharmaceutics.* 2020; 12(12):1202.
107. Lazo-Porras M, Prutsky GJ, Barrionuevo P, Tapia JC, Ugarte-Gil C, Ponce OJ, et al. World Health Organization (WHO) antibiotic regimen against other regimens for the treatment of leprosy: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2020; 20(1):62.
108. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide *Mycoses.* 2009; 52(1):95.
109. Sahoo AK, Mahajan R. Management of *tinea corporis*, *tinea cruris*, and *tinea pedis*: A comprehensive review. *Indian Dermatol Online J.* 2016; 7(2):77–86.
110. Arce M, Gutiérrez-Mendoza D. Pityriasis Versicolor: Treatment Update. *Curr Fungal Infect Rep.* 2018; 12(4):195–200.
111. Robles-Tenorio A, Lepe-Moreno KY, Mayorga-Rodríguez J. White Piedra, a Rare Superficial Mycosis: an Update. *Curr Fungal Infect Rep.* 2020; 14(3):197–202.
112. Zhou J, Chen M, Chen H, Pan W, Liao W. *Rhodotorula minuta* as onychomycosis agent in a Chinese patient: first report and literature review. *Mycoses.* 2014; 57(3):191–5.
113. Gupta AK, Ryder JE, Baran R, Summerbell RC. Non-dermatophyte onychomycosis. *Dermatol Clin.* 2003; 21(2):257–68.

114. Del Rosso JQ, Kircik LH. Optimizing topical antifungal therapy for superficial cutaneous fungal infections: focus on topical naftifine for cutaneous dermatophytosis. *J Drugs Dermatol.* 2013; 12(11 Suppl):165–71.
115. Taudorf EH, Jemec GBE, Hay RJ, Saunte DML. Cutaneous candidiasis - an evidence-based review of topical and systemic treatments to inform clinical practice. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019; 33(10):1863–73.
116. Barbedo LS, Sgarbi DB. Candidíase. DST - J Bras Doenças Sex Transm. 2010; 22(1):22–38.
117. Veasey JV, Arruda B, Miguel F, Muramatu LH. White piedra, black piedra, *tinea versicolor*, and *tinea nigra*: contribution to the Diagnosis of Superficial Mycosis. 2017; 92(3):413–6.
118. Bonifaz A, Gómez-Daza F, Paredes V, Ponce RM. *Tinea versicolor*, *tinea nigra*, white piedra, and black piedra. *Clin Dermatol.* 2010; 28(2):140–5.
119. Ramírez-Soto MC, Andagua-Castro J, Quispe MA, Aguilar-Ancori EG. Cases of white piedra of the hair on the American continent: a case report and a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2019; 33(1):e14–6.
120. Rios-Yuil JM. Pityriasis Versicolor: Clinical Spectrum and Diagnosis. *Curr Fungal Infect Rep.* 2016; 10(3):121–5.
121. Chin LD, Parvinnejad N, Haber RM. Pityriasis in dermatology: an updated review. *Int J Dermatol.* 2021; 60(2):141–58.
122. Furlan KC, Chartuni JCN, Kakizaki P, Valente NYS. Sycosiform *tinea barbae* caused by *Trichophyton rubrum* and its association with autoinoculation. *An Bras Dermatol.* 2017; 92(1):160–1.
123. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. *Tinea Capitis*: Current Review of the Literature. *Curr Fungal Infect Rep.* 2018; 12(3):120–6.
124. Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Szepietowski JC, Pinto-Almazán R, Frías-De-León MG, Espinosa-Hernández VM, et al. A systematic review of worldwide data on *tinea capitis*: analysis of the last 20 years. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021; 35(4):844–83.
125. Leung AK, Lam JM, Leong KF, Hon KL. *Tinea corporis*: an updated review. *Drugs Context.* 2020; 9:2020-5-6.
126. Leung AKC, Leong KF, Lam JM. *Tinea Imbricata*: An Overview. *Curr Pediatr Rev.* 2019; 15(3):170–4.
127. Lin RL, Szepietowski JC, Schwartz RA. *Tinea faciei*, an often deceptive facial eruption. *Int J*

Dermatol. 2004; 43(6):437–40.

128. Pippin MM, Madden ML. *Tinea Cruris*. [Updated 2021 Jul 1]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554602/>
129. El-Gohary M, van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Burgess H, Doney L, Stuart B, et al. Topical antifungal treatments for *tinea cruris* and *tinea corporis*. Cochrane database Syst Rev. 2014; (8):CD009992.
130. Luchsinger I, Bosshard PP, Kasper RS, Reinhardt D, Lautenschlager S. *Tinea genitalis*: a new entity of sexually transmitted infection? Case series and review of the literature. Sex Transm Infect. 2015; 91(7):493–6.
131. Thakur R, Kalsi AS. Updates on Genital Dermatophytosis. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2020; 13:743–50.
132. Veraldi S, Schianchi R, Benzecry V, Gorani A. *Tinea manuum*: A report of 18 cases observed in the metropolitan area of Milan and review of the literature. Mycoses. 2019; 62(7):604–8.
133. Ilkit M, Durdu M. *Tinea pedis*: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. Crit Rev Microbiol. 2015; 41(3):374–88.
134. Nowicka D, Nawrot U. *Tinea pedis*-An embarrassing problem for health and beauty-A narrative review. Mycoses. 2021; 64(10):1140–50.
135. Lipner SR, Scher RK. Onychomycosis. J Am Acad Dermatol. 2019; 80(4):853–67.
136. Leung AKC, Lam JM, Leong KF, Hon KL, Barankin B, Leung AAM, et al. Onychomycosis: An Updated Review. Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov. 2020; 14(1):32–45.
137. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. Mycopathologia. 2017; 182(1–2):5–31.
138. Hayette M-P, Sacheli R. Dermatophytosis, Trends in Epidemiology and Diagnostic Approach. Curr Fungal Infect Rep. 2015; 9(3):164–79.
139. Thakur R, Kalsi AS. Outbreaks And Epidemics Of Superficial Dermatophytosis Due To *Trichophyton mentagrophytes* Complex And *Microsporum canis*: Global And Indian Scenario. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2019; 12:887–93.
140. Saxena V, Shenoy MM, Devrari JC, Pai V, Agrawal V. A mycological study of *tinea corporis*: A changing epidemiological trend from *Trichophyton rubrum* to *Trichophyton*

- mentagrophytes* in India. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2020; 86(5):607.
141. Saito R, Mizuki S, Ishizaki S, Harada T. A Case of Inflammatory *Tinea* Corporis by *Epidermophyton floccosum*. Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2008; 46(3):211–5.
 142. Nenoff P, Herrmann J, Gräser Y. *Trichophyton mentagrophytes* sive *interdigitale*? A dermatophyte in the course of time. JDDG. 2007; 5(3):198–202.
 143. Chowdhary A, Singh A, Singh PK, Khurana A, Meis JF. Perspectives on misidentification of *Trichophyton interdigitale* / *Trichophyton mentagrophytes* using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database. Mycoses. 2019; 62(1):11–5.
 144. Nenoff P, Verma SB, Uhrlaß S, Burmester A, Gräser Y. A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. Mycoses. 2019; 62(1):6–10.
 145. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz H-J. Mycology - an update. Part 1: Dermatophytes: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft. 2014; 12(3):188–210.
 146. Ghannoum MA, Mukherjee PK, Evans SR. Molecular Analysis of Dermatophytes suggests spread of infection among household members. Cutis. 2013; 91(5):237-45.
 147. Nenoff P, Verma SB, Vasani R, Burmester A, Hipler UC, Wittig F, et al. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*—A molecular study. Mycoses. 2019; 62(4):336-56.
 148. Verma SB, Panda S, Nenoff P, Singal A, Rudramurthy SM, Uhrlass S, et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: II. Diagnostic methods and taxonomical aspects. Indian J Dermatol Venereol Leprol. 2021; 87(3):326.
 149. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. *Candida* Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. Curr Fungal Infect Rep. 2020; 14(3):209–16.
 150. Sav H, Baris A, Turan D, Altinbas R, Sen S. The frequency, antifungal susceptibility and enzymatic profiles of *Candida* species in cases of onychomycosis infection. Microb Pathog. 2018; 116:257–62.
 151. Pakshir K, Zomorodian K, Zakaei A, Motamedi M, Rahimi Ghiasi M, Karamitalab M. Molecular identification and in-vitro antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from patients with onychomycosis. Curr Med Mycol. 2015; 1(4):26–32.
 152. Razzaghi-Abyaneh M, Sadeghi G, Zeinali E, Alirezaee M, Shams-Ghahfarokhi M, Amani A,

- et al. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from superficial candidiasis in outpatients in Iran. *J Mycol Med.* 2014; 24(2):e43–50.
153. Xu X, Naseri A, Houbraken J, Akbari F, Wang X, Zhao R, et al. Identification and in vitro antifungal susceptibility of causative agents of onychomycosis due to *Aspergillus* species in Mashhad, Iran. *Sci Rep.* 2021; 11(1):6808.
 154. Gil-González M, Gómez-Velásquez JC, Loaiza-Díaz N, Florez-Muñoz S V, Hernández-Herrera GN, Mesa-Arango AC. Onychomycosis caused by the environmental mold *Neoscytalidium dimidiatum* in Colombia, and in vitro antifungal susceptibility evaluation. *Med Mycol.* 2021; 59(6):634–7.
 155. Shokoohi GR, Ansari S, Abolghazi A, Gramishoar M, Nouripour-Sisakht S, Mirhendi H, et al. The first case of fingernail onychomycosis due to *Neoscytalidium novaehollandiae*, molecular identification and antifungal susceptibility. *J Mycol Med.* 2020;30(1):100920.
 156. Vettorato R, Heidrich D, Eidt LM, Pagani DM, Ribeiro AC, da Rosa PD, et al. Onychomycosis caused by *Arthrimum arundinis* in leprosy patient: Case report. *Med Mycol Case Rep.* 2020; 30:19-21.
 157. Aquino VR, Constante CC, Bakos L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. *An Bras Dermatol.* 2007; 82(3):239–44.
 158. Heidrich D, Garcia MR, Stopiglia CDO, Magagnin CM, Daboit TC, Vetoratto G, et al. Dermatophytosis: A 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9(8):865–71.
 159. Koehler A, Ribeiro AC, Pagani DM, Vettorato R, Magagnin CM, Stopiglia CDO, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility of 75 clinical isolates of *Trichophyton* spp. from southern Brazil. *J Med Mycol.* 2021;31(4):101201.
 160. Lamb FM, Stopiglia CDO, Vetoratto G, Goldani JC, Scroferneker MLS. Frequency of onychomycoses in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis in Porto Alegre, Brazil. *Acta Dermatovenerologica Croat.* 2013; 21(1):19–23.
 161. Mezzari A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo.* 1998; 40(2):71–6.
 162. Moriarty B, Hay R, Morris-Jones R. The diagnosis and management of *tinea*. *BMJ.* 2012; 345:e4380.
 163. Arenas R, Moreno-Coutiño G, Vera L, Welsh O. *Tinea incognito*. *Clin Dermatol.* 2010; 28(2):137–9.

164. Chang P, Moreno-Coutiño G. Review on *Tinea Incognita*. *Curr Fungal Infect Rep*. 2016; 10(3):126–31.
165. Verma SB. A closer look at the term “*tinea incognito*”: A factual as well as grammatical inaccuracy. *Indian J Dermatol*. 2017; 62(2):219–220.
166. Verma S, Madhu R. The great Indian epidemic of superficial dermatophytosis: An appraisal. *Indian J Dermatol*. 2017; 62(3):227–36.
167. Thomas M, Nand K. The changing clinical profile of dermatophytosis, a great masquerader, in the context of topical steroid abuse in india-a study of 200 cases. *J Dermatol Nurses Assoc*. 2020; 12(2).
168. Wu LC, Sun PL, Chang YT. Extensive Deep Dermatophytosis Cause by *Trichophyton rubrum* in a Patient with Liver Cirrhosis and Chronic Renal Failure. *Mycopathologia*. 2013; 176(5–6):457–62.
169. Wang R, Huang C, Zhang Y, Li R. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. *Mycoses*. 2021; 64(4):340–8.
170. Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, et al. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. *J Fungi*. 2015; 2(1):4.
171. Inaoki M, Nishijima C, Miyake M, Asaka T, Hasegawa Y, Anzawa K, et al. Case of dermatophyte abscess caused by *Trichophyton rubrum*: a case report and review of the literature. *Mycoses*. 2015; 58(5):318–23.
172. Verrier J, Monod M. Diagnosis of Dermatophytosis Using Molecular Biology. *Mycopathologia*. 2017; 182(1–2):193–202.
173. Petinataud D, Berger S, Contet-audonneau N, Machouart M. Molecular diagnosis of onychomycosis. *J Mycol Med*. 2014; 24(4):287–95.
174. Begum J, Mir NA, Lingaraju MC, Buyamayum B, Dev K. Recent advances in the diagnosis of dermatophytosis. *J Basic Microbiol*. 2020; 60(4):293–303.
175. Baudraz-Rosselet F, Ruffieux C, Lurati M, Bontems O, Monod M. Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents. *Dermatology*. 2010; 220(2):164–8.
176. Vardanyan R, Hruby V. Antifungal drugs. In: *Synthesis of Best-Seller Drugs*. 2016. p. 677–86.

177. Roemer T, Krysan DJ. Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs , and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(5):a019703.
178. Verma SB, Panda S, Nenoff P, Singal A, Rudramurthy SM, Uhrlass S, et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: III. Antifungal resistance and treatment options. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2021; 87(4):468.
179. Lopes AI, Tavaría FK, Pintado ME. Conventional and natural compounds for the treatment of dermatophytosis. *Med Mycol*. 2020; 58(6):707–20.
180. Alkeswani A, Cantrell W, Elewski B. Treatment of *Tinea Capitis*. *Ski Appendage Disord*. 2019; 5(4):201–10.
181. Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, Sahoo PK, Chauhan MK. Treatment and management strategies of onychomycosis. *J Mycol Med*. 2020; 30(2):100949.
182. Rotta I, Otuki MF, Sanches ACC, Correr CJ. Efficacy of topical antifungal drugs in different dermatomycoses: a systematic review with meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras*. 2012; 58(3):308–18.
183. Rotta I, Ziegelmann PK, Otuki MF, Riveros BS, Bernardo NLMC, Correr CJ. Efficacy of Topical Antifungals in the Treatment of Dermatophytosis. *JAMA Dermatology*. 2013; 149(3):341.
184. Dhamoon RK, Popli H, Gupta M. Novel Drug Delivery Strategies for the Treatment of Onychomycosis. *Pharm Nanotechnol*. 2019; 7(1):24–38.
185. Fávero MLD, Bonetti AF, Domingos EL, Tonin FS, Pontarolo R. Oral antifungal therapies for toenail onychomycosis: a systematic review with network meta-analysis toenail mycosis: network meta-analysis. *J Dermatolog Treat*. 2020; 1–10.
186. Hassan N, Dhamija P, Bharti V, Vishwakarma S, Mansoor S, Iqbal Z. Clinical tools for successful treatment of onychomycosis: a narrative review. *Drugs Ther Perspect*. 2020; 36(6):236–42.
187. Gupta AK, Stec N. Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2019; 24(4):213–20.
188. Kawa N, Lee KC, Anderson RR, Garibyan L. Onychomycosis: A Review of New and Emerging Topical and Device-based Treatments. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019; 12(10):29–34.
189. Ma W, Si C, Kasyanju Carrero LM, Liu H-F, Yin X-F, Liu J, et al. Laser treatment for onychomycosis. *Medicine (Baltimore)*. 2019; 98(48):e17948.

190. Kalinowska K, Hryniewicz-Gwóźdź A. Photodynamic therapy in the treatment of onychomycosis – a review. *Dermatology Rev.* 2017; 3(3):290–9.
191. Gupta AK, Summerbell RC, Venkataraman M, Quinlan EM. Nondermatophyte mould onychomycosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2021; 35(8):1628–41.
192. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, Brintnell W, Piraccini BM, Tosti A. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 66(3):494–502.
193. Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am.* 2016; 30(1):51–83.
194. Georgii A, Korting HC. Antifungal susceptibility testing with dermatophytes. *Mycoses.* 1991; 34(5–6):193–9.
195. Kidd SE, Crawford LC, Halliday CL. Antifungal Susceptibility Testing and Identification. *Infect Dis Clin North Am.* 2021; 35(2):313–39.
196. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rd ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008.
197. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017.
198. Rodriguez-Tudela JL. EUCAST definitive document EDef 7.1: Method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(4):398–405.
199. Durand C, Maubon D, Cornet M, Wang Y, Aldebert D, Garnaud C. Can We Improve Antifungal Susceptibility Testing? *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:720609.
200. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009; 7(1):107–19.
201. Ghannoum M, Isham N, Verma A, Plaum S, Fleischer A, Hardas B. In vitro antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(9):4369–72.
202. Mattei AS, Alves SH, Mario DA, Watte G, Severo CB, Guazzelli L da S, et al. Susceptibility of *Candida albicans* blood isolates to 3 antifungal drugs: Retrospective study in rio grande do

- sul, brazil, 1999-2009. Rev Iberoam Micol. 2013; 30(4):243–7.
203. Torres J, Romero H. Actividad antifúngica in vitro del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. Rev Iberoam Micol. 2012; 29(1):24–8.
 204. Pujol I, Aguilar C, Fernández-Ballart J, Guarro J. Comparison of the minimum fungicidal concentration of amphotericin B determined in filamentous fungi by macrodilution and microdilution methods. Med Mycol. 2000; 38(1):23–6.
 205. Qidwai A, Kumar R, Dikshit A. Green synthesis of silver nanoparticles by seed of phoenix sylvestris L. and their role in the management of cosmetics embarrassment. Green Chem Lett Rev. 2018; 11(2):176–88.
 206. Grossman NT, Casadevall A. Physiological Differences in *Cryptococcus neoformans* Strains In Vitro versus In Vivo and Their Effects on Antifungal Susceptibility. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 61(3):e02108-16.
 207. Rex JH, Pfaller MA, Galgiani JN, Bartlett MS, Espinel-Ingroff A, Ghannoum MA, et al. Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing: conceptual framework and analysis of in vitro-in vivo correlation data for fluconazole, itraconazole, and *Candida* infections. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing. Clin Infect Dis. 1997; 24(2):235–47.
 208. Johnson EM. Issues in antifungal susceptibility testing. J Antimicrob Chemother. 2008; 61 Suppl 1:i13-8.
 209. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. Rev Iberoam Micol. 2016; 33(2):63–75.
 210. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Gonzalez GM, Guinea J, Hagen F, Meis JF, et al. Multicenter study of isavuconazole mic distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(1):666–8.
 211. Yang X, Chen W, Liang T, Tan JW, Liu W, Sun Y, et al. A 20-Year Antifungal Susceptibility Surveillance (From 1999 to 2019) for *Aspergillus* spp. and Proposed Epidemiological Cutoff Values for *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*: A Study in a Tertiary Hospital in China. Front Microbiol. 2021; 12:680884.
 212. Methods M. crossm Multicenter , International Study of MIC / MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by. 2017; 61(10):1–8.

213. Bassetti M, Vena A, Bouza E, Peghin M, Muñoz P, Righi E, et al. Antifungal susceptibility testing in *Candida*, *Aspergillus* and *Cryptococcus* infections: are the MICs useful for clinicians? *Clin Microbiol Infect*. 2020; 26(8):1024–33.
214. Eschenauer GA, Carver PL. The evolving role of antifungal susceptibility testing. *Pharmacotherapy*. 2013; 33(5):465–75.
215. Lamoth F, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Role and Interpretation of Antifungal Susceptibility Testing for the Management of Invasive Fungal Infections. *J Fungi (Basel, Switzerland)*. 2020; 7(1):17.
216. Forrest G. Role of antifungal susceptibility testing in patient management. *Curr Opin Infect Dis*. 2006; 19(6):538–43.
217. Hospenthal DR, Murray CK, Rinaldi MG. The role of antifungal susceptibility testing in the therapy of candidiasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48(3):153–60.
218. Knoll MA, Ulmer H, Lass-Flörl C. Rapid Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts and Molds by MALDI-TOF MS: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Fungi (Basel, Switzerland)*. 2021; 7(1):63.
219. Delavy M, Dos Santos AR, Heiman CM, Coste AT. Investigating Antifungal Susceptibility in *Candida* Species With MALDI-TOF MS-Based Assays. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:19.
220. Sanguinetti M, Posteraro B. New approaches for antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2017; 23(12):931–4.
221. Vale-Silva LA, Buchta V. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future? *Mycoses*. 2006; 49(4):261–73.
222. Koehler A, Corbellini VA, Heidrich D, Scroferneker ML. Prediction of itraconazole minimum inhibitory concentration for *Fonsecaea pedrosoi* using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and chemometrics. *PLoS One*. 2020; 15(12):e0243231.
223. Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Quatresooz P. Updating corneofungimetry: a bioassay exploring dermatomycoses and antifungal susceptibility. *Mycopathologia*. 2010; 169(1):27–35.
224. Thatai P, Sapra B. Critical review on retrospective and prospective changes in antifungal susceptibility testing for dermatophytes. *Mycoses*. 2016; 59(10):615–27.
225. Da Cunha MML, Dos Santos LPB, Dornelas-Ribeiro M, Vermelho AB, Rozental S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic

strain of *Rhodotorula mucilaginosa*: A primary causative agent of onychomycosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 2009; 55(3):396–403.

226. Katirae F, Kosari YK, Soltani M, Shokri H, Minooieanhighi MH. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of dermatophytes isolated from companion animals with clinical symptoms of dermatophytosis. J Vet Res. 2021; 65(2):175–82
227. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Rex JH. In vitro synergy of caspofungin and amphotericin B against *Aspergillus* and *Fusarium* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(1):245–7.
228. Jiang Y, Luo W, Verweij PE, Song Y, Zhang B, Shang Z, et al. Regional Differences in Antifungal Susceptibility of the Prevalent Dermatophyte *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia. 2021; 186(1):53–70.
229. Toukabri N, Corpogno S, Bougnoux M-E, El Euch D, Sadfi-Zouaoui N, Simonetti G. In vitro biofilms and antifungal susceptibility of dermatophyte and non-dermatophyte moulds involved in foot mycosis. Mycoses. 2018; 61(2):79–87.
230. Hemanth V, Kindo AJY, Thanneru V, Yuvaraj M. Determination of antifungal susceptibility pattern and biofilm formation among *Trichophyton* species in a tertiary care hospital. Mycoses. 2017; 60:61.
231. Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, et al. Non-dermatophyte mould onychomycosis in Japan. Med Mycol J. 2020; 61(2):23–31.
232. Rosa PD, Heidrich D, Corrêa C, Scroferneker ML, Vettorato G, Fuentefria AM, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility of *Fusarium* isolates in onychomycosis. Mycoses. 2017; 60(9):616–22.
233. Mello VG, Escudeiro H, Weckwerth ACVB, Andrade MI, Fusaro AE, de Moraes EB, et al. Virulence Factors and Antifungal Susceptibility in *Candida* Species Isolated from Dermatomycosis Patients. Mycopathologia. 2021; 186(1):71–80.
234. Gupta AK, Ryder JE, Lynch LE, Tavakkol A. The use of terbinafine in the treatment of onychomycosis in adults and special populations: a review of the evidence. J Drugs Dermatol. 2005; 4(3):302–8.
235. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. Clin Exp Dermatol. 2010; 35(6):658–63.
236. Sharma A, Rabha D, Ahmed G. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia* isolates from

- pityriasis versicolor lesions. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2017; 83(2):249–51.
237. Singh S, Capoor MR, Varshney S, Gupta DK, Verma PK, Ramesh V. Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Infections Caused by *Trichosporon* Species: An Emerging Non-Candida and Non-Cryptococcus Yeast Worldwide. *Indian J Med Microbiol.* 2019; 37(4):536–41.
238. Sooriya S, Jayapalan S, Mini G, Manjusree S, Nandakumar L. Chronic dermatophytosis: Clinico-mycological determinants and antifungal susceptibility pattern. *Indian J Dermatol.* 2021; 66(3):329.
239. Salehi Z, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Molecular Epidemiology, Genetic Diversity, and Antifungal Susceptibility of Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Human Dermatophytosis. *Front Microbiol.* 2021; 12:643509.
240. Das S, Datt S, Dar SA, Bhattacharya SN, Pandhi D, Gupta C, et al. Assessment of in vitro antifungal susceptibility pattern of dermatophytes isolated from patients with onychomycosis attending a tertiary care hospital of East Delhi. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2020; 86(3):301–4.
241. Falahati M, Fateh R, Nasiri A, Zaini F, Fattahi A, Farahyar S. Specific identification and antifungal susceptibility pattern of clinically important dermatophyte species isolated from patients with dermatophytosis in Tehran, Iran. *Arch Clin Infect Dis.* 2018; 13(3):e63104.
242. Özcan D, Şekin D, Demirbilek M. In vitro antifungal susceptibility of dermatophyte strains causing *tinea pedis* and onychomycosis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A case-control study. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2010; 24(12):1442–6.
243. Sarifakioglu E, Seçkin D, Demirbilek M, Can F. In vitro antifungal susceptibility patterns of dermatophyte strains causing *tinea unguium*. *Clin Exp Dermatol.* 2007; 32(6):675–9.
244. Gnat S, Łagowski D, Nowakiewicz A, Osińska M, Kopiński Ł. Population differentiation, antifungal susceptibility, and host range of *Trichophyton mentagrophytes* isolates causing recalcitrant infections in humans and animals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020; 39(11):2099–113.
245. Silva LB, De Oliveira DBC, Da Silva B V, De Souza RA, Da Silva PR, Ferreira-Paim K, et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2014; 28(5):633–40.
246. Gupta AK, Kohli Y, Batra R. In vitro activities of posaconazole, ravuconazole, terbinafine, itraconazole and fluconazole against dermatophyte, yeast and non-dermatophyte species. *Med Mycol.* 2005; 43(2):179–85.

247. de Assis Santos D, de Carvalho Araújo RA, Kohler LM, Machado-Pinto J, Hamdan JS, Cisalpino PS. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates from patients with onychomycosis pre- and post-treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29(5):563–9.
248. Cordeiro RA, Brilhante RS, Rocha MF, Rabenhorsch SH, Moreira JL, Grangeiro TB, et al. Antifungal susceptibility and genetic similarity of sequential isolates of *Trichophyton rubrum* from an immunocompetent patient with chronic dermatophytosis. *Clin Exp Dermatol*. 2006; 31(1):122–4.
249. Da Silva BCM, Auler ME, Ruiz LS, Gandra RF, Dos Santos JI, Paula CR, et al. *Trichophyton rubrum* isolated from AIDS and human immunodeficiency virus-infected patients in São Paulo, Brazil: Antifungal susceptibility and extracellular enzyme production. *Chemotherapy*. 2005; 51(1):21–6.
250. Gao Y, Zhan P, Hagen F, Menken SBJ, Sun J, Rezaei-Matehkolaei A, et al. Molecular epidemiology and in vitro antifungal susceptibility of *Trichophyton schoenleinii*, agent of *tinea capitis favosa*. *Mycoses*. 2019; 62(5):466–74.
251. Deng S, Ansari S, Ilkit M, Rafati H, Hedayati MT, Taghizadeh-Armaki M, et al. In vitro antifungal susceptibility profiles of 12 antifungal drugs against 55 *Trichophyton schoenleinii* isolates from *tinea capitis favosa* patients in Iran, Turkey, and China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(2):e01753-16.
252. Aneke CI, Rhimi W, Hubka V, Otranto D, Cafarchia C. Virulence and antifungal susceptibility of *Microsporum canis* strains from animals and humans. *Antibiotics*. 2021; 10(3):296.
253. Aneke CI, Rhimi W, Otranto D, Cafarchia C. Synergistic Effects of Efflux Pump Modulators on the Azole Antifungal Susceptibility of *Microsporum canis*. *Mycopathologia*. 2020; 185(2):279–88.
254. Brilhante RSN, Cordeiro RA, Medrano DJA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. *Can J Microbiol*. 2005; 51(6):507–10.
255. Ansari S, Ahmadi B, Norouzi M, Ansari Z, Afsarian MH, Lotfali E, et al. *Epidermophyton floccosum*: nucleotide sequence analysis and antifungal susceptibility testing of 40 clinical isolates. *J Med Microbiol*. 2019; 68(11):1655–63.
256. Ansari S, Ahmadi B, Hedayati MT, Nouripour-Sisakht S, Taghizadeh-Armaki M, Fathi M, et al. Investigation of in vitro antifungal susceptibility testing and genetic diversity of clinical isolates of *Trichophyton benhamiae* and *Trichophyton eriotrephon* in Iran. *Mycoses*. 2021; 64(3):316–23.

257. Shamsizadeh F, Ansari S, Zarei Mahmoudabadi A, Hubka V, Čmoková A, Guillot J, et al. In vitro antifungal susceptibility patterns of *Trichophyton benhamiae* complex isolates from diverse origin. *Mycoses*. 2021; 64(11):1378-86.
258. Deng S, de Hoog GS, Verweij PE, Zoll J, Ilkit M, Morsali F, et al. In vitro antifungal susceptibility of *Trichophyton violaceum* isolated from *tinea capitis* patients. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(4):1072–5.
259. Kano R, Oshimo K, Fukutomi T, Kamata H. Antifungal susceptibility of Japanese isolates of *Nannizia fulva* (Formerly *Microsporum fulvum*). *Med Mycol J*. 2019; 60(1):23–5.
260. Tsang C-C, Hui TWS, Lee K-C, Chen JHK, Ngan AHY, Tam EWT, et al. Genetic diversity of *Aspergillus* species isolated from onychomycosis and *Aspergillus hongkongensis* sp. nov., with implications to antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 84(2):125–34.
261. Barrantes-Ortiz N, Lozada-Alvarado S, Gross NT, Jaikel-Viquez D. Antifungal susceptibility of clinical isolates of *Scopulariopsis* sp. obtained from onychomycosis. *Dermatologia Rev Mex*. 2019; 63(3):261–7.
262. Carrillo-Muñoz AJ, Tur-Tur C, Cárdenes D, Rojas F, Giusiano G. In vitro antifungal susceptibility profile of *Scopulariopsis brevicaulis* isolated from onychomycosis. *Rev Esp Quimioter*. 2015; 28(4):210–3.
263. Vettorato R, Heidrich D, Eidt LM, Pagani DM, Ribeiro AC, Dallé da Rosa P, et al. Onychomycosis caused by *Arthrimum arundinis* in leprosy patient: Case report. *Med Mycol Case Rep*. 2020; 30:19–21.
264. Mohammadi F, Ghasemi Z, Familsatarian B, Salehi E, Sharifynia S, Barikani A, et al. Relationship between antifungal susceptibility profile and virulence factors in *Candida albicans* isolated from nail specimens. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2020; 53:e20190214.
265. Sadeghi G, Ebrahimi-Rad M, Shams-Ghahfarokhi M, Jahanshiri Z, Ardakani EM, Eslamifar A, et al. Cutaneous candidiasis in Tehran-Iran: From epidemiology to multilocus sequence types, virulence factors and antifungal susceptibility of etiologic *Candida* species. *Iran J Microbiol*. 2019; 11(4):267–79.
266. Figueiredo VT, De Assis Santos D, Resende MA, Hamdan JS. Identification and in vitro antifungal susceptibility testing of 200 clinical isolates of *Candida* spp. responsible for fingernail infections. *Mycopathologia*. 2007; 164(1):27–33.
267. Mobin M, Szeszs MW, Takahashi JP, Martins M, de Hippólito DDC, Porto JCS, et al. Antifungal Susceptibility of *Candida* Species Isolated from Horticulturists with

Onychomycosis in Piauí, Brazil. *Iran J Public Health*. 2018; 47(12):1816–21.

268. Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar LJ, Arenas R, Hernández-Hernández F, Millán-Chiu B, Torres-Rodríguez JM, et al. Onychomycosis-causing yeasts in four Mexican dermatology centers and their antifungal susceptibility to azolic compounds. *Rev Iberoam Micol*. 2011; 28(1):32–5.
269. Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020; 83(3):770–803.
270. Ahmad S, Alfouzan W. *Candida auris*: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms*. 2021; 9(4):807.
271. Berman J, Krysan DJ. Drug resistance and tolerance in fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2020; 18(6):319–31.
272. Espinel-Ingroff A, Cantón E, Pemán J. Antifungal Resistance among Less Prevalent *Candida* Non-albicans and Other Yeasts versus Established and under Development Agents: A Literature Review. *J Fungi (Basel, Switzerland)*. 2021; 7(1):24.
273. Oliveira JS de, Pereira VS, Castelo-Branco D de SCM, Cordeiro R de A, Sidrim JJC, Brilhante RSN, et al. The yeast, the antifungal, and the wardrobe: a journey into antifungal resistance mechanisms of *Candida tropicalis*. *Can J Microbiol*. 2020; 66(6):377–88.
274. Frías-De-león MG, Hernández-Castro R, Conde-Cuevas E, García-Coronel IH, Vázquez-Aceituno VA, Soriano-Ursúa MA, et al. *Candida glabrata* antifungal resistance and virulence factors, a perfect pathogenic combination. *Pharmaceutics*. 2021;13(10):1529.
275. Halliday CL, Slavin MA, Chen SC-A. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* and *Cryptococcus* Species and Mechanisms of Resistance: Implications for Clinical Laboratories. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017; 11(3):124–33.
276. Asner SA, Giulieri S, Diezi M, Marchetti O, Sanglard D. Acquired multidrug antifungal resistance in *Candida lusitanae* during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(12):7715–22.
277. Butts A, Reitler P, Nishimoto AT, DeJarnette C, Estredge LR, Peters TL, et al. A systematic screen reveals a diverse collection of medications that induce antifungal resistance in *Candida* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019; 63(5):e00054-19.
278. Frías-De-león MG, Hernández-Castro R, Vite-Garín T, Arenas R, Bonifaz A, Castañón-Olivares L, et al. Antifungal resistance in *Candida auris*: Molecular determinants. *Antibiotics*. 2020; 9(9):1–16.

279. Du M, Hu W, Tamura T, Alshahni MM, Satoh K, Yamanishi C, et al. Investigation of the Physiological, Biochemical and Antifungal Susceptibility Properties of *Candida auris*. *Mycopathologia*. 2021; 186(2):189–98.
280. Gaurav V, Bhattacharya SN, Sharma N, Datt S, Kumar P, Rai G, et al. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. *J Med Mycol*. 2021; 31(1):101087.
281. Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, et al. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*. 2018; 61(7):477–84.
282. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, et al. Terbinafine resistance of *Trichophyton* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(7):1–13.
283. Kano R, Kimura U, Kakurai M, Hiruma J, Kamata H, Suga Y, et al. *Trichophyton indotineae* sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. *Mycopathologia*. 2020; 185(6):947–58.
284. Shen JJ, Arendrup MC, Verma S, Saunte DML. The Emerging Terbinafine-Resistant *Trichophyton* Epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? *Dermatology*. 2021; 1–20.
285. Fattahi A, Shirvani F, Ayatollahi A, Rezaei-Matehkolaei A, Badali H, Lotfali E, et al. Multidrug-resistant *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII in an Iranian family with generalized dermatophytosis: report of four cases and review of literature. *Int J Dermatol*. 2021; 60(6):686–92.
286. Siopi M, Efstathiou I, Theodoropoulos K, Pournaras S, Meletiadiis J. Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of *Trichophyton* Isolates in Greece: Emergence of Terbinafine-Resistant *Trichophyton mentagrophytes* Type VIII Locally and Globally. *J Fungi (Basel, Switzerland)*. 2021; 7(6):419.
287. Nenoff P, Verma SB, Ebert A, Süß A, Fischer E, Auerswald E, et al. Spread of terbinafine-resistant *Trichophyton mentagrophytes* type VIII (India) in Germany—“the tip of the iceberg?” *J Fungi*. 2020;6(4):1–20.
288. Pereira FDO. A review of recent research on antifungal agents against dermatophyte biofilms. *Med Mycol*. 2021; 59(4):313–26.
289. Tobudic S, Kratzer C, Lassnigg A, Presterl E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*. 2012; 55(3):199–204.

290. Mah T, O'Toole G. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1):34–9.
291. Kaur I, Chakrabarti A, Dogra S, Rai R, Kumar B. Nail Involvement in Leprosy: A Study of 300 Patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2003; 71(4):320–7.
292. Rajput CD, Nikam BP, Gore SB MS. Nail Changes in Leprosy: An Observational Study of 125 Patients. *Indian Dermatol Online J.* 2020; 11(2):195–201.
293. Ramos JM, Reyes F, Belinchón I. Nail Changes In Recent And Old Leprosy Patients. *EMJ Dermatol.* 2013; 1(1):44–52.
294. El Darouti MA, Hussein S, Al Tahlawy SR, Al Fangary M, Mashaly HM, El Nabarawy E, et al. Clinical study of nail changes in leprosy and comparison with nail changes in diabetic patients. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2011; 25(3):290–5.
295. Belinchón Romero I, Ramos Rincón JM, Reyes Rabell F. Nail involvement in leprosy. *Actas Dermosifiliogr.* 2012; 103(4):276–84.
296. Mendiratta VRC, Sharma RC, Sardana K, Koranne R V. Smear positive leprosy with HIV infection, silent neuritis and extensive *Tinea corporis* and *Tinea unguium* in an Indian male. *Indian J Lepr.* 2001; 73(4):349–52.
297. Sampaio RNR, Ribeiro AMQ, Milfont MDDA, Leite E. Onychomycosis and *tinea pedis* caused by *Microsporum nanum* in a patient with lepromatous leprosy. *An Bras Dermatol.* 1997; 72(6):571–4.
298. Barde AK, Singh SM. A case of onychomycosis caused by *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. *Mykosen.* 1983; 26(6):311–6.
299. Day W, Prodanovic E. Borderline lepromatous leprosy masking as *tinea versicolor*. *Int J Dermatol.* 2019; 58(6):e125–6.
300. Narang T, Dogra S, Kaur I. Co-localization of Pityriasis versicolor and BT Hansen's disease. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 2005; 73(3):206–7.
301. Massone C, Cavalchini A, Clapasson A, Nunzi E. Hypopigmented macules: Leprosy, atopy or pityriasis versicolor? *G Ital di Dermatologia e Venereol.* 2010; 145(6):779–82.
302. Pönnighaus JM, Nkhosa P, Baum H-P. Cutaneous manifestation of cysticercosis. *Hautarzt.* 2001; 52(12):1098–100.
303. De Carsalade G-Y, Achirafi A, Bouree P. SIM Combination of three cutaneous diseases in

Mayotte. *Med Trop*. 2006; 66(2):189–92.

304. Thangaraju P, Giri VC, Singh H, Kumar V, Ali S. *Tinea barbae*: In released from treatment (RFT) Hansen's disease patient. *J Clin Diagnostic Res*. 2014;8(7):YD01-2.
305. Dashatwar D, Kar S, Gangane N, Pol V, Madke B, Kulkarni S, et al. Chromoblastomycosis in a resident of a leprosarium. *Lepr Rev*. 2015;86(1):102–7.
306. Basílio FMA, Hammerschmidt M, Mukai MM, Werner B, Pinheiro RL, Moritz S. Mucormycosis and chromoblastomycosis occurring in a patient with leprosy type 2 reaction under prolonged corticosteroid and thalidomide therapy. *An Bras Dermatol*. 2012; 87(5):767–71.
307. Apte G, Gedam JR, Poojary S, Nagpur NG, Pai VV, Ganapathi R. Chromoblastomycosis in a case of borderline lepromatous leprosy with recurrent type II lepra reaction. *Lepr Rev*. 2011; 82(3):310–5.
308. Miyagi H, Yamamoto Y, Kanamori S, Taira K, Asato Y, Myint CK, et al. Case of chromoblastomycosis appearing in an Okinawa patient with a medical history of Hansen's disease. *J Dermatol*. 2008; 35(6):354–61.
309. Wong S-M, Tang JJ. Disseminated sporotrichosis in a patient with a past history of lepromatous leprosy: a case report. *Med Mycol*. 2012; 50(4):404–6.
310. Di Luca DG, De Andrade PJS, Sales AM, De Menezes VM, Galhardo MCG, Pimentel MIF, et al. Superposition of leprosy and other neglected tropical diseases in the state of Rio de Janeiro: a case series report. *Lepr Rev*. 2013; 84(4):302–7.
311. Azulay RD, Mendonca IRM, Santos CM, Monteiro PCF, Lazera MS, Kac BK, et al. Cutaneous cryptococcosis associated with lepromatous leprosy. *Int J Dermatol*. 2001; 40(6):412–4.
312. Teixeira MMR, Assunção CB, Lyon S, Gomes RR, Junior HBM, Rocha-Silva F, et al. A case of subcutaneous phaeohyphomycosis associated with leprosy. *Infect Disord - Drug Targets*. 2017; 17(3):223–6.
313. Quatresooz P, Arrese JE, Piérard GE. Synopsis of invasive dermatomycoses in immunocompromised patients. *Rev Med Liege*. 2003; 58(11):690–4.
314. Gupta B, Gupta S, Chaudhary M, Raj AT, Awan KH, Patil S. Oral candida prevalence and species specificity in leprosy. *Disease-a-Month*. 2020; 66(7):100920.
315. Reichart PA, Samaranayake LP, Bendick C, Schmidt-Westhausen AM, Jayatilake JAMS. Prevalence of oral *Candida* species in leprosy patients from Cambodia and Thailand. *J Oral*

Pathol Med. 2007; 36(6):342–6.

316. De Araújo Navas EAF, Inocêncio AC, Almeida JD, Back-Brito GN, Mota AJ, Jorge AOC, et al. Oral distribution of *Candida* species and presence of oral lesions in Brazilian leprosy patients under multidrug therapy. J Oral Pathol Med. 2009; 38(10):764–7.

ARTIGO 1

*Artigo formatado para submissão na revista
Journal of the American Academy of
Dermatology.*

Molecular identification and *in vitro* antifungal susceptibility of fungi causing onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients: a cross-sectional study

Rodrigo Vettorato, MD, MS^{1,2}, Alessandra Koehler, MS¹, Amanda Carvalho Ribeiro, UG³, Paulo Cezar de Moraes, MS^{1,4}, Danielle Machado Pagani, MS⁵, Daiane Heidrich, PhD¹, Leonardo Girardi Ransan, BBiot⁶, Gerson Vettorato, MD², Letícia Maria Eidt, MD, PhD⁴, Maria Lúcia Scroferneker, PhD^{1,7}

¹ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Dermatology Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

³ Graduate Program in Pharmacy, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Sanitary Dermatology Outpatient Clinic of Porto Alegre – Secretaria Estadual de Saúde do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁵ Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁶ Graduate Program in Biotechnology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁷ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author:

Maria Lúcia Scroferneker, PhD

Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, Brazil. Rua Sarmiento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brazil. Tel.: (+55) 51-33083934; Fax: (+55) 51-33083121

Email: scrofern@ufrgs.br

Funding sources: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Conflicts of Interest: None declared.

IRB approval status: Approved by the Ethics Committee of the School of Public Health of Rio Grande do Sul (CAAE: 60834916.7.3001.5312) and by the Ethics Committee of the Federal University of Rio Grande do Sul (CAAE: 60834916.7.0000.5347).

Keywords: leprosy, superficial mycosis, antifungal susceptibility, dermatophytes, yeasts, non-dermatophyte filamentous fungi, *Trichophyton*

Abstract

Background: Leprosy patients are susceptible to a variety of opportunistic infections, such as superficial mycoses. However, there are few reports in the literature about this association.

Objective: To determine the prevalence of fungal species causing onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients and to assess their antifungal susceptibility.

Methods: Cross-sectional study including 95 leprosy patients and 91 non-leprosy patients with lesions characteristic of superficial mycoses. Skin scrapes and nail clippings were cultured on Sabouraud dextrose agar, and molecularly identified with sequencing of the ITS1–5.8S rDNA-ITS2 region. Antifungal susceptibility testing was performed using Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) protocols. Comparisons of proportions were evaluated by the Chi-square test.

Results: Fungal growth occurred in 48 samples from leprosy patients and 46 samples from the control group. In both groups, the main etiological agent was *Trichophyton interdigitale*, which presented higher minimum inhibitory concentration (MIC) values for itraconazole in the leprosy group ($p < 0.05$).

Limitations: It was not possible to perform statistical analyzes with all identified fungal species due to the small sample size.

Conclusion: Superficial mycoses are frequent in leprosy patients, whose etiologic agents are similar to those found in the general population, but which may have different antifungal susceptibility profiles.

Introduction

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the bacillus *Mycobacterium leprae* and is characterized by lesions in the skin and peripheral nerves. It is a neglected tropical disease and the countries with the highest number of cases are India and Brazil.¹⁻³ *M. leprae* is an obligate intracellular pathogen that triggers a wide spectrum of clinical manifestations, which are correlated with the immune response of each individual.^{2,4} Leprosy can be classified as paucibacillary (PB) or multibacillary (MB), determined according to the bacillary index found in the bacilloscopy exam.^{5,6} In addition, there are other classification systems, such as the Madrid classification, which divides the clinical forms of leprosy into four groups: indeterminate (PB), tuberculoid (PB), borderline (MB), and lepromatous (MB).^{7,8}

Treatment of leprosy consists of the multidrug therapy scheme indicated by the World Health Organization, comprising rifampicin, clofazimine and dapsones.⁹ Corticosteroids, especially prednisone, are also widely used to treat the inflammation associated with leprosy neuropathy.¹⁰ The use of antibiotics and systemic corticosteroids, associated with the presence of several skin lesions, predispose leprosy patients to various opportunistic infections, such as superficial mycoses.¹¹⁻¹³ These mycoses have worldwide prevalence estimated at 20 to 25% of the population and the most common types are onychomycosis and *tinea pedis*.¹⁴ The treatment is performed with topical or oral antifungal agents which;¹⁵ however, often are ineffective due to the growing problem of antifungal resistance.¹⁶⁻¹⁹

Although leprosy patients are susceptible to superficial mycoses and these mycoses are very prevalent,^{14,20} there are few reports in the literature of this association. In this cross-sectional study, we aimed to determine the prevalence of fungal species causing onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients and to evaluate their *in vitro* antifungal susceptibility.

Methods

Study population and sample collection

95 patients with leprosy and 91 patients without leprosy (control group) who presented lesions characteristic of superficial mycoses on the feet and hands were evaluated. Leprosy patients were recruited at the Sanitary Dermatology Outpatient Clinic of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. Control patients were recruited from the Dermatology Service of Hospital Santa Clara, Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. The study was approved by the ethics committees of the institutions involved and informed consent was obtained from all patients. For all patients, sex, age and location of the lesion were recorded. For leprosy patients, the Madrid classification and the presence of leprosy reactions were also noted.

Skin scrapes and nail clippings were taken from both groups, stored in Petri dishes and sent for mycological analysis. If the patient had more than one lesion site, each sample was collected and analyzed separately.

Mycological analysis

Direct mycological examination was performed with clarification using 10% potassium hydroxide (KOH) and analysis under an optical microscope to visualize fungal structures. Skin scrapes and nail clippings were cultured on Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Becton Dickinson Company, Cockeysville, MD, USA) and Mycosel™ agar (Becton Dickinson Company, Cockeysville, MD, USA). Cultures were incubated at 30-35 °C and growth was analyzed weekly for up to four weeks.

Molecular identification

Samples with positive growth of yeast and filamentous fungi were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) (Becton Dickinson Company, Cockeysville, MD, USA) and incubated at 30 °C for 48 hours and seven days, respectively. The total genomic DNA of the isolates was extracted with the FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals). The amplification of the ITS1–5.8S rDNA-ITS2 (internal transcribed spacer)

region was performed with ITS1 and ITS4 primers and polymerase chain reaction (PCR). The PCR product was purified with ExoSAP-IT™ (Affymetrix, USA) and sequenced on the ABI-PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequences obtained were compared to the sequences reported in GenBank, using the basic algorithm of the local alignment search tool (BLAST), and then submitted to GenBank.

Samples with isolates identified as non-dermatophyte filamentous fungi were collected twice more, in consecutive months, to rule out possible contamination or only saprophytic presence in the lesions.³

Antifungal susceptibility testing

Antifungal susceptibility assays were performed according to the broth microdilution protocols M27 for yeasts and M38 for filamentous fungi, from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).^{21,22} For filamentous fungi, eight antifungal agents were tested: itraconazole (Jansen-Cilag Farmacêutica Ltda., Brazil), ketoconazole (Bayer, Spain), fluconazole (Pfizer Inc., USA), posaconazole (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), voriconazole (Pfizer Inc., USA), terbinafine (Novartis Research Institute, Austria), ciclopirox olamine (Aventis, Dermik Laboratories, Berwyn, PA, USA) and griseofulvin (Schering-Plough, Brazil). For yeasts, six antifungal agents were tested: itraconazole, ketoconazole, fluconazole, posaconazole, voriconazole and caspofungin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). All experiments were performed in triplicate, with *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 used as methodological controls.

The concentration ranges of antifungals tested were: 0,0313-16 µg/mL for itraconazole, ketoconazole, posaconazole and voriconazole; 0,125-64 µg/mL for fluconazole and griseofulvin; 0,001-0,5 µg/mL for terbinafine; 0,06-32 µg/mL for ciclopirox olamine; and 0,015-8 µg/mL for caspofungin. The minimum inhibitory concentrations (MIC) were defined by the percentages of growth inhibition defined

by CLSI. Only for caspofungin, the minimum effective concentration (MEC) was determined, corresponding to 50% of growth inhibition analyzed in 24 hours.²¹

After the definition of the MICs and MECs, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. A 50 µL aliquot of each well in which no growth was observed was transferred to test tubes containing 800 µL of Sabouraud Dextrose Broth (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) and incubated for ten days at 30 °C. MFC was determined as the minimum concentration at which no fungal growth occurred. These tests were performed in duplicate.

For *Candida* yeasts, the MIC values were analyzed according to the CLSI clinical breakpoints available for some species and antifungal agents.²³ For isolates from other genera and species, the analyzes were carried out only in a descriptive and comparative manner with other studies, as there are no clinical breakpoints established in CLSI.

Statistical analysis

Data was presented as frequencies with percentages and means ± standard deviations (SD). The normality of data distribution was examined using the Shapiro–Wilk test. The Mann-Whitney U test was used to compare continuous variables between two groups. Comparisons of proportions were evaluated by the Chi-square test or Fisher’s exact test for categorical variables. The statistical analyses were performed using SPSS v.22 (IBM Corporation, Chicago, IL, USA). All tests were two tailed, with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Fungal growth occurred in 48 samples from 40 leprosy patients (30 males and 10 females; mean age ± SD, 56 ± 11 years) and in 46 samples from 43 control patients (15 males and 28 females; mean age ± SD, 60 ± 14 years). In the leprosy group, one (2.1%) of the isolates were from fingernails, 14 (29.2%)

from the interdigital spaces/sole of the feet and 33 (68.7%) from the toenails. In the control group, three (6.5%) of the isolates were from fingernail, one (2.2%) from the interdigital spaces of the feet and 42 (91.3%) from the toenails.

Regarding the clinical characteristics of the leprosy group, one (2,5%) of the patients had the tuberculoid clinical form, 27 (67,5%) had the borderline clinical form, and 12 (30,0%) had the lepromatous clinical form. Leprosy reactions were present in 20 patients (50,0%): five (12,5%) had type 1 reaction, 13 (32,5%) had type 2 reactions, and 2 (5,0%) had type 1 and 2 reactions.

The fungal isolates analyzed in the study, their accession numbers in GenBank and their molecular identification are shown in Table 1. In the leprosy group, 28 (58.3%) of the isolates were dermatophytes, 14 (29.2%) were yeasts, and six (12.5%) were non-dermatophyte filamentous fungi (NDFF). In the control group, 32 (69.6%) of the isolates were dermatophytes, 11 (23.9%) were yeasts, and three (6.5%) were NDFF. There was no statistically significant difference in the distribution of isolates in dermatophytes, yeasts and NDFF between the two groups ($p=0.453$). The prevalent species was *Trichophyton interdigitale*, corresponding to 34 (36.2%) isolates from the total sample, followed by *T. rubrum*, with 23 (24.5%) isolates.

The MIC values of *T. interdigitale*, *T. rubrum* and *Candida* spp. (including all *Candida* species for each group) are summarized in Table 2. A statistically significant difference ($p<0.05$) was found in the MIC values of *T. interdigitale* isolates for itraconazole and griseofulvin. For *T. rubrum*, this difference was found only for voriconazole. Table 3 summarizes the MFC values of the same species/genus cited above, in which no significant difference was found ($p>0.05$).

Table 1. Isolates analyzed in the study, their GenBank accession numbers and molecular identification.

| Leprosy (n=48) | | | Controls (n=46) | | |
|----------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Isolate code | GenBank accession number | Identification | Isolate code | GenBank accession number | Identification |
| L01 | OL602116 | <i>Acremonium brachyphenium</i> | C54 | OL602458 | <i>Fusarium foentens</i> |
| L02 | OL602115 | <i>Acremonium exuviarum</i> | C55 | OL602456 | <i>Fusarium keratoplasticum</i> |
| L03 | MK539828.1 | <i>Arthrimum arundinis</i> | C56 | OL630915 | <i>Fusarium solani</i> |
| L04 | OL602454 | <i>Fusarium keratoplasticum</i> | C58 | OL603882 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L05 | OL602455 | <i>Fusarium keratoplasticum</i> | C59 | OL603883 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L06 | OL630942 | <i>Fusarium oxysporum</i> | C60 | OL603884 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L07 | OL602457 | <i>Epidermophyton floccosum</i> | C61 | OL603885 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L08 | OL603865 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C62 | OL603886 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L09 | OL603866 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C63 | OL603887 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L10 | OL603867 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C64 | OL603888 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L11 | OL603868 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C65 | OL603889 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L12 | OL603869 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C66 | OL603890 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L13 | OL603870 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C67 | OL603891 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L14 | OL603871 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C68 | OL603892 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L15 | OL603872 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C69 | OL603893 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L16 | OL603873 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C70 | OL603894 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L18 | OL603874 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C71 | OL603895 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L19 | OL603875 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C72 | OL603896 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L20 | OL603876 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C73 | OL603897 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L21 | OL603877 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C74 | OL603898 | <i>Trichophyton interdigitale</i> |
| L22 | OL603878 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C75 | OL603924 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L23 | OL603879 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C76 | OL603925 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L24 | OL603880 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C77 | OL603926 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L25 | OL603881 | <i>Trichophyton interdigitale</i> | C78 | OL603927 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L26 | OL603914 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C79 | OL603928 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L27 | OL603915 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C80 | OL603929 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L28 | OL603916 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C81 | OL603930 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L29 | OL603917 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C82 | OL603931 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L30 | OL603918 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C83 | OL603932 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L31 | OL603919 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C84 | OL603933 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L32 | OL603920 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C85 | OL603934 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L33 | OL603921 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C86 | OL603935 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L34 | OL603922 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C87 | OL603936 | <i>Trichophyton rubrum</i> |
| L35 | OL603923 | <i>Trichophyton rubrum</i> | C88 | OL604468 | <i>Trichophyton tonsurans</i> |
| L38 | OL602180 | <i>Candida duobushaemulonis</i> | C89 | OL604469 | <i>Trichophyton tonsurans</i> |
| L39 | OL602183 | <i>Candida guilliermondii</i> | C90 | OL602114 | <i>Candida africana</i> |
| L40 | OL602184 | <i>Candida guilliermondii</i> | C91 | OL602185 | <i>Candida guilliermondii</i> |
| L41 | OL603968 | <i>Candida haemulonis</i> | C92 | OL602186 | <i>Candida guilliermondii</i> |
| L43 | OL602188 | <i>Candida metapsilosis</i> | C93 | OL630946 | <i>Candida lipolytica</i> |
| L44 | OL602198 | <i>Candida orthopsilosis</i> | C94 | OL602194 | <i>Candida parapsilosis</i> |
| L45 | OL602189 | <i>Candida parapsilosis</i> | C95 | OL602195 | <i>Candida parapsilosis</i> |
| L46 | OL602190 | <i>Candida parapsilosis</i> | C96 | OL602196 | <i>Candida parapsilosis</i> |
| L47 | OL602191 | <i>Candida parapsilosis</i> | C97 | OL602197 | <i>Candida parapsilosis</i> |
| L48 | OL602192 | <i>Candida parapsilosis</i> | C98 | OL602279 | <i>Candida tropicalis</i> |
| L49 | OL602193 | <i>Candida parapsilosis</i> | C99 | OL603966 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| L50 | OL602276 | <i>Candida tropicalis</i> | C100 | OL603967 | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| L51 | OL602277 | <i>Candida tropicalis</i> | | | |
| L52 | OL602278 | <i>Candida tropicalis</i> | | | |

Table 2. *In vitro* minimum inhibitory concentration values of *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, and *Candida* spp. from patients with leprosy and controls.

| Antifungal drug µg/mL | Leprosy | | | Controls | | |
|--------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|
| | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. |
| Itraconazole | | | | | | |
| MIC (GM) | ^a 1.79 | 1.71 | 0.27 | 0.10 | 0.13 | 1.90 |
| MIC ₅₀ | 0.50 | 0.12 | 0.12 | 0.06 | 0.12 | 0.12 |
| MIC ₉₀ | 16.0 | >16.0 | 1.00 | 0.25 | 0.25 | 18.0 |
| Range | 0.03-≥16.0 | 0.03->16.0 | 0.03-1.00 | 0.03-25.0 | 0.03-0.25 | ≤0.03-18.0 |
| Ketoconazole | | | | | | |
| MIC (GM) | 0.81 | 0.36 | 0.74 | 0.83 | 0.63 | 1.31 |
| MIC ₅₀ | 0.25 | 0.28 | 0.12 | 0.50 | 0.25 | 0.12 |
| MIC ₉₀ | 4.00 | 1.00 | 2.00 | 2.00 | 4.00 | 8.00 |
| Range | 0.03-4.00 | 0.03-1.00 | ≤0.03-2.00 | 0.12-2.00 | 0.03-4.00 | ≤0.03-18.0 |
| Fluconazole | | | | | | |
| MIC (GM) | 16.2 | 7.23 | 8.28 | 16.9 | 11.9 | 10.2 |
| MIC ₅₀ | 8.00 | 2.00 | 4.00 | 8.00 | 1.00 | 2.00 |
| MIC ₉₀ | 32.0 | 32.0 | 32.0 | >64.0 | 64.0 | 64.0 |
| Range | 4.00-32.0 | 0.12-32.0 | 0.50-32.0 | 0.25->64.0 | 0.12-64.0 | 0.50-64.0 |
| Posaconazole | | | | | | |
| MIC (GM) | 0.32 | 0.58 | 0.73 | 0.19 | 0.17 | 2.03 |
| MIC ₅₀ | 0.25 | 0.12 | 0.18 | 0.12 | 0.12 | 0.25 |
| MIC ₉₀ | 2.00 | 4.00 | 8.00 | 0.50 | 0.50 | 16.0 |
| Range | 0.03-2.00 | 0.06-4.00 | ≤0.03-8.00 | 0.03-0.50 | 0.06-0.50 | ≤0.03-16.0 |
| Voriconazole | | | | | | |
| MIC (GM) | 0.16 | ^a 0.13 | 0.99 | 0.10 | 0.09 | 1.91 |
| MIC ₅₀ | 0.12 | 0.09 | 1.00 | 0.12 | 0.03 | 0.12 |
| MIC ₉₀ | 0.25 | 0.50 | 4.00 | 0.25 | 0.50 | 16.0 |
| Range | 0.06-25.0 | 0.06-0.50 | ≤0.03-4.00 | 0.06-0.25 | 0.03-0.50 | 0.03-16.0 |
| Terbinafine | | | | | | |
| MIC (GM) | 0.03 | 0.03 | - | 0.15 | 0.06 | - |
| MIC ₅₀ | 0.01 | 0.03 | - | 0.01 | 0.06 | - |
| MIC ₉₀ | 0.12 | 0.12 | - | 2.00 | 0.12 | - |
| Range | 0.003-12.0 | <0.0009-0.12 | - | 0.001-2.00 | 0.01-0.12 | - |
| Ciclopirox | | | | | | |
| MIC (GM) | 0.80 | 1.60 | - | 2.95 | 1.30 | - |
| MIC ₅₀ | 0.50 | 2.00 | - | 1.00 | 1.00 | - |
| MIC ₉₀ | 2.00 | 2.00 | - | 32.0 | 2.00 | - |
| Range | 0.25-2.00 | 0.50-2.00 | - | 0.25-32.0 | 0.50-2.00 | - |
| Griseofulvin | | | | | | |
| MIC (GM) | ^a 0.40 | 1.97 | - | 1.05 | 1.24 | - |
| MIC ₅₀ | 0.25 | 2.00 | - | 1.00 | 1.00 | - |
| MIC ₉₀ | 1.00 | 8.00 | - | 2.00 | 2.00 | - |
| Range | 0.12-1.00 | 0.25-8.00 | - | 0.12-2.00 | 0.12-2.00 | - |

Table 2 to be continued.

Continuation Table 2. *In vitro* minimum inhibitory concentration values of *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, and *Candida* spp. from patients with leprosy and controls.

| Antifungal drug µg/mL | Leprosy | | | Controls | | |
|--------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|
| | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. |
| Caspofungin | | | | | | |
| MEC (GM) | - | - | 2.32 | - | - | 3.47 |
| MEC ₅₀ | - | - | 1.50 | - | - | 4.00 |
| MEC ₉₀ | - | - | 8.00 | - | - | 8.00 |
| Range | - | - | 0.50-8.00 | - | - | 0.25-8.00 |

Note. Data was presented as geometric mean, median and range. Sample size: *T. interdigitale* (n=34); *T. rubrum* (n=23) and *Candida* spp. (n=23). Abbreviations: MIC, minimum inhibitory concentration; MEC, minimum effective concentration; GM, geometric mean. ^aLeprosy vs. controls (p<0.05).

Table 3. *In vitro* minimum fungicidal concentration values of *Trichophyton interdigitale*, *Trichophyton rubrum*, and *Candida* spp. from patients with leprosy and controls.

| Antifungal drug µg/mL | Leprosy | | | Controls | | |
|--------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|-------------------------|------------------|------------------------|
| | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. | <i>T. interdigitale</i> | <i>T. rubrum</i> | <i>Candida</i> spp. |
| Itraconazole | | | | | | |
| MFC (GM) | 6.45 | 13.8 | 9.99 | 2.14 | 12.8 | 12.6 |
| Range | 0.25->16.0 | 2.00->16.0 | 0.12->16.0 | 0.25->16.0 | 0.50->16.0 | 8.00->16.0 |
| Ketoconazole | | | | | | |
| MFC (GM) | 10.4 | 6.05 | 11.1 | 11.2 | 12.5 | 15.1 |
| Range | 2.00->16.0 | 0.03-16.0 | 2.00->16.0 | 2.00->16.0 | 1.00->16.0 | 8.00->16.0 |
| Fluconazole | | | | | | |
| MFC (GM) | 54.7 | 50.4 | 49.7 | 56.5 | 59.0 | 55.1 |
| Range | 2.00->64.0 | 8.00->64.0 | 0.00->64.0 | 0.00->64.0 | 32.0->64.0 | 16.0->64.0 |
| Posaconazole | | | | | | |
| MFC (GM) | 3.86 | 7.45 | 13.0 | 2.97 | 5.23 | 13.4 |
| Range | 0.12->16.0 | 0.50->16.0 | 1.00->16.0 | 0.12->16.0 | 1.00-16.0 | 1.00->16.0 |
| Voriconazole | | | | | | |
| MFC (GM) | 2.23 | 7.00 | 13.2 | 3.57 | 7.53 | 12.8 |
| Range | 0.25-8.00 | 0.50->16.0 | 2.00->16.0 | 0.25->16.0 | 2.00-16.0 | 2.00->16.0 |
| Terbinafine | | | | | | |
| MFC (GM) | 0.22 | 0.24 | - | 1.04 | 0.22 | - |
| Range | 0.0009->1.00 | 0.01->0.50 | - | 0.0009-16.0 | 0.06->0.50 | - |
| Ciclopirox | | | | | | |
| MFC (GM) | 9.89 | 10.0 | - | 13.9 | 7.84 | - |
| Range | 0.25->32.0 | 1.00->32.0 | - | 2.00->64.0 | 1.00-16.0 | - |
| Griseofulvin | | | | | | |
| MFC (GM) | ^a 9.83 | 3.45 | - | ^a 23.3 | 25.0 | - |
| Range | 0.25->64.0 | 0.50-8.00 | - | 0.12->64.0 | 2.00->64.0 | - |
| Caspofungin | | | | | | |
| MFC (GM) | - | - | 6.67 | - | - | 7.11 |
| Range | - | - | 4.00->8.00 | - | - | 4.00->8.00 |

Note. Data was presented as geometric mean and range. Sample size: *T. interdigitale* (n=34); *T. rubrum* (n=23) and *Candida* spp. (n=23). Abbreviations: MFC, minimum fungicidal concentration; GM, geometric mean. ^aLeprosy vs. controls (p<0.05)

The analysis of *Candida* spp. MIC values according to the clinical breakpoints defined in CLSI are included in Table 4.²³ In the leprosy group, eight isolates of the species were resistant to at least one of the antifungal agents, while in the control group only two. However, due to the small sample size, no statistically significant difference was found ($p=0.109$).

Table 4. Classification of *Candida* spp. isolates in the CLSI Interpretive Categories for three antifungal agents.

| Species (group) | Antifungal agent / MIC or MEC ($\mu\text{g/mL}$) / CLSI Interpretive Categories | | | | | |
|------------------------------|---|-----|--------------|----|-------------|---|
| | Fluconazole | | Voriconazole | | Caspofungin | |
| <i>C. guilliermondii</i> (L) | 4 | ND | 0,25 | ND | 4 | I |
| <i>C. guilliermondii</i> (L) | 32 | ND | 1 | ND | 1 | S |
| <i>C. guilliermondii</i> (C) | 16 | ND | 0,5 | ND | 4 | I |
| <i>C. guilliermondii</i> (C) | 4 | ND | 0,25 | ND | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (L) | 32 | R | 2 | R | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (L) | 0,5 | S | $\leq 0,03$ | S | 8 | R |
| <i>C. parapsilosis</i> (L) | 1 | S | 0,0312 | S | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (L) | 8 | R | 0,25 | I | 0,5 | S |
| <i>C. parapsilosis</i> (L) | 4 | SDD | 0,125 | I | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (C) | 1 | S | 0,0625 | S | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (C) | 2 | S | 0,125 | I | 4 | I |
| <i>C. parapsilosis</i> (C) | 0,5 | S | $\leq 0,03$ | S | 8 | R |
| <i>C. parapsilosis</i> (C) | 2 | S | 0,0625 | S | 4 | I |
| <i>C. tropicalis</i> (L) | 4 | SDD | 2 | R | 0,5 | I |
| <i>C. tropicalis</i> (L) | 8 | R | 1 | R | 0,5 | I |
| <i>C. tropicalis</i> (L) | 2 | S | 4 | R | 0,5 | I |
| <i>C. tropicalis</i> (C) | 0,5 | S | 0,0625 | S | 1 | R |

Note. MIC/MEC breakpoints according to CLSI supplement M60.²³

Abbreviations: L, Leprosy; C, control; MIC, minimum inhibitory concentration; MEC, minimum effective concentration; ND, not defined; S, susceptible; SDD, susceptible dose dependent; I, intermediate; R, resistant

The MIC and MFC values of the other species found in the study are summarized in Table 5. For these species, due to the small number of isolates, statistical tests were not performed.

1 **Table 5.** *In vitro* antifungal susceptibilities of ten fungal species isolated from patients with leprosy and controls.

| Species/n (group) | Antifungal drug, µg/mL | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|------------------------|-----|--------------|-------|-------------|-----|--------------|-----|--------------|-------|-------------|--------|------------|-----|--------------|-----|-------------|-----|
| | Itraconazole | | Ketoconazole | | Fluconazole | | Posaconazole | | Voriconazole | | Terbinafine | | Ciclopirox | | Griseofulvin | | Caspofungin | |
| | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MIC | MFC | MEC | MFC |
| <i>Acremonium brachyphenium</i> n= 1 (L) | >16 | >16 | 16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 1 | 16 | >0,5 | >0,5 | 8 | 16 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Acremonium exuviarum</i> n= 1 (L) | >16 | >16 | 8 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 2 | 2 | >0,5 | >0,5 | 0,5 | 0,5 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Arthrimum arundinis</i> n=1 (L) | >16 | >16 | 8 | >16 | >64 | >64 | 1 | >16 | 16 | >16 | 0,0312 | >0,5 | 8 | >32 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Epidermophyton floccosum</i> n=1 (L) | 0,5 | 1 | 0,0312 | 0,125 | 4 | 16 | 0,5 | 1 | ≤0,0312 | 0,125 | 0,0312 | 0,125 | 0,5 | >32 | 0,25 | 1 | - | - |
| <i>Fusarium foetens</i> n=1 (C) | >16 | >16 | >16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 8 | >16 | >0,5 | >0,5 | 16 | >64 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Fusarium keratoplasticum</i> n=3 (2 L, 1 C) | >16 | >16 | >16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 8 | >16 | >0,5 | >0,5 | 16 | >32 | >64 | >64 | - | - |
| | >16 | >16 | 16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | >16 | >16 | >0,5 | >0,5 | 32 | >32 | >64 | >64 | - | - |
| | >16 | >16 | >16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 16 | >16 | >0,5 | >0,5 | 64 | >64 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Fusarium oxysporum</i> n=1 (L) | >16 | >16 | >16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | 8 | >16 | >0,5 | >0,5 | >32 | >32 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Fusarium solani</i> n=1 (C) | >16 | >16 | >16 | >16 | >64 | >64 | >16 | >16 | >16 | >16 | >0,5 | >0,5 | 64 | >64 | >64 | >64 | - | - |
| <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> n=2 (C) | 1 | >16 | 0,5 | >16 | 64 | >64 | 4 | >16 | 4 | >16 | - | - | - | - | - | - | >8 | >8 |
| | 2 | >16 | 0,5 | >16 | 64 | >64 | 8 | >16 | 4 | >16 | - | - | - | - | - | - | >8 | >8 |
| <i>Trichophyton tonsurans</i> n=2 (C) | 0,0312 | >16 | 0,125 | 8 | 2 | 64 | 0,5 | 2 | 0,125 | 2 | 0,0625 | >0,5 | 2 | 32 | 1 | 32 | - | - |
| | 0,5 | 2 | 4 | ≥16 | ≥64 | >64 | 0,5 | 4 | 0,25 | 2 | 0,0625 | 0,0625 | 2 | 4 | 2 | 3 | - | - |

2 Abbreviations: L, leprosy; C, control; MIC, minimum inhibitory concentration; MEC, minimum effective concentration; MFC, minimum fungicidal concentration.,

Discussion

This was the first study to prospectively assess the prevalence of onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients, that are the two most frequent superficial mycoses.^{24,25} Half of leprosy patients had leprosy reaction at the time of sample collection, which are immunoinflammatory phenomena that lead to severe tissue and nerve damage.⁶ The treatment of leprosy reactions involve the use of prednisone,^{26,27} that leads to immunosuppression, which can increase the predisposition to mycoses. Furthermore, almost all (97,5%) of the patients had clinical multibacillary forms, which are more severe and have greater involvement of the skin and nerves.⁸ The greater involvement of the skin in the peripheral areas may explain why leprosy patients had more cases of *tinea pedis* compared to the control group ($p < 0.05$).

The most frequently reported cases of superficial mycoses in leprosy patients are onychomycosis, due to changes caused by leprosy in the nails,²⁸ mainly resulting from neuropathy, repeated trauma, vascular compromise, adverse drug effects and infections.²⁹ It is estimated that nail involvement is present in up to three out of four leprosy patients.³⁰ While some authors reported the presence of onychomycosis in 20 to 30% of leprosy patients, others found considerably lower percentages, around 5% or less,^{28,29} or even found no cases of onychomycosis.^{30,31} Some authors point out that, possibly, more cases would be detected with the performance of prospective studies with a larger number of patients.³² This was found in the present study, in which 25 (26,3%) of 95 leprosy patients had onychomycosis.

The main etiological agent found was *T. interdigitale*, followed by *T. rubrum*. *T. rubrum* is considered the most common dermatophyte worldwide, causing most cases of onychomycosis and *tinea pedis*.^{14,33-35} At the study site, although scarce, epidemiological data also point to the prevalence of this species.^{36,37} The prevalence of *T. interdigitale* found in the present study indicates a possible change in

the predominance of etiological agents of superficial mycoses, as is happening in the current epidemic of dermatophytosis in India.³⁸ However, more epidemiological studies are needed to confirm this change.

It is noteworthy the fact that no isolate of the species *C. albicans* was found, which is usually the main etiological agent of superficial mycoses among yeasts. The prevalent species was *C. parapsilosis*, which is the second most common etiologic agent.³⁹ The isolation of several non-*albicans* isolates is relevant, as these species, due to their varied antifungal susceptibility profile, can worsen the prognosis of infections.⁴⁰

The MIC values of *T. interdigitale* and *T. rubrum* were similar to those found in the literature, with terbinafine having the best antifungal activity *in vitro*.^{41,42} For the treatment of onychomycosis, the main topical antifungal agent used is ciclopirox olamine, while those for oral use are terbinafine and itraconazole.⁴³ Itraconazole in general has good antifungal activity against dermatophytes.⁴⁴ However, *T. interdigitale* isolates had high MIC values for this antifungal in the leprosy group ($p < 0.05$), suggesting that care should be taken when treating lesions caused by this species in leprosy patients.

For *Candida* yeasts, although no significant differences in susceptibility were found between the groups, the need for studies with a greater number of isolates is highlighted, as the antifungal resistance of these yeasts is a well-known and growing problem in medical mycology.^{45,46} Fluconazole is the most used antifungal agent in the treatment of *Candida* infections, and its indiscriminate use is one of the factors responsible for the emergence of resistant isolates.⁴⁷ In the present study, two isolates of *C. parapsilosis* and one isolate of *C. tropicalis* of the leprosy group were resistant to fluconazole.

The non-dermatophyte filamentous fungi presented, in general, high MIC values, above the concentration range tested for the antifungal agents. There is no standard for treatment and, although they sometimes respond well to systemic use of itraconazole and terbinafine, this response is varied, and recalcitrant cases are reported.^{48,49} Despite having been isolated less frequently, the possibility of

treatment failures when NDFFs are the etiologic agents is an important factor to be considered, especially in patients with comorbidities.

In addition to MIC, the MFC values were also determined, defined as the lowest concentration of antifungal capable of killing at least 99.9% of the final inoculum, present in wells that did not show fungal growth in the test for determination of MICs.⁵⁰ MFC has been evaluated in several studies,⁵¹⁻⁵³ as its result is particularly important in the case of immunosuppressed patients, whose immune systems may be inefficient in eliminating fungal cells remaining after treatment. It is observed that MFC values were much higher than MIC values, showing that the dose of antifungal needed to kill fungal cells is high for most species analyzed. The incomplete eradication of the fungus is one of the factors that lead to cases of recurrent infections, a very common event in onychomycosis, affecting 10 to 53% of patients.^{54,55} However, recurrent cases were not analyzed in the present study.

Conclusion

This study described the occurrence of onychomycosis and *tinea pedis* in leprosy patients. These patients had more cases of *tinea pedis* than the control group, and special attention should be paid to lesions present in this part of the body. The proportion of dermatophytes, yeasts and NDFFs was similar in both groups, as was the prevalence of the species *T. interdigitale*. The antifungal susceptibility profile did not show great variations in the leprosy group in relation to the control group, highlighting, however, the lower susceptibility of *T. interdigitale* isolates from the first group to itraconazole. Special attention should also be given to cases caused by NDFFs, which have high MIC values for most antifungal agents. Future studies, with larger numbers of patients and fungal isolates, are needed to allow further conclusions about the prevalence and antifungal susceptibility, especially of NDFFs and yeasts. Additionally, further studies correlating *in vitro* antifungal susceptibility with *in vivo* treatment responses are important to determine the clinical significance of these findings.

References

1. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 2004; 363(9416):1209–1219.
2. Foss NT, Motta ACF. Leprosy, a neglected disease that causes a wide variety of clinical conditions in tropical countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012; 107(suppl 1):28–33.
3. Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017; 15(8):801–827.
4. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol*. 2014; 89(2):205–218.
5. Maymone MBC, Laughter M, Venkatesh S, et al. Leprosy: Clinical aspects and diagnostic techniques. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 83(1):1–14.
6. Alemu Belachew W, Naafs B. Position statement: Leprosy: Diagnosis, treatment and follow-up. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019; 33(7):1205–1213.
7. Gaschignard J, Grant AV, Thuc N Van, et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(5):e0004345.
8. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol*. 2015; 33(1):26–37.
9. Smith CS, Aerts A, Saunderson P, et al. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. *Lancet Infect Dis*. 2017; 17(9):e293–7.
10. Lockwood DN, Saunderson PR. Nerve damage in leprosy: A continuing challenge to scientists, clinicians and service providers. *Int Health*. 2012; 4(2):77–85.
11. Scollard DM, Stryjewska BM, Prestigiacomo JF, et al. Hansen's disease (leprosy) complicated by secondary mycobacterial infection. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 64(3):593–596.
12. Da Fraga CMM, de Cássia Birschiner R, Naseri AP, et al. Influence of systemic corticotherapy on the triggering of pityriasis versicolor. *Mycoses*. 2014; 57(9):565–571.
13. dos Santos PM, de Melo CM, Rebouças Martins SA, et al. Study of ocular fungal microbiota in patients with Hansen's disease and in individuals who deal with them. *Arq Bras Oftalmol*. 2006; 69(6):915–918.
14. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2009; 52(1):95.

15. Verma SB, Panda S, Nenoff P, et al. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: III. Antifungal resistance and treatment options. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2021; 87(4):468.
16. Hoenigl M, Sprute R, Egger M, al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs.* 2021; 81(15):1703-1729.
17. Whaley SG, Berkow EL, Rybak JM, et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* Species. *Front Microbiol.* 2017; 7:2173.
18. Schauwvlieghe AFAD, de Jonge N, van Dijk K, et al. The diagnosis and treatment of invasive aspergillosis in Dutch haematology units facing a rapidly increasing prevalence of azole-resistance. A nationwide survey and rationale for the DB-MSG 002 study protocol. *Mycoses.* 2018; 61(9):656–664.
19. Gupta AK, Renaud HJ, Quinlan EM, et al. The Growing Problem of Antifungal Resistance in Onychomycosis and Other Superficial Mycoses. *Am J Clin Dermatol.* 2021; 22(2):149–157.
20. Rodrigues FT, Cardozo MRP, Da Costa Nery JA. Images in clinical tropical medicine: Widespread dermatophytosis in a patient treated for leprosy type II reactional state after MDT/WHO-MB release. *Am J Trop Med Hyg.* 2018; 99(4):813–814.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017.
23. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 1st ed. CLSI supplement M60. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017.
24. Gupta AK, Stec N, Summerbell RC, et al. Onychomycosis: a review. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2020; 34(9):1972–1990.
25. Nowicka D, Nawrot U. *Tinea pedis*-An embarrassing problem for health and beauty-A narrative review. *Mycoses.* 2021; 64(10):1140–1150.
26. Virmond M, Grzybowski A, Virmond L. Leprosy: A glossary. *Clin Dermatol.* 2015; 33(1):8–18.

27. Voorend CGN, Post EB. A Systematic Review on the Epidemiological Data of Erythema Nodosum Leprosum, a Type 2 Leprosy Reaction. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(10):e2440.
28. Kaur I, Chakrabarti A, Dogra S, et al. Nail Involvement in Leprosy: A Study of 300 Patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2003; 71(4):320–327.
29. Rajput CD, Nikam BP, Gore SB, et al. Nail Changes in Leprosy: An Observational Study of 125 Patients. *Indian Dermatol Online J*. 2020; 11(2):195–201.
30. Ramos JM, Reyes F, Belinchón I. Nail Changes in Recent And Old Leprosy Patients. *EMJ Dermatol*. 2013; 1(1):44–52.
31. El Darouti MA, Hussein S, Al Tahlawy SR, et al. Clinical study of nail changes in leprosy and comparison with nail changes in diabetic patients. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2011; 25(3):290–295.
32. Belinchón Romero I, Ramos Rincón JM, Reyes Rabell F. Nail involvement in leprosy. *Actas Dermosifiliogr*. 2012; 103(4):276–284.
33. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, et al. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2014; 12(3):188–210.
34. Leung AKC, Lam JM, Leong KF, et al. Onychomycosis: An Updated Review. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2020; 14(1):32–45.
35. Ilkit M, Durdu M. *Tinea pedis*: the etiology and global epidemiology of a common fungal infection. *Crit Rev Microbiol*. 2015; 41(3):374–388.
36. Aquino VR, Constante CC, Bakos L. Frequência das dermatofitoses em exames micológicos em Hospital Geral de Porto Alegre, Brasil. *An Bras Dermatol*. 2007; 82(3):239–244.
37. Heidrich D, Garcia MR, Stopiglia CDO, et al. Dermatophytosis: A 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015; 9(8):865–871.
38. Nenoff P, Verma SB, Uhrlaß S, et al. A clarion call for preventing taxonomical errors of dermatophytes using the example of the novel *Trichophyton mentagrophytes* genotype VIII uniformly isolated in the Indian epidemic of superficial dermatophytosis. *Mycoses*. 2019; 62(1):6–10.
39. Barbedo LS, Sgarbi DB. Candidíase. *DST - J Bras Doenças Sex Transm*. 2010; 22(1):22–38.
40. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. *Candida* Onychomycosis: an Old Problem in Modern Times. *Curr Fungal Infect Rep*. 2020; 14(3):209–216.

41. Falahati M, Fateh R, Nasiri A, et al. Specific identification and antifungal susceptibility pattern of clinically important dermatophyte species isolated from patients with dermatophytosis in Tehran, Iran. *Arch Clin Infect Dis*. 2018; 13(3):e63104.
42. Ansari S, Hedayati MT, Zomorodian K, et al. Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. *Mycopathologia*. 2016; 181(1-2):89-95.
43. Hassan N, Dhamija P, Bharti V, et al. Clinical tools for successful treatment of onychomycosis: a narrative review. *Drugs Ther Perspect*. 2020; 36(6):236–242.
44. Özcan D, Şekin D, Demirbilek M. In vitro antifungal susceptibility of dermatophyte strains causing *tinea pedis* and onychomycosis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A case-control study. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2010; 24(12):1442–1446.
45. Halliday CL, Slavin MA, Chen SC-A. Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* and *Cryptococcus* Species and Mechanisms of Resistance: Implications for Clinical Laboratories. *Curr Fungal Infect Rep*. 2017; 11(3):124–133.
46. Espinel-Ingroff A, Cantón E, Pemán J. Antifungal Resistance among Less Prevalent *Candida Non-albicans* and Other Yeasts versus Established and under Development Agents: A Literature Review. *J Fungi (Basel, Switzerland)*. 2021; 7(1):24.
47. Mello VG, Escudeiro H, Weckwerth ACVB, et al. Virulence Factors and Antifungal Susceptibility in *Candida* Species Isolated from Dermatomyces Patients. *Mycopathologia*. 2021; 186(1):71–80.
48. Gupta AK, Venkataraman M, Renaud HJ, et al. A Paradigm Shift in the Treatment and Management of Onychomycosis. *Skin Appendage Disord*. 2021; 7(5):351-358.
49. Gupta AK, Drummond-Main C, Cooper EA, et al. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 66(3):494–502.
50. Cantón E, Espinel-Ingroff A, Pemán J. Trends in antifungal susceptibility testing using CLSI reference and commercial methods. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009; 7(1):107–119.
51. Ghannoum M, Isham N, Verma A, et al. In vitro antifungal activity of naftifine hydrochloride against dermatophytes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(9):4369–72.
52. Mattei AS, Alves SH, Mario DA, et al. Susceptibility of *Candida albicans* blood isolates to 3 antifungal drugs: Retrospective study in rio grande do sul, brazil, 1999–2009. *Rev Iberoam Micol*. 2013; 30(4):243–247.

53. Torres J, Romero H. Actividad antifúngica in vitro del ajoeno en cinco aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*. *Rev Iberoam Micol.* 2012; 29(1):24–28.
54. Gupta AK, Elewski BE, Rosen T, et al. Onychomycosis: Strategies to Minimize Recurrence. *J Drugs Dermatol.* 2016; 15(3):279-282.
55. Tosti A, Piraccini BM, Stinchi C, et al. Relapses of onychomycosis after successful treatment with systemic antifungals: a three-year follow-up. *Dermatology.* 1998; 197(2):162-1

ARTIGO 2

Artigo publicado na revista Medical Mycology Case Reports.

<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2020.09.001>

Onychomycosis caused by *Arthrinium arundinis* in leprosy patient: Case report

Rodrigo Vettorato^{a,b}, Daiane Heidrich^{a,c}, Letícia Maria Eidt^d, Danielle Machado Pagani^e, Amanda Carvalho Ribeiro^f, Priscila Dallé da Rosa^a, Gerson Vettorato^b, Taís Guarienti Amaro^b, Maria Lúcia Scroferneker^{a,f,*}

^a Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2nd floor, Porto Alegre, CEP: 90035-003, Brazil.

^b Dermatology Service of Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Rua Professor Annes Dias - 135, Porto Alegre, CEP: 90020-090, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) and Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), University of Vale do Taquari - Univates, Avenida Avelino Tallini 171, CEP 95914-014, Lajeado, RS, Brazil.

^d Ambulatory of Sanitary Dermatology of Porto Alegre. Av. João Pessoa, 1327 - Porto Alegre, CEP: 90040-001, Brazil.

^e Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500 - 210, Porto Alegre, CEP: 90050170, Brazil.

^f Department of Microbiology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brazil.

* Corresponding author. Microbiology Department, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Room, 325, Porto Alegre, CEP: 90050-170, Brazil. E-mail address: scrofern@ufrgs.br (M.L. Scroferneker).

Abstract

We report a case of a 56-year-old Brazilian woman, with relapsing lepromatous leprosy, and onychomycosis caused by a non-dermatophyte filamentous fungi. The pathogenic fungi was identified as *Arthrinium arundinis* and treated with chemical abrasion of the nail with 40% urea and application of terbinafine cream. Onychomycosis caused by *Arthrinium* species is rare, and this is the second reported case.

1 Introduction

Onychomycoses are fungal infections of the nail plate. Commonly caused by dermatophytes, but also by yeasts and non-dermatophyte filamentous fungi (NDFF) [1]. Most NDFF do not have keratinophilic activity, it is a secondary invader of previously traumatized or damaged nails [2].

The NDFF most often described causing onychomycosis are *Scopulariopsis brevicaulis*, *Fusarium* sp., *Acremonium* sp., *Aspergillus* sp., *Scitallidium* sp., and *Scedosporium* sp. [3,4,5]. This species are usually resistant to conventional onychomycosis treatments [6,2,4]. The genus *Arthrinium* comprises a group of NDFF, most of the species are endophytes of several plants[7]. Only one case of onychomycosis has been identified as caused by *Arthrinium arundinis* species [7]. The aim of this case is to report onychomycosis caused by *Arthrinium arundinis* in a lepromatous leprosy patient in Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2 Case Presentation

A 56 years-old female patient with relapsing lepromatous leprosy in polychemotherapy, bilateral cataract, visual deficit, hypertension, lupus, diabetes mellitus, osteoporosis, scleroderma, and renal failure in first readministration of multidrug therapy (day 0). Multidrug therapy consisted in rifampicin, clofazimine and ofloxacin because of anemia. Currently, the patient has being treated with thalidomide and amitriptyline because of leprous nodular erythema and neurophaty. The patient was attended in the Ambulatório de Dermatologia Sanitária (ADS) in Porto Alegre. A mycological exam was performed after clinical observation of total toenails dystrophy in the left foot, suggesting onychomycosis (Figure 1A). Direct examination of the nail scrapings showed hyaline septate hyphae, and branching at acute angles (Figure 1B). The treatment was started immediately with chemical abrasion with a 40% urea solution on the nail plate. On day 14, in Mycosel® agar, white and flat colonies (Figure 1C) was observed after incubation in 25°C and no growth was observed at 37°C. The microculture in potato dextrose agar was performed from the grown colony, incubated for seven days at 25°C and on day 21, pale-brown single-celled conidia with a clear brightly opalescent equatorial ring was observed. Conidia were sympodially generated and large cluster-aggregated conidiogenous cells suggesting *Arthrinium* sp. (Figure 1D). A second and a third collection of nail material was performed on day 30 and day 60, cultivated in Sabouraud dextrose agar for seven days at 25°C. The results confirmed the genus as the cause of the onychomycosis. For species identification of the first culture, the sequencing of Internal Transcribed Spacer (ITS) of rDNA using primers ITS 5 and 4 and part of the Translation Elongation Factor 1-alpha (TEF1- α) gene using

primers EF1-728F and EF-2 were performed and compared against the GenBank database using the BLAST algorithm (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). These sequences showed 99.47% identity and 100% of coverage with strain *Arthrinium arundinis* CBS 106.12 and their number access are MK539828 and MT622850 for each region, respectively. Eleven clinical antifungals (Sigma-Aldrich, USA) were evaluating according to the protocol M38-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), using the microdilution technique and the inoculum was standardized to 2×10^4 CFU/mL in test [8], which was performed in triplicate.

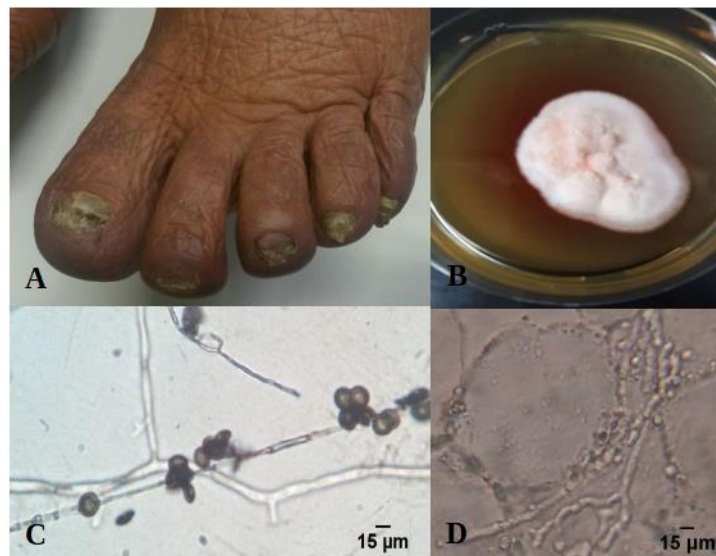


Figure 1. Onychomycosis caused by *Arthrinium aurundinis* in leprosy patient (A); *Arthrinium arundinis* colony in Sabouraud agar plate after 7 days (B); Microcultive in potato dextrose agar at 25 °C for 7 days 400x (C); Direct mycological examination 400x(D).

The caspofungin minimal effective concentration (MEC) was evaluated, and for the other antifungals, the minimal inhibitory concentrations (MICs) was considered when no grow was visually observed. Excepting terbinafine, amphotericin B and posaconazole, the isolate had higher MICs and MEC for all other antifungals (Table 1). We decided for a conservative treatment with chemical abrasion, instructing the patient to gently sand the altered areas of the nails, and apply a 40% urea solution on the nail plate, once a week, associated with the continuous use of terbinafine 1% cream. We follow the patient monthly showing slight improvements in 3 months of treatment.

Table 1. Antifungal evaluation of *Arthrinium arundinis* that caused onychomycosis in a leprosy patient.

| Antifungal | Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) and Minimal Effective Concentration (MEC)* (µg/mL) |
|--------------------|---|
| Terbinafine | 0.0312 |
| Amphotericin B | 0.5 |
| Posaconazole | 1 |
| Ketoconazole | 8 |
| Cyclopirox Olamine | 8 |
| Tioconazole | 16 |
| Voriconazole | 16 |
| Itraconazole | > 16 |
| Caspofungin* | > 16 |
| Fluconazole | > 64 |
| Griseofulvin | > 64 |

*MEC evaluation. For other antifungals, MIC was considered when no grow was visually observed.

3 Discussion

Onychomycosis is the most common nail disease and has a prevalence of 5.5% in the world population [1]. Around 60% to 70% of these infections can be caused by dermatophyte fungi. Yeasts are responsible for 10% to 20% of cases, and the NDFF represent 10% to 20% of fungal nail infections [1,4]. Some NDFF can cause nail infections directly, others can secondarily infect nails with minor trauma, but often these fungi are only local contaminants [2].

The genus *Arthrinium* (family Apiosporaceae) comprises a group of NDFF, geographically widely distributed, commonly saprobes, but also parasites of a large number of plant species [9,10]. Until now, 70 species of *Arthrinium* fungi have been reported and they are, generally, not implicated in human or animal disease [10]. However, two skin infection cases in humans caused by *Arthrinium phaeospermum* [11,12] and one case of onychomycosis caused by *A. arundinis* have already been described [7].

Pardo-Castello and Pardo [13] observed the presence of onychomycosis in 20% to 30% of leprosy patients. Leprosy patients tend to have nail changes and onychomycosis more frequently than the general population, mainly due to the frequent trauma resulting from peripheral neural

impairment caused by *Mycobacterium leprae* during its infectious process [14], which may favor the infection of NDFF.

The laboratory diagnosis of NDFF onychomycosis is not simple, and there is no standard criterion for the diagnosis. In the present case, to reduce the chances of NDFF being a contaminant, the following criteria were used: the identification of irregular hyphae in the direct mycological examination of the nail scraping of three consecutive collections with intervals of one month between each one; obtaining three positive cultures on Sabouraud dextrose agar in the three different collections; and the failure to obtain dermatophyte fungi isolation in cultures of the same nail material on Mycosel® agar [4,2]. For species identification, it was performed the sequencing of ITS and TEF1- α fungus genes [7, 15].

Non-dermatophyte fungi usually present less susceptible profiles to antifungal than dermatophytes. There is no standard treatment protocol described for NDFF onychomycosis. Gupta et al. [4] described efficient treatments using oral terbinafine or itraconazole for *Scopulariopsis brevicaulis* and *Aspergillus* species. The efficacy in the topical use of terbinafine, after chemical avulsion, is known in 2 cases of onychomycosis caused by *Acremonium* species [4]. Pulsed terbinafine promoted complete cure in 30 of 34 cases of *Aspergillus* onychomycosis according to Gupta et al. [4]. Regarding *Scopulariopsis* species, 24 out of 32 cases were successfully treated with pulsed itraconazole, where 12 out of 14 cases improved with daily use of terbinafine 250 mg.

Tosti et al. [16], reported 59 cases of NDFF onychomycosis. The authors obtained better results when using topical treatments compared to systemic treatments. Sixteen patients with onychomycosis caused by *S. brevicaulis* were treated with ciclopirox 8% nail lacquer or topical terbinafine (for 8-12 months) after nail avulsion, and 11 patients were successful healed.

The first reported case of *A. arundinis* as causing onychomycosis was resistant to fluconazole and caspofungin, and susceptible to itraconazole, voriconazole and posaconazole [7]. However, in the present case, the isolate was susceptible to amphotericin B and was not susceptible to itraconazole, results contrary to those obtained by the first published case report. Thus, evaluations of superficial mycoses, identification and antifungal susceptibility testing are important to guide management [1-5].

The first reported case of onychomycosis caused by *A. arundinis* was successfully carried out in the treatment with pulsed itraconazole [7]. However, in our case, the isolated fungus from the leprosy patient showed a MIC higher than 16 $\mu\text{g/mL}$, which classifies our isolate as resistant to this drug. The low terbinafine MIC obtained in vitro suggested the use of this drug for the onychomycosis treatment. The oral terbinafine administration in this patient was not adequate due the presented comorbidities. The use of this drug systemically could worsen anemia and visual impairment, in

addition to the possible drug interaction with the medication administered to the patient for the treatment of his comorbidities. Due to the reported factors, we chose a conservative topical terbinafine treatment twice a day, and monthly clinical follow-up. We plan to maintain exclusively topical treatment until the end of leprosy treatment in approximately 6 months, if no improvement is obtained, we will start a monitored oral terbinafine treatment.

4 Acknowledgements

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) Danielle Machado Pagani - CAPES1693871) for the scholarships.

5 Conflict of Interest

There are none.

6 References

1. S.R. Lipner, R.K. Scher. Onychomycosis: Clinical overview and diagnosis. *J Am. Acad. Dermatol.* 80 (2019)835-851. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.03.062>
2. M.R. Straten, M.M. Balkis, M.A. Ghannoum. The role of nondermatophyte molds in onychomycosis: diagnosis and treatment. *Dermatol. Ther.* 15 (2002) 89-98. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8019.2002.01522.x>
3. E.O. Martinez-Herrera, S. Arroyo-Camarena, D.L. Tejeda-Garcia, C.F. Porras-Lopez, R. Arenas. Onychomycosis due to opportunistic molds. *An. Bras. Dermatol.* 90 (2015) 334-337. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153521>
4. A.K. Gupta, C. Drummond-Main, E.A. Cooper, W. Brintnell, B.M. Piraccini, A. Tosti. Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 66 (2011) 494-502. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2011.02.038>

5. A. Shemer, B. Davidovici, M.H. Grunwald, H. Trau, B. Amichai. New criteria for the laboratory diagnosis of nondermatophyte moulds in onychomycosis. *Br. J. Dermatol.* 160 (2009) 37-39. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08805.x>.
6. S.R. Lipner, R.K. Scher. Onychomycosis Treatment and prevention of recurrence. *J. Am. Acad. Dermatol.* 80 (2019) 853-867. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.05.1260>
7. M. Dylağ, A. Hryniewicz-Gwózdź, T. Jagielski. Onychomycosis due to *Arthrinium arundinis*: a case report. *Acta Derm Venereol* 97 (2017) 860-861. doi: <https://doi.org/10.2340/00015555-2673>
8. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, 2nd edn. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Approved Standard M38-A2.
9. P.W. Crous, J.Z. Groenewald. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA fungus.* 4 (2013) 133–154. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.13>
10. M. Wang, X.-M. Tan, F. Liu, L. Cai. Eight new *Arthrinium* species from China. *MycKeys.* 34 (2018) 1–24. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.34.24221>
11. M.K. Rai. Mycosis in man due to *Arthrinium phaeospermum* var. *indicum*. First case report. *Mycoses.* 32 (1989) 472-475. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02285.x>
12. Y.M. Zhao, C.R. Deng, X. Chen. *Arthrinium phaeospermum* causing dermatomycosis, a new record of China. *Acta Mycol. Sin.* 9 (1990) 232–235. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.34.24221>
13. V. Pardo-Castell, O.A. Pardo. *Disease of the Nails*, 3rd ed., Charles C Thomas Publishers , Springfield, 1960.
14. I.B. Romero, J.M.R. Rincón, F.R. Rabell. Nail involvement in leprosy. *Acta Dermosifiliogr.* 103 (2012) 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2011.07.011>

15. S. Greven, F. Egberts, M. Buchner, V. Beck-Jendroschek, K. Voss, J. Brasch. Cutaneous chromomycosis caused by *Arthrimum arundinis*. J. Dtsch Dermatol. Ges. 16 (2018) 621-623. <https://doi.org/10.1111/ddg.13507>
16. A. Tosti, B.M. Piraccini, S. Lorenzi. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. J. Am. Acad. Dermatol. 42 (2000) 217–24. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(00\)90129-4](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(00)90129-4)

ARTIGO 3

*Artigo publicado na revista Journal of Medical
Mycology.*

<https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2021.101201>

Molecular identification and antifungal susceptibility of 75 clinical isolates of *Trichophyton* spp. from southern Brazil

Alessandra Koehler¹, Amanda Carvalho Ribeiro², Danielle Machado Pagani³, Rodrigo Vettorato¹, Cibele Massotti Magagnin¹, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia¹, Daiane Heidrich¹, Maria Lúcia Scroferneker^{1,4}

¹ Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos, 2400 - CEP: 90035-003, Porto Alegre - RS, Brasil.

² Graduate Program in Pharmacy Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Avenida Ipiranga, 2752 – CEP: 90610-000, Porto Alegre – RS, Brasil.

³ Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology, Universidade do Rio Grande do Sul. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500 – CEP 90050-170, Porto Alegre – RS, Brasil.

⁴ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Sarmiento Leite, 500 - CEP 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil.

Corresponding author: Maria Lúcia Scroferneker, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, sala 325, CEP: 90050-170, Porto Alegre - RS, Brasil. Tel. (+55) 51-33083934 Fax. (+55) 51-33083121 (e-mail: scrofern@ufrgs.br).

ABSTRACT

Background: Dermatophytoses affect more than 20% of the world's population and is caused by filamentous fungi, mainly of the genus *Trichophyton*. The species identification through microscopic direct examination and culture methods is challenging, with molecular presenting high sensitivity and specificity. Although there are several therapy options for dermatophyte infections, treatment failures and antifungal resistance are growing concerns.

Objective: This study aimed to identify clinical isolates of *Trichophyton* spp. from southern Brazil using molecular methods and determine their *in-vitro* antifungal susceptibility.

Material and Methods: Seventy-five isolates were identified through sequencing of the ITS region. The exposure to seven antifungals drugs was performed according to protocol M28-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

Results: Sixty-one isolates (81%) were identified as *T. interdigitale*, which differs from the epidemiological data present in the literature. Thirteen isolates were identified as *T. rubrum* and one as *T. tonsurans*. Terbinafine was the most effective antifungal, followed by itraconazole and voriconazole, which is in accordance with the results reported in previous studies.

Conclusions: The use of molecular methods to identify *Trichophyton* spp. clinical isolates and the performance of susceptibility tests are relevant to epidemiological data, identification of the emergence of antifungal resistance, and to help to translate the *in-vitro* antifungal susceptibility results into clinical practice.

Keywords: dermatophytoses; *Trichophyton*; molecular identification; antifungal susceptibility

1. INTRODUCTION

Dermatophytes are a group of filamentous fungi that causes dermatophytoses, one of the most common types of skin diseases in the world. These fungi infect tissues and produce keratinolytic enzymes such as hydrolases and keratinases, causing superficial infections in the nails, hair, and skin. It is estimated that dermatophytoses affect more than 20% of the world's population, and probably this incidence is underestimated [1,2]. In immunosuppressed patients and those with specific genetic predispositions, such as *CARD9* mutations [3], dermatophytoses can become invasive and life-threatening [4].

Dermatophyte fungi are distributed in the genera *Epidermophyton*, *Trichophyton*, and *Microsporum*. One of the most common is the genus *Trichophyton*, with the worldwide prevalent species *T. rubrum* [5,6]. Humans can acquire these fungi from another person, animals, soil, or contaminated objects [7]. Dermatophytoses are called tinea, depending on the location of the lesions, and may be tinea corporis (trunk, arms, and legs), tinea capitis (scalp), or tinea pedis (foot). Onychomycoses caused by filamentous fungi, with lesions affecting the nails, are the most common nail disorder among adults [2].

Diagnosis is based on microscopic and culture methods for the detection and identification of the pathogen [5]. These conventional methods have certain disadvantages such as the low specificity and the long culture time (4 to 6 weeks). Such difficulties can be avoided by the use of molecular tools, which are faster, more sensitive, and specific. Techniques like conventional polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR (qPCR), nested PCR, multiplex PCR, and PCR-ELISA can be used for the diagnosis and to differentiate species, which is essential for accurate epidemiological data and adequate treatment [8,9]. Proteomic analyzes using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) have also been successfully used for fast and accurate identification of filamentous fungi and yeasts [10].

In spite of the wide variety of systemic and topical treatments for dermatophyte infections, the available antifungals belong to only a few chemical classes and most have similar mechanisms of action in the ergosterol biosynthetic pathway. Also, the efficacy of the treatment varies, with relapse rates as high as 30% [11,12]. Antifungal resistance of dermatophytes is an emerging concern, with several reports of recalcitrant cases of dermatophytosis and terbinafine- and azole-resistant *Trichophyton* isolates [13-15]. In this scenario, the *in-vitro* antifungal susceptibility tests are important, mainly for chronic or recurrent dermatophytoses and to increase understanding of the worrisome question of antifungal resistance [16].

In this study, we identified clinical isolates of *Trichophyton* spp. from southern Brazil, using molecular methods, and determined their *in-vitro* antifungal susceptibility.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Clinical isolates

Seventy-five clinical isolates from the municipality of Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul, Brazil, were obtained from the fungi collection of the Laboratory of Pathogenic Fungi, Department of Microbiology, Institute of Basic Health Sciences (Universidade Federal do Rio Grande do Sul). All isolates were obtained from cases of onychomycosis and were previously identified as *T. mentagrophytes* based on their morphological characteristics under direct microscopic examination by light microscopy.

2.2 Molecular identification

The total genomic DNA of the strains was extracted with the Power Soil® DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA) and the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region was sequenced using ITS1 and ITS4 primers. The steps for polymerase chain reaction (PCR) conditions were: initial denaturation at

94 °C for 5 min, 35 denaturation cycles at 94 °C for 15 s, annealing at 55 °C for 45 s, extension at 72 °C for 90 s, and final extension at 72 °C for 6 min. The PCR product was purified with ExoSAP-IT™ (Affymetrix, USA) and sequenced on the ABI-PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequences were assembled and compared to the sequences reported in GenBank, using the basic algorithm of the local alignment search tool (BLAST), and then submitted to GenBank.

2.3 *In-vitro* antifungal susceptibility

The susceptibility assay was performed according to the M38-A2 protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [17], by the microdilution technique. Seven commercially available antifungal agents were tested: ciclopirox olamine (Aventis, Dermik Laboratories, Berwyn, PA, USA), fluconazole (Pfizer Inc., USA), griseofulvin (Schering-Plough, Brazil), itraconazole (Jansen-Cilag Farmacêutica Ltda., Brazil), ketoconazole (Bayer, Spain), terbinafine (Novartis Research Institute, Austria), and voriconazole (Pfizer Inc., USA). All experiments were performed in triplicate, with *Candida parapsilosis* ATCC 22019 and *C. krusei* ATCC 6258 used as methodological controls.

The minimum inhibitory concentration (MIC) was read and then the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined. A 50 µL aliquot of each well in which no growth was observed was transferred to test tubes containing 800 µL of Sabouraud Dextrose Broth (HiMedia Laboratories, Mumbai, India) and incubated for ten days at 30 °C for visual observation of growth. MFC was defined as the minimum concentration at which no fungal growth occurred. These tests were performed in duplicate.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Morphological identification of dermatophyte species is frequent in clinical practice. However, morphology-based identification can be uncertain due to the variations among isolates and the similar characters in different species, and may give false-negative results [2,18]. The high prevalence of dermatophytoses, the close relationship among species, and the increase in antifungal resistance [11,20] necessitate the use of molecular tools for accurate species identification. Here, through sequencing of the ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region, 61 strains were identified as *T. interdigitale* (81.4%), 13 as *T. rubrum* (17.3%), and one as *T. tonsurans* (1.3%) (Table 1). The prior morphology-based identification of all these isolates as *T. mentagrophytes* emphasizes the importance of molecular identification.

1 **Table 1.** Isolates analyzed in the study and their GenBank® accession numbers.

| Strain identification | GenBank® accession number | Strain identification | GenBank® accession number | Strain identification | GenBank® accession number |
|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>T. interdigitale</i> 69096 | MZ044443 | <i>T. interdigitale</i> 73673 | MZ044468 | <i>T. interdigitale</i> 1154IPD | MZ044427 |
| <i>T. interdigitale</i> 69112 | MZ044444 | <i>T. interdigitale</i> 115002Pt | MZ044414 | <i>T. interdigitale</i> 681Pt | MZ044439 |
| <i>T. interdigitale</i> 69392 | MZ044445 | <i>T. interdigitale</i> 115006 | MZ044415 | <i>T. interdigitale</i> 1000D | MZ044440 |
| <i>T. interdigitale</i> 69588 | MZ044446 | <i>T. interdigitale</i> 115021UHE | MZ044441 | <i>T. interdigitale</i> 742 | MZ044426 |
| <i>T. interdigitale</i> 69732 | MZ044447 | <i>T. interdigitale</i> 115063Pt | MZ044416 | <i>T. interdigitale</i> 1304 | MZ044428 |
| <i>T. interdigitale</i> 69784 | MZ044447 | <i>T. interdigitale</i> 115123 | MZ044418 | <i>T. interdigitale</i> 1306 | MZ044429 |
| <i>T. interdigitale</i> 69793 | MZ044449 | <i>T. interdigitale</i> 115170 | MZ044419 | <i>T. interdigitale</i> 1280UPDrec | MZ044470 |
| <i>T. interdigitale</i> 69794 | MZ044450 | <i>T. interdigitale</i> 119812 | MZ044471 | <i>T. interdigitale</i> 819 | MZ044433 |
| <i>T. interdigitale</i> 69809 | MZ044451 | <i>T. interdigitale</i> 119826 | MZ044420 | <i>T. interdigitale</i> 1405A | MZ044431 |
| <i>T. interdigitale</i> 69829 | MZ044452 | <i>T. interdigitale</i> 119873UP | MZ044421 | <i>T. interdigitale</i> 1423 | MZ044432 |
| <i>T. interdigitale</i> 71121 | MZ044453 | <i>T. interdigitale</i> 119878UP | MZ044422 | <i>T. interdigitale</i> 114937 | MZ044413 |
| <i>T. interdigitale</i> 71213 | MZ044454 | <i>T. interdigitale</i> 119956 | MZ044423 | <i>T. rubrum</i> 114938 | MZ044791 |
| <i>T. interdigitale</i> 73535 | MZ044455 | <i>T. interdigitale</i> 119997 | MZ044473 | <i>T. rubrum</i> 114940 | MZ044792 |
| <i>T. interdigitale</i> 73550 | MZ044456 | <i>T. interdigitale</i> 120026 | MZ044424 | <i>T. rubrum</i> 114972 | MZ044793 |
| <i>T. interdigitale</i> 73653 | MZ044457 | <i>T. interdigitale</i> CMJ | MZ044425 | <i>T. rubrum</i> 114980 | MZ044794 |
| <i>T. interdigitale</i> 73691 | MZ044458 | <i>T. interdigitale</i> 115179 | MZ044430 | <i>T. rubrum</i> 114987 | MZ044789 |
| <i>T. interdigitale</i> 73706 | MZ044459 | <i>T. interdigitale</i> 115021CD | MZ044442 | <i>T. rubrum</i> 115004UP | MZ044798 |
| <i>T. interdigitale</i> 73727 | MZ044460 | <i>T. interdigitale</i> 1177 | MZ044434 | <i>T. rubrum</i> 115016UM | MZ044795 |
| <i>T. interdigitale</i> 73814 | MZ044461 | <i>T. interdigitale</i> 929 | MZ044435 | <i>T. rubrum</i> 115078 | MZ044787 |
| <i>T. interdigitale</i> 73826 | MZ044462 | <i>T. interdigitale</i> 401 | MZ044436 | <i>T. rubrum</i> FDraF | MZ044790 |
| <i>T. interdigitale</i> 69575 | MZ044463 | <i>T. interdigitale</i> 820UPrec | MZ044472 | <i>T. rubrum</i> 1240UP | MZ044799 |
| <i>T. interdigitale</i> 69798 | MZ044464 | <i>T. interdigitale</i> 112UP | MZ044469 | <i>T. rubrum</i> 1237Pt | MZ044797 |
| <i>T. interdigitale</i> 71276 | MZ044465 | <i>T. interdigitale</i> 1280UPD | MZ044417 | <i>T. rubrum</i> 1000IPD | MZ044796 |
| <i>T. interdigitale</i> 69382 | MZ044466 | <i>T. interdigitale</i> 297IP | MZ044437 | <i>T. rubrum</i> 1314 | MZ044788 |
| <i>T. interdigitale</i> 76221 | MZ044467 | <i>T. interdigitale</i> 1170IP | MZ044438 | <i>T. tonsurans</i> 119329 | MZ044637 |

T. interdigitale belongs to the *T. mentagrophytes* clade, according to the recent taxonomic scheme of dermatophytes proposed by De Hoog et al. (2017), and is considered a clonal offshoot of *T. mentagrophytes* [21]. The difference between these species is subtle and based on the ecological and clinical parameters “zoophilic” and “anthropophilic”. Zoophilic species occur mainly in non-human animals, and in humans cause more inflammatory mycoses; while anthropophilic species are associated only with human infections and cause low-inflammatory mycoses. *T. mentagrophytes* is considered zoophilic and *T. interdigitale* anthropophilic [21]. The clinical characteristics of the patients from whom the strains of the present study were isolated (mild onychomycoses) correspond correctly to *T. interdigitale*. *T. tonsurans* is an anthropophilic species that also belongs to the *T. mentagrophytes* clade, although its differentiation presents no problems; while *T. rubrum* is also anthropophilic and forms a separate clade [21].

Case reports of *T. tonsurans* causing onychomycosis are rare, because it is related mainly to tinea capitis (involving the scalp) and is rarely present in other types of mycosis [2]. *T. tonsurans* is a highly contagious species that causes outbreaks and can be difficult to treat, even requiring the use of systemic antifungals such as terbinafine [22].

In the present study, 81% of the strains were identified as *T. interdigitale*, which differs from most world epidemiological data on dermatophytes, in which the main species is identified as *T. rubrum* [2,23]. Other studies from Brazil [24,25] and from the state of Rio Grande do Sul [26] also named *T. rubrum* as the most prevalent species of the genus *Trichophyton* causing dermatophytosis. In these studies, the species were identified only with conventional direct microscopy and culture methods. This may be part of the reason that, in our study, only 18.6% of the isolates were identified as *T. rubrum*, and highlights the importance of molecular methods to improve the accuracy of species identification in epidemiological studies [27].

Epidemiological reports of dermatophytoses and their etiological agents are essential to provide information for the management of dermatophyte infections in public health.

The results of the *in-vitro* susceptibility tests are shown in Tables 2, 3, and 4. To classify an isolate as sensitive or resistant to an antifungal, clinical breakpoints (BPs) are required; however, the CLSI protocol does not define BPs for the genus *Trichophyton* [17]. Although definition of epidemiological cutoff values (ECVs) for uncommon molds was recently proposed to compensate for the lack of BPs [28], such values have not yet been defined for *Trichophyton* species due to the lack of studies that fulfill the requirements for defining ECVs. *In-vitro* susceptibility tests are needed for these species. Therefore, the isolates in the present study were not classified as sensitive or resistant, and only a comparative analysis of the *in-vitro* effects of antifungals was performed.

Table 2. *In-vitro* susceptibility of 61 strains of *Trichophyton interdigitale* to seven antifungals.

| Antifungals | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | MFC ($\mu\text{g/mL}$) | |
|--------------------|--------------------------|-------------|----------------------|-------------------|--------------------------|-------------|
| | GM | Range | ($\mu\text{g/mL}$) | | GM | Range |
| Terbinafine | 0,007 | 0,001- 2 | 0,003 | 0,06 | 0,04 | 0,0009 - >1 |
| Itraconazole | 0,06 | 0,003 - >16 | 0,06 | 1 | 0,77 | 0,25 - >16 |
| Ketoconazole | 0,28 | 0,03 - 4 | 0,25 | 2 | 6,5 | 0,5 - >16 |
| Griseofulvin | 0,46 | 0,125 - >64 | 0,5 | 2 | 4,32 | 0,125 - >64 |
| Voriconazole | 0,27 | 0,06 - 8 | 0,25 | 2 | 3,29 | 0,25 - >16 |
| Ciclopirox olamine | 0,88 | 0,25 - 32 | 1 | 2 | 3,29 | 0,25 - >32 |
| Fluconazole | 14,02 | 0,3 - 32 | 16 | 32 | 56,1 | 2 - >64 |

MIC: minimum inhibitory concentration; MIC₅₀: 50% of the isolates inhibited; MIC₉₀: 90% of the isolates inhibited; MFC: minimum fungicidal concentration; GM: geometric mean.

Table 3. *In-vitro* susceptibility of 13 strains of *Trichophyton rubrum* to seven antifungals.

| Antifungals | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | | MIC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$) | MIC ₉₀ | MFC ($\mu\text{g/mL}$) | |
|--------------------|--------------------------|-------------|---|-------------------|--------------------------|------------|
| | GM | Range | | | GM | Range |
| Terbinafine | 0,03 | 0,01 - 0,12 | 0,03 | 0,12 | 0,13 | 0,01 - 0,5 |
| Itraconazole | 0,12 | 0,06 - >16 | 0,125 | 0,25 | 5,65 | 2 - >16 |
| Ketoconazole | 0,25 | 0,03 - 4 | 0,25 | 1 | 5 | 0,5 - >16 |
| Griseofulvin | 0,64 | 0,12 - 8 | 0,5 | 2 | 4,54 | 0,5 - >64 |
| Voriconazole | 0,1 | 0,03 - 4 | 0,06 | 0,5 | 4,95 | 0,5 - 16 |
| Ciclopirox olamine | 0,95 | 0,5 - 2 | 1 | 2 | 4 | 1 - 16 |
| Fluconazole | 3,28 | 1 - 32 | 2 | 16 | >64 | >64 |

MIC: minimum inhibitory concentration; MIC₅₀: 50% of the isolates inhibited; MIC₉₀: 90% of the isolates inhibited; MFC: minimum fungicidal concentration; GM: geometric mean.

Table 4. *In-vitro* susceptibility of one strain of *Trichophyton tonsurans* to seven antifungals.

| Antifungals | MIC ($\mu\text{g/mL}$) | MFC ($\mu\text{g/mL}$) |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Terbinafine | 0,0625 | 0,0625 |
| Itraconazole | 0,5 | 2 |
| Ketoconazole | 4 | >16 |
| Griseofulvin | 2 | 2 |
| Voriconazole | 0,25 | 2 |
| Ciclopirox olamine | 2 | 4 |
| Fluconazole | >64 | >64 |

MIC: minimum inhibitory concentration; MIC₅₀: MIC that inhibited 50% of the isolates; MIC₉₀: MIC that inhibited 90% of the isolates; MFC: minimum fungicidal concentration; GM: geometric mean.

The results obtained here resemble those reported in previous studies [29-31], with terbinafine showing the best antifungal activity against all strains, followed by itraconazole and voriconazole with similar activities (Figure 1). Both terbinafine and azoles target ergosterol synthesis [11]. A systematic review with 26 randomized controlled trials found that terbinafine was more effective than azoles and topical antifungals for onychomycosis treatment [32]. Also, terbinafine has a similar incidence of side effects and fewer drug interactions than azoles [33].

In recent years, several cases of dermatomycoses that did not respond to terbinafine treatment have been reported [34]. This allylamine antifungal agent targets squalene epoxidase, and studies have shown that mutations in this gene in *Trichophyton* spp. lead to reduced susceptibility [35]. Recently, two *T. interdigitale*-like strains highly resistant to terbinafine (MIC > 32 µg/mL) were identified in India and have the missense mutation (Phe397Leu) in the squalene epoxidase gene. The authors suggested that these isolates be considered a new species, *T. indotineae* [36]. Therefore, it is important to perform antifungal susceptibility testing in cases of terbinafine-recalcitrant dermatomycoses.

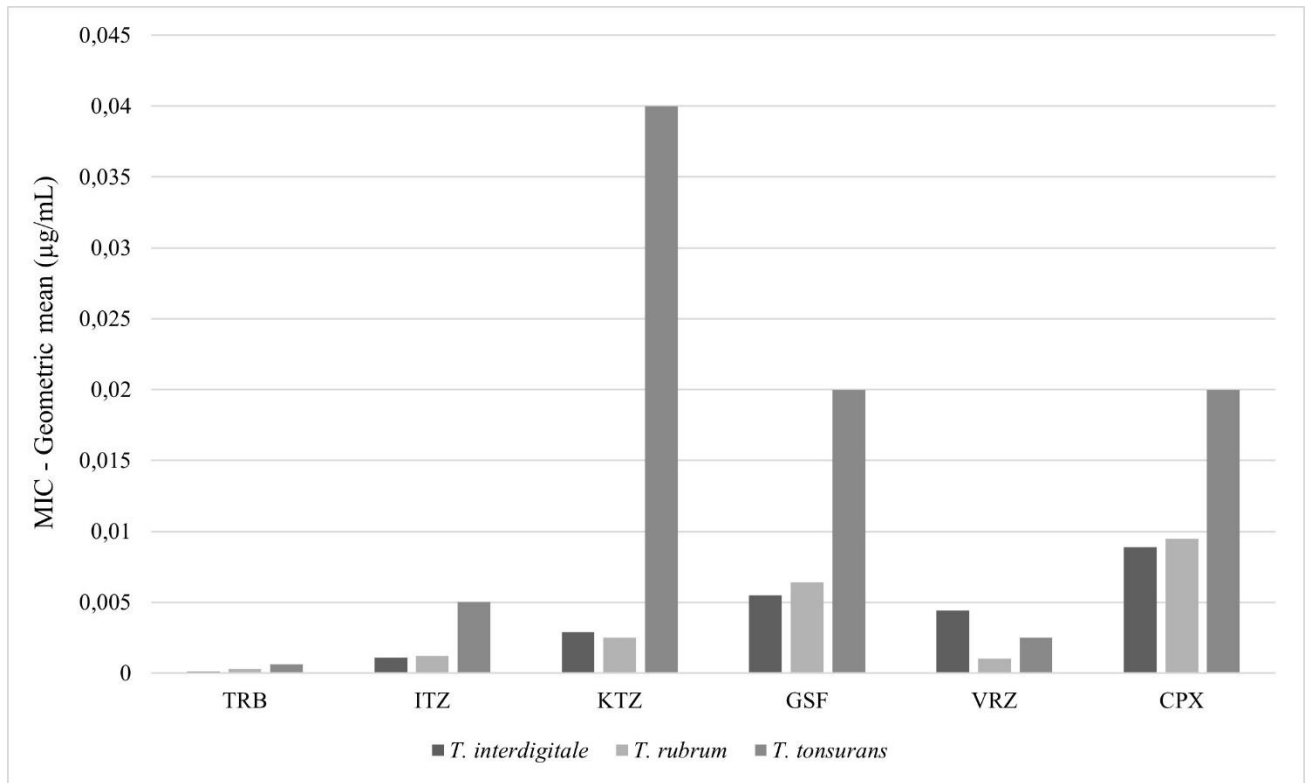


Figure 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of six antifungals for *Trichophyton interdigitale*, *T. rubrum*, and *T. tonsurans*. TRB: terbinafine; ITZ: itraconazole; KTZ: ketoconazole; GSF: griseofulvin; VRZ: voriconazole; CPX: ciclopirox olamine. Fluconazole was removed from this analysis due to its irrelevance and high MIC values, to better visualize the data.

Itraconazole is another antifungal agent widely used agent in dermatophytosis treatment. However, it interacts with a wide range of common drugs [33]. Despite the low geometric means, three isolates of *T. interdigitale* and one isolate of *T. rubrum* presented MICs ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ and may be resistant to this antifungal. Among the azoles, fluconazole was ineffective against all the isolates of *Trichophyton*, which is expected for filamentous fungi, which usually show MICs ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$ [17].

Fluconazole, griseofulvin and ciclopirox olamine did not show good activity *in-vitro* compared to the other antifungals. Griseofulvin is rarely used in the treatment of dermatophytosis because it is less effective *in-vivo* [33]. Ciclopirox is a topically applied iron chelator and has a favorable safety profile [11,33]. However, because its action is limited by the poor permeability of the nails, topical application of ciclopirox is less effective than oral administration of terbinafine or itraconazole [32].

Other antifungals that were not tested in the present study also show good *in-vitro* activity against *Trichophyton* spp. isolates, even better than the terbinafine activity. This was the case for the echinocandins anidulafungin and caspofungin [37]. In addition, the two new imidazole antifungal agents luliconazole and lanocanazole [37] and the new triazole efinaconazole [38] also showed higher *in-vitro* activity than terbinafine and itraconazole. Topical use of luliconazole in cases of onychomycoses proved to be effective and safe in a Phase I-II clinical study [39]. Study of new antifungal agents for the treatment of dermatomycoses is important in view of the problem of resistance to terbinafine. Use of a combination of antifungal agents is also an option. The combined use of oral terbinafine and itraconazole has proven to be an effective treatment alternative [40].

Comparing the three species, *T. interdigitale* and *T. rubrum* showed a similar antifungal susceptibility profile (Figure 1). The isolate of *T. tonsurans* showed higher MIC values than the *T. interdigitale* and *T. rubrum* isolates. However, only one *T. tonsurans* isolate was evaluated, which does not permit any conclusions. The susceptibility profile of the isolate of *T. tonsurans* evaluated here is in accordance with other literature data showing that terbinafine and itraconazole have good *in-vitro* antifungal activity [41].

In summary, our study demonstrated the prevalence of the species *T. interdigitale* in cases of dermatophytosis in southern Brazil, differing from many epidemiological studies. This

finding emphasizes the importance of molecular identification of these fungi, since conventional methods often cannot distinguish among species. Performance of *in-vitro* antifungal susceptibility tests is important to determine the existence of resistant isolates, a growing problem in medical mycology. Further studies of this type, with larger number of isolates, are needed in order to make it possible to define the ECVs for *Trichophyton* species. This will help to judge the clinical significance of the data from *in-vitro* antifungal susceptibility tests and consequently to improve the treatment of dermatophytoses. Even though all the isolates analyzed in our study were susceptible to terbinafine, other antifungal agents should also be tested, such as the new azoles and the echinocandins.

ACKNOWLEDGEMENTS

None do declare.

FUNDING

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

CONFLICTS OF INTEREST

None to declare.

REFERENCES

1. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*. 2008; 51:2-15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>

2. Hayette M-P, Sacheli R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Curr Fungal Infect Rep.* 2015; 9:164-179. <https://doi.org/10.1007/s12281-015-0231-4>
3. Vaezi A, Fakhim H, Abtahian Z, Khodavaisy S, Geramishoar M, Alizadeh A, Meis JF, Badali H. Frequency and Geographic Distribution of *CARD9* Mutations in Patients With Severe Fungal Infections. *Front Microbiol.* 2018; 9:2434. doi: 10.3389/fmicb.2018.02434
4. Wang R, Huang C, Zhang Y, Li R. Invasive dermatophyte infection: A systematic review. *Mycoses.* 2021; 64:340-348. <https://doi.org/10.1111/myc.13212>
5. Nenoff P, Krüger C, Ginter-Hanselmayer G, Tietz HJ. Mycology - an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2014; 12:188-209. doi: 10.1111/ddg.12245
6. Zhan P, Liu W. The Changing Face of Dermatophytic Infections Worldwide. *Mycopathologia.* 2017; 182:77-86. doi: 10.1007/s11046-016-0082-8
7. Hainer BL. Dermatophyte infections. *Am Fam Physician.* 2003; 67:101-108. PMID: 12537173.
8. Mochizuki T, Takeda K, Anzawa K. Molecular markers useful for intraspecies subtyping and strain differentiation of dermatophytes. *Mycopathologia.* 2017; 182:57-65. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0041-4>

9. Aboul-Ella H, Hamed R, Abo-Elyazeed H. Recent trends in rapid diagnostic techniques for dermatophytosis. *Int J Vet Sci.* 2020; 8:115-123. <https://doi.org/10.1080/23144599.2020.1850204>
10. Bader O. Fungal Species Identification by MALDI-ToF Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2017; 1508:323-337. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1_19
11. Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia.* 2008; 166:369-383. <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9110-7>
12. Aggarwal R, Targhotra M, Kumar B, Sahoo PK, Chauhan MK. Treatment and management strategies of onychomycosis. *J Mycol Med.* 2020; 30:100949. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100949>
13. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Gent Biol.* 2019; 132:103255. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103255>
14. 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. *Int J Dermatol.* 2020. <https://doi.org/10.1111/ijd.15226>

15. Ghannoum M. Azole resistance in dermatophytes – Prevalence and mechanism of action. *J Am Podiatr Med Assoc.* 2016; 106:79-86. <https://doi.org/10.7547/14-109>
16. Dogra S, Shaw D, Rudramurthy SM. Antifungal drug susceptibility testing of dermatophytes: Laboratory findings to clinical implications. *Indian Dermatol Online J.* 2019; 10:225-233. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_146_19
17. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 3rd ed. CLSI standard M38. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017.
18. Verrier J, Monod M. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. *Mycopathologia.* 2017; 182:193-202. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0038-z>
19. Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresimin NR, Martins MP, Lopes L, Rossi A. Dermatophyte resistance to antifungal drugs: Mechanisms and prospectus. *Front Microbiol.* 2018; 9:1108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01108>
20. Singh A, Masih A, Kurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses.* 2018; 61:477-484. <https://doi.org/10.1111/myc.12772>

21. de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packeu A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Göker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Gräser Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017; 182:5-31. <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9>
22. Gray RM, Champagne C, Waghorn D, Ong PE, Grabczynska SA, Morris J. Management of a *Trichophyton tonsurans* outbreak in a day-care center. *Pedriatr Dermatol*. 2015; 32:91-96. <https://doi.org/10.1111/pde.12421>
23. Petrucelli MF, de Abreu MH, Cantelli BAM, Segura GG, Nishimura FG, Bitencourt TA, Marins M, Fachin AL. Epidemiology and diagnostic perspectives of dermatophytoses. *J Fungi*. 2020; 6:310. <https://doi.org/10.3390/jof6040310>
24. Silva-Rocha WP, de Azevedo MF, Chaves GM. Epidemiology and fungal species distribution of superficial mycoses in Northeast Brazil. *J Mycol Med*. 2017; 27:57-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.08.009>
25. Maranhão FC de A, Oliveira-Júnior JB, Araújo MA d S, Silva DMW. Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas. *Braz J Microbiol*. 2019; 50:969-978. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00096-0>

26. Heidrich D, Garcia MR, Stopiglia CD, Magagnin CM, Daboit TC, Vetoratto G *et al.* Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9:865-871. <https://doi.org/10.3855/jidc.5479>
27. Ciesielska A, Kozłowska M, Gadzalski M, Worek M, Jaworski A, Stączek P. Application of microsatellite-primed PCR (MSP-PCR) and PCR melting profile (PCR-MP) method for intraspecies differentiation of dermatophytes. *Pol J Microbiol.* 2014; 63:283–290.
28. Espinel-Ingroff A, Turnidge J. The role of epidemiological cutoff values (ECVs/ECOFFs) in antifungal susceptibility testing and interpretation for uncommon yeasts and moulds. *Rev Iberoam Micol.* 2016; 33:63-75. doi: 10.1016/j.riam.2016.04.001
29. Magagnin CM, Stopiglia CDO, Vieira FJ, Heidrich D, Machado M, Vetoratto G, Scroferneker ML. Antifungal susceptibility of dermatophytes isolated from patients with chronic renal failure. *An Bras Dermatol.* 2011; 86:694-701. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962011000400011>
30. Ansari S, Hedayati MT, Zomorodian K, Pakshir K, Badali H, Rafiei A, Ravandeh M, Seyedmousavi S. Molecular characterization and in vitro antifungal susceptibility of 316 clinical isolates of dermatophytes in Iran. *Mycopathologia.* 2016; 181:89-95. <https://doi.org/10.1007/s11046-015-9941-y>

31. Badali H, Mohammadi R, Mashedi O, de Hoog GS, Meis JF. In vitro susceptibility patterns of clinically important Trichophyton and Epidermophyton species against nine antifungal drugs. *Mycoses*. 2015; 58:303-307. doi: 10.1111/myc.12315
32. Gupta AK, Foley KA, Mays RR, Shear NH, Piguet V. Monotherapy for toenail onychomycosis: a systematic review and network meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2020; 182:287-299. <https://doi.org/10.1111/bjd.18155>
33. Ricardo JW, Lipner SR. Safety of current therapies for onychomycosis. *Expert Opin Drug Saf*. 2020; 19:1395-1408. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1829592>
34. Gaurav V, Bhattacharya SN, Sharma N, Datt S, Kumar P, Rai G, Singh PK, Taneja B, Das S. Terbinafine resistance in dermatophytes: Time to revisit alternate antifungal therapy. *J Mycol Med*. 2021; 31:101087. doi: 10.1016/j.mycmed.2020.101087
35. Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:e00115-17. doi: 10.1128/AAC.00115-17
36. Kano R, Kimura U, Kakurai M, Hiruma J, Kamata H, Suga Y, Harada K. Trichophyton indotineae sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. *Mycopathologia*. 2020; 185:947-958. doi: 10.1007/s11046-020-00455-8

37. Baghi N, Shokohi T, Badali H, Makimura K, Rezaei-Matehkolaei A, Abdollahi M, Didehdar M, Haghani I, Abastabar M. In vitro activity of new azoles luliconazole and Ianoconazole compared with ten other antifungal drugs against clinical dermatophyte isolates. *Med Mycol.* 2016; 54:757-763. doi: 10.1093/mmy/myw016
38. Rezaei-Matehkolaei A, Khodavaisy S, Alshahni MM, Tamura T, Satoh K, Abastabar M, Shokoohi GR, Ahmadi B, Kord M, Taghipour S, Makimura K, Badali H. *In Vitro* Antifungal Activity of Novel Triazole Efinaconazole and Five Comparators against Dermatophyte Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62:e02423-17. doi: 10.1128/AAC.02423-17
39. Jones T, Tavakkol A. Safety and tolerability of luliconazole solution 10-percent in patients with moderate to severe distal subungual onychomycosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:2684-2689. doi: 10.1128/AAC.02370-12
40. Sharma P, Bhalla M, Thami GP, Chander J. Evaluation of efficacy and safety of oral terbinafine and itraconazole combination therapy in the management of dermatophytosis. *J Dermatolog Treat.* 2020; 31:749-753. doi: 10.1080/09546634.2019.1612835
41. Kermani F, Javidnia J, Hedayati MT, Abastabar M, Haghani I, Didehdar M, Zaghrami MF, Shokohi T. In vitro activities of antifungal drugs against a large collection of *Trichophyton tonsurans* isolated from wrestlers. *Mycoses.* 2020; 63:1321-1330. <https://doi.org/10.1111/myc.13172>

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o primeiro a analisar prospectivamente casos de onicomicose e *tinea pedis* em pacientes com hanseníase. Como as micoses superficiais constituem um espectro amplo de manifestações clínicas, foram selecionados apenas esses dois tipos, pois são as formas mais prevalentes encontradas em todo o mundo. Além disso, este estudo foi pioneiro em realizar a identificação molecular e determinar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* de um grande número de isolados fúngicos de pacientes com hanseníase.

Os agentes etiológicos da onicomicose e *tinea pedis* foram semelhantes com os encontrados na população em geral, com prevalência de *Trichophyton interdigitale*. No entanto, foi encontrado que pacientes com hanseníase apresentavam mais casos de *tinea pedis* em comparação com o grupo controle, com maior envolvimento dos espaços interdigitais e da sola dos pés, possivelmente devido à maior presença de lesões de pele. A suscetibilidade antifúngica não apresentou grandes variações. Porém, os isolados de *T. interdigitale* dos pacientes com hanseníase apresentaram menor suscetibilidade ao itraconazol, o que é um fato que merece destaque considerando que esse é um dos principais medicamentos utilizados para tratar micoses superficiais. Também foram isoladas diferentes espécies de fungos filamentosos não-dermatófitos e de leveduras do gênero *Candida* não-*albicans*. Esses isolados fúngicos são sabidamente menos suscetíveis aos antifúngicos utilizados rotineiramente nos tratamentos, sendo associados a recidivas e casos recalcitrantes de micoses.

Considerando que pacientes com hanseníase apresentam maior suscetibilidade a micoses superficiais devido às lesões da pele e uso de antibióticos e corticosteroides, o presente estudo se destacou como pioneiro em relação à essa associação ainda pouco abordada na literatura.

8 PERSPECTIVAS

São elencadas as seguintes perspectivas, para ampliar os resultados obtidos neste trabalho:

- Incluir um maior número de pacientes com hanseníase, para permitir mais análises das espécies fúngicas menos prevalentes, as quais usualmente estão relacionadas com maior resistência antifúngica e menor resposta aos tratamentos;
- Analisar outros tipos de micoses superficiais, como *tinea corporis*, para verificar se os padrões encontrados neste estudo são semelhantes para outras formas de micose;
- Correlacionar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* com a resposta *in vivo* dos tratamentos (como casos de onicomicose com recidiva), permitindo dar significado clínico para os resultados encontrados neste estudo.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes com Hanseníase

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(para pacientes com hanseníase em tratamento ou previamente tratados)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em Pacientes com Hanseníase em um Ambulatório de Referência de Porto Alegre”.

Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe médica.

O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência das micoses superficiais em pacientes com Hanseníase atendidos em Ambulatório de Referência de Porto Alegre em pacientes provenientes do Ambulatório de Dermatologia Sanitária de Porto Alegre (ADS).

Sua participação nesta pesquisa consistirá em submeter-se a coleta de material das unhas dos pés, mãos, pele e/ou cabelo no laboratório de micologia neste mesmo local e responder aos questionamentos do seu médico a respeito da sua doença e dados pessoais e profissionais.

Não haverá riscos na coleta, pois serão utilizados materiais esterilizados e será realizado por profissional dermatologista.

Não haverá custos para o participante.

Os benefícios para o participante estão relacionados ao diagnóstico do agente causador da micose, tratamento e acompanhamento com equipe médica.

As informações contidas nesta pesquisa serão confidenciais e asseguramos sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Caso você tenha dúvidas ou necessite algum esclarecimento, entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Rodrigo Vettorato pelo telefone (51) 3214 81 63, como também com o Comitê de Ética na Pesquisa em Saúde da Escola de Saúde Pública, pelo telefone (51)3901-1532.

Declaro que li e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20 ____.

Assinatura do paciente

Dr. Rodrigo Vettorato
(Pesquisador Responsável)

Este TCLE respeita a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Pacientes sem Hanseníase (grupo controle)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(para pacientes sem hanseníase)**

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Prevalência de espécies fúngicas causadoras de micoses superficiais em Pacientes com Hanseníase em um Ambulatório de Referência de Porto Alegre”.

O objetivo deste trabalho é determinar a prevalência das micoses superficiais em pacientes com Hanseníase atendidos em Ambulatório de Referência de Porto Alegre. Como você não tem hanseníase, seus dados e amostras serão utilizados para comparação com os pacientes que apresentam a doença.

Sua participação não é obrigatória, e a qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com a equipe médica.

Sua participação nesta pesquisa consistirá em submeter-se a coleta de material das unhas dos pés, mãos, pele e/ou cabelo no laboratório de micologia do Serviço de Dermatologia do Posto G do Hospital Santa Clara e responder aos questionamentos da equipe do laboratório em relação aos dados pessoais, profissionais, outras doenças de seu conhecimento e de uso de medicamentos.

Não haverá riscos na coleta, pois serão utilizados materiais esterilizados e será realizado por profissional habilitado.

Não haverá custos para o participante.

Os benefícios para o participante estão relacionados ao diagnóstico do agente causador da micose, tratamento e acompanhamento com equipe médica.

As informações contidas nesta pesquisa serão confidenciais e asseguramos sigilo sobre a sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

Caso você tenha dúvidas ou necessite algum esclarecimento, entrar em contato com o pesquisador responsável Dr. Rodrigo Vettorato, pelo telefone (51) 32148163, como também com o Comitê de Ética em Pesquisa Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, pelo telefone (51) 32148571.

Declaro que li e entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do paciente

Dr. Rodrigo Vettorato
(Pesquisador Responsável)

Dr. Gerson Vettorato
(Coletador 1)

Tais Guarienti Amaro
(Coletador 2)

Este TCLE respeita a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

APÊNDICE C – Instrumento de coleta de dados para pacientes com hanseníase

Ficha número: _____

Dados do Paciente

Prontuário: _____

Nome (somente iniciais): _____

Gênero: () M () F

Data de nascimento: ___/___/_____

Cidade: _____

Profissão: _____

Comorbidades: () Nenhuma () Desconhecidas () Presentes.

Quais? _____

Medicações em uso: () Nenhuma () Desconhecidas () Uso de:

(especificar uso crônico de corticosteróide ou paciente em uso de antifúngicos)

Clínica

1.1. Hanseníase:

Classificação: () Indeterminada () Tuberculóide

() Virchowiana () *Borderline*

Esquema terapêutico: () Pauci () Multi

Fase do tratamento: _____

Reação: () Tipo I () Tipo II causa identificada (S / N): _____

() Sem reação

1.2. Suspeita de dermatomicose:

Data da suspeita: ___/___/_____

Local(is) da lesão(ões): _____

Exames Micrológicos

Data da coleta: ___/___/_____

Número de locais coletados: _____. Se mais de 1, colocar letras (a,b,c,d...) identificando os locais abaixo e identificando nos tubos de cultivo.

Resultado:

Direto: _____

Cultural: _____

Identificação Molecular

Data de entrada do isolado no laboratório: ____/____/____

Data de envio para sequenciamento: ____/____/____

Código no espelho da placa do sequenciamento: _____

Resultado:

Espécie identificada: _____

Cobertura: _____ Identidade: _____

Cepa tipo: _____

APÊNDICE D – Instrumento de coleta de dados para pacientes sem hanseníase

Ficha número: _____

Dados do Paciente

Prontuário: _____

Nome (somente iniciais): _____

Gênero: () M () F

Data de nascimento: ___/___/_____

Cidade: _____

Profissão: _____

Comorbidades: () Nenhuma () Desconhecidas () Presentes.

Quais? _____

Medicações em uso: () Nenhuma () Desconhecidas () Uso de:

(especificar uso crônico de corticosteróide ou paciente em uso de antifúngicos)

Clínica

1.1. Suspeita de dermatomicose:

Data da suspeita: ___/___/_____

Local(is) da lesão(ões): _____

Exames Micológicos

Data da coleta: ___/___/_____

Número de locais coletados: _____. Se mais de 1, colocar letras (a,b,c,d...) identificando os locais abaixo e identificando nos tubos de cultivo.

Resultado:

Direto: _____

Cultural: _____

Identificação Molecular

Data de entrada do isolado no laboratório: ___/___/_____

Data de envio para sequenciamento: ___/___/_____

Código no espelho da placa do sequenciamento: _____

Resultado:

Espécie identificada: _____

Cobertura: _____ Identidade: _____

Cepa tipo: _____