

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
MESTRADO EM CLÍNICA MÉDICA

***TRICHOPHYTON TONSURANS: UM PATÓGENO
EMERGENTE, ANÁLISE CLÍNICA, LABORATORIAL E
HOMOLOGIA DO DNA***

Luciana Maria Pereira de Oliveira

**FORTALEZA-CE
2004**

Luciana Maria Pereira de Oliveira

**TRICHOPHYTON TONSURANS: UM PATÓGENO
EMERGENTE, ANÁLISE CLÍNICA, LABORATORIAL E
HOMOLOGIA DO DNA**

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Medicina -
Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. José Julio Costa Sidrim

**FORTALEZA-CE
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca de Ciências de Saúde da
Universidade Federal do Ceará
©reprodução autorizada pela autora

O48t Oliveira, Luciana Maria Pereira de.
Trychophyton tonsurans: análise clínica, laboratorial e
homologia do DNA / Luciana Maria Pereira de Oliveira. –
Fortaleza, 2004.
99 f.: il

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim.
Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) -
Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Trichophyton. 2. Tinea capitis. 3. DNA. 4 RAPS. I.
Título

CDD 616.546



UFC
PR/PPG

ATA DE SESSÃO DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Centro/Faculdade

Medicina

Departamento

Medicina Clínica

Curso de Pós-Graduação

Medicina - Clínica Médica

Ata da Sessão de Defesa de Dissertação do(a) Mestrando(a)

Luciana Maria Pereira de Oliveira

Realizada no Dia

01 de junho de 2004

01 Às 9:00 horas e _____ do dia

02 01 de junho de 2004

03 realizou-se a sessão de defesa da dissertação de mestrado do aluno Luciana Maria

04 Pereira de Oliveira

05 O trabalho tinha como título Trichophyton tonsurans, um patógeno emergente,

06 análise clinica, laboratorial e genética

07 _____

08 Compunham a banca examinadora os professores doutores Marcos Fabio Gadelha Rocha

09 _____, orientador(a), José Júlio Costa Sidrim e

10 José Wilson Accioly Filho e Fernanda Edna Araújo Moura

11 A sessão foi aberta pelo(a) professor(a) doutor(a) Eanes Delgado Barros Pereira

12 _____, Coordenador(a) do Curso de Pós-Graduação

13 _____

14 que apresentou a banca examinadora e passou a palavra para o(a) candidato(a). Após a

15 exposição do trabalho, seguiu-se o processo de arguição do(a) mestrando(a). O primeiro

16 examinador foi o professor(a) doutor(a) Marcos Fábio Gadelha Rocha

17 Logo após procederam a arguição os professores doutores Fernanda Edna Araújo Moura

18 _____, José Wilson Accioly Filho,

19 _____

20 e _____

21 Em seguida a banca examinadora se reuniu reservadamente a fim de avaliar o desempenho do(a)

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM), com o auxílio financeiro da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).



Dedicatória

Aos meus pais, Laurito e Socorro pelo sacrifício e apoio incondicional que me possibilitaram chegar até aqui.

Ao meu esposo Ricardo, pelo estímulo, apoio e ajuda em todos os momentos deste trabalho.

A minha filha Lara, presente de Deus, fonte de força para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos recebidas todos os dias que me fortaleceram para o término deste trabalho.

Aos pacientes que são fonte inesgotável de aprendizado.

Ao meu orientador Prof. Julio pela confiança e incentivo durante a orientação deste trabalho.

À Dra. Tereza Elisabete pelo o exemplo e auxílio nas sugestões da confecção deste trabalho.

A Sâmia e Rossana pelo auxílio na realização das várias etapas do trabalho.

Aos professores do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC.

À Germana Paixão pelo ensino e responsabilidade do meu interesse pela Micologia.

A Océlia, Vera, Gê, Terezinha, Olavo e demais funcionários do Hospital Universitário Walter Cantídio e do Laboratório de Micologia

À Milena, acadêmica de Medicina integrante do Labgen por seu apoio fundamental.

À acadêmica Janaína pela ajuda no desenvolvimento da parte laboratorial.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Departamento de Clínica Médica.

À Universidade Federal do Ceará.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas

Lista de Gráficos

Lista de figura

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Histórico	18
1.2	Generalidades dos dermatófitos	20
1.3	<i>Tinea capitis</i> - Fundamentos teóricos	21
1.4	Epidemiologia	22
1.4.1	Reservatórios e espécies relacionadas as dermatofitoses	22
1.4.2	<i>Tinea capitis</i>	23
1.4.3	Distribuição geográfica	24
1.4.4	Portador assintomático	25
1.5	Patogenia da <i>Tinea capitis</i>	26
1.6	Considerações sobre o <i>Trichophyton tonsurans</i>	28
1.7	Manifestações clínicas	29
1.8	Diagnóstico diferencial da <i>Tinea capitis</i>	32
1.8.1	Diagnóstico diferencial em <i>tineas</i> não inflamatórias	32
1.8.2	Diagnóstico diferencial em <i>tineas</i> inflamatórias	33
1.9	Identificação laboratorial do dermatófitos	33
1.9.1	Macromorfologia dos dermatófitos	34

1.9.2 Micromorfologia do <i>T. tonsurans</i>	34
1.10 Biologia molecular do <i>T. tonsurans</i>	35
1.11 Objetivo geral.....	37
1.12 Objetivos específicos	37
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.1 Tipo de estudo	38
2.2 População estudada	38
2.3 Critérios de inclusão	38
2.4 Critério de exclusão.....	39
2.5 Adesão ao protocolo.....	39
2.6 Colheita do material	39
2.7 Procedimentos laboratoriais clássicos	40
2.7.1 Estudo macromorfológico das colônias de <i>T. tonsurans</i>	40
2.7.2 Estudo micromorfológico das colônias de <i>T. tonsurans</i>	41
2.7.3 Estudos das habilidades biológicas e ação enzimática das Cepas de <i>T. tonsurans</i>	42
Prova da Uréase	42
Prova da perfuração do pêlo <i>in vitro</i>	42
Prova de requerimentos nutricionais	43
2.8 Extração de DNA	44
2.9 RAPD	45
3 RESULTADOS.....	47
3.1 População estudada	47
3.2 Dados epidemiológicos gerais e clínicos de pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i> ..	47
3.2.1 Distribuição dos pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i> quanto ao sexo.....	47
3.2.2 Pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i> quanto à idade	48

3.2.3	Fatores predisponentes dos pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i>	48
3.2.4	Manifestações clínicas dos pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i>	49
3.3	Espécies isoladas	50
3.4	Dados epidemiológicos e clínicos de pacientes em cultura positiva para <i>T. tonsurans</i> ..	50
3.4.1	Distribuição quanto ao sexo.....	50
3.4.2	Faixa etária de pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	51
3.4.3	Fatores predisponentes de <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	51
3.4.4	Manifestações clínicas dos pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	52
3.4.4.1	Características das tonsuras por <i>T. tonsurans</i>	53
3.5	Achados laboratoriais dos pacientes com <i>T. tonsurans</i>	53
3.5.1	Aspectos macromorfológicos das colônias de <i>T. tonsurans</i>	53
3.5.2	Aspectos micromorfológicos das colônias de <i>T. tonsurans</i>	54
3.5.3	Ação ezimática, habilidades biológicas e requerimentos nutricionais	55
3.6	Extração do DNA e análise do RAPD com o <i>primer</i> OPAO-15	56
4	DISCUSSÃO	58
5	CONCLUSÃO	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
7	ANEXOS	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Microscopia Direta e Cultura das amostras de couro cabeludo	47
Tabela 2	Distribuição de pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i> quanto ao sexo	48
Tabela 3	Distribuição, por faixa etária, dos pacientes com suspeita clínica e diagnóstico confirmado de <i>Tinea capitis</i>	48
Tabela 4	Fatores predisponentes entre os pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i>	49
Tabela 5	Manifestações clínicas dos pacientes com suspeita de <i>Tinea capitis</i>	49
Tabela 6	Distribuição, por faixa etária, de pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i> ..	51
Tabela 7	Fatores predisponentes de <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	52
Tabela 8	Manifestações clínicas dos pacientes com <i>T. capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	52
Tabela 9	Características das tonsuras dos pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i> ...	53
Tabela 10	Aspectos macromorfológicos das colônias de <i>T. tonsurans</i>	54
Tabela 11	Aspectos e quantificação micromorfológica das colônias de <i>T. tonsurans</i>	55
Tabela 12	Habilidades biológicas, ação enzimática e requerimentos nutricionais	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Espécies isoladas	50
Gráfico 2	Distribuição quanto ao sexo de paciente com <i>T. tonsurans</i>	50
Gráfico 3	Distribuição das cepas de <i>T. tonsurans</i> quanto ao perfil genético em RAPD com o <i>primer</i> OPAO-15.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema exemplificando a invasão do pêlo	27
Figura 2	Desenho sobre os diferentes tipos de parasitismo piloso.....	28
Figura 3	Tonsura em criança, do sexo masculino, com <i>Tinea capitis</i>	30
Figura 4	Descamação e tonsura em criança com <i>Tinea capitis</i>	30
Figura 5	Manifestação clínica inflamatória em criança com <i>Tinea capitis</i>	31
Figura 6	<i>Black dot</i> em paciente com <i>Tinea capitis</i>	31
Figura 7	Reação de hipersensibilidade à distância de paciente com <i>Tinea capitis</i>	32
Figura 8	Parasitismo endotrix à microscopia direta pelo <i>T. tonsurans</i>	33
Figura 9	Achado macromorfológico do <i>T. tonsurans</i> , verso e reverso da colônia.....	34
Figura 10	Achados micromorfológicos do <i>T. tonsurans</i>	35
Figura 11	Perfil genético em RAPD dos <i>T. tonsurans</i> (2-15) e <i>T. mentagrophytes</i> (17-25) com <i>primer</i> OPAO-15.....	37

RESUMO

Tinea capitis é uma infecção micótica de couro cabeludo, comum nas crianças em idade escolar e na pré-puberdade, ocorrendo em todas as partes do mundo. É causada por fungos dermatofíticos pertencentes aos gêneros *Trichophyton* ou *Microsporum*. O *Trichophyton tonsurans* é um fungo antropofílico e vem sendo considerado um patógeno emergente no mundo no que diz respeito à etiologia da *Tinea capitis*. Desperta interesse do pesquisador com preocupação de cunho social, tendo em vista sua alta incidência em populações de baixa renda e seu possível comportamento endêmico. **Objetivos:** Estudar as características fenotípicas das várias cepas isoladas relacionando com o aspecto clínico e analisar o perfil genético de cepas de *T. tonsurans* através do RAPD e correlacionar os achados. **Métodos:** Foram atendidos 76 pacientes com suspeita clínica de *Tinea capitis*, envolvendo couro cabeludo e pêlos. A coleta do espécime clínico se dava através de raspagem do couro cabeludo na zona de tonsura, as amostras foram submetidas a exame de microscopia direta, identificação laboratorial através da macro e micromorfologia das colônias, estudos de ação enzimática, fisiológicas e requerimentos nutricionais. A partir daí foram selecionadas 17 cepas de *T. tonsurans* que foram submetidas a análise de seu perfil genético através do random amplified polymorphic DNA (RAPD), utilizando-se o *primer* OPAO-15 e visualizado em gel de poliacrilamida corados pela prata. **Resultados:** Dos casos suspeitos de *Tinea capitis* (76 pacientes), 40 pacientes (60,52%) tiveram cultura positiva para dermatófito. Destes eram por *T. tonsurans*. Dos 40 casos com cultura positiva, 26 (65%) eram do sexo feminino com maior incidência no intervalo de 0-5anos(40%). Nas manifestações clínicas, observou-se que a descamação (85,7%), eritema (37,1%) e a tonsura (57,1%) foram as mais incidentes. Na análise do RAPD, foram observados três perfis genéticos diferentes entre as cepas de *T. tonsurans* com produção de bandas de pesos moleculares diferentes dos descrito na literatura. **Discussão:** O sexo feminino e o intervalo de idade entre 0-5 anos foram os mais freqüentes, as manifestações clínicas não inflamatórias foram as mais comuns, corroborando o argumento de que o *T. tonsurans*, por ser antropofílico, promove pouca reação inflamatória. As cepas de *T. tonsurans* deste estudo além da grande variação fenotípica, apresentaram diferenças genéticas frente a literatura quando utilizado o *primer* OPAO-15, isto sugere uma variação local podendo configurar uma nova espécie.

ABSTRACT

Background: *Tinea capitis* is a mycotic infection of the scalp, common in school-aged and pre-pubescent children, which occurs all over the world. It is caused by dermatophyte fungi of the genus *Trichophyton* or *Microsporum*. *Trichophyton tonsurans* is an anthropophylic fungus and is being considered an emerging pathogen in terms of the etiology of *Tinea capitis*. It catches the interest of researchers with social concerns due to its high incidence among low-income populations and its possible endemic behavior. **Objectives:** To evaluate the clinical aspect of *Tinea capitis* with positive and negative cultures; to study the phenotypic characteristics of various stains that have been isolated in relation to the clinical aspect and to analyze the profile of the genome from *T. tonsurans* strains using RAPD and correlate the findings. **Methods:** 76 patients with suspected *Tinea capitis* were treated, involving the scalp and body hair. The patients were analyzed. Clinical samples were taken by scraping the scalp if the tonsure zone; the samples were examined directly under the microscope and identified in the laboratory through the macro and micromorphology of the colonies. Studies were made of enzymatic, physiological activity and nutritional requirements. Next 17 strains of *T. tonsurans* were selected and submitted to an analysis of their genetic profile through random amplified polymorphic DNA (RAPD), using the primers OPAO-15. The PCR products were visualized polyacrylamide gel followed by silver staining. **Results:** Of the suspected cases of *Tinea capitis* (76 patients), 40 patients (60.52%) were confirmed through a positive culture for dermatophyte. 35 (87.5%) of the 40 cases of *Tinea Capitis*, were of *T. tonsurans*. There was a greater prevalence among women. Of the 40 positive cultures, 26 (65%) were females. Regarding age, the greatest interval was in the 0-5 age group (40%). Of clinical manifestations scaly dermatosis (85.7%), erythematous lesions (37.1%) and hair loss with or without black dot(57.1%) were the most common. In the RAPD analysis, were observed three distinct genetic perfile, with production different bands patterns from *T. tonsurans* strain literature. **Conclusion:** Females and a 0-5 age group were the most common, corroborating the argument that as it is anthropophylic *T. tonsurans* provoked little inflammatory reaction. *T. tonsurans* has a high incidence in regions where living conditions, hygiene and other habits are precarious, reflecting the fact that this anthropophylic fungus is highly contagious and that the pathogen is very well adapted to our climatic conditions. The *T. tonsurans* strain from this

study are different, this represents a new species of dermatophyte, with a large morphological variation, atypical characteristics in its macromorphology (colonies with glabrous textures) and in the micromorphology (the presence of large quantities of chlamydoconids in primary isolation) further on this genotypical presentation, differing from the literature.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico

A primeira referência à infecção por dermatófito é atribuída a Cornelius Celsius, enciclopedista romano, por volta 30 AD descritas como infecções no couro cabeludo¹.

A palavra *Tinea* teria sido pela primeira vez usada nos tempos romanos por Horace, que significava inseto, cuja larva parasitava roupas e livros, assemelhando-se à lesão circinada da *Tinea capitis*. Há alguns relatos que a palavra *tinea* tenha sido utilizada pela primeira vez por Cassius Felix no século V¹.

Embora a evidente localização das lesões características das dermatofitoses tenha permitido o conhecimento clínico da enfermidade desde de tempos mais remotos, foi somente a partir de uma das mais graves infecções por dermatófito, o “favus”, que a etiologia desta doença foi esclarecida.

A história da Micologia médica humana iniciou-se com o descobrimento dos agentes etiológicos das dermatofitoses pelo estudioso Robert Remark, em 1839, quando observou e descreveu a *Tinea favica*, elucidando a etiologia do *favus*, mais tarde confirmada por David Gruby⁴⁶.

No século XVI, a palavra *tinea* caracterizava lesões causadas no couro cabeludo e o termo *ringworm* se referia a qualquer lesão na pele em forma de anel^{18,21,40,73}. No início do século XIX, Alibert usou o termo *favus* para designar exsudato tipo mel em infecções do couro cabeludo^{2,40}. David Gruby, em 1841, embora não fosse dermatologista, descreveu características do *Trichophyton schoeleinii* e logo após em 1843 sobre o *M. audouinii* assim como a existência dos parasitismos *ectotrix* e *endotrix*, descreveu a invasão do fungo sobre o fio de cabelo e que estes organismos poderiam ser cultivados e transmitidos entre humanos^{21,40}. Malmsten, em 1845 estabelece o gênero *Trichophyton*^{21,33,35,37, 40}. Em 1853, Charles Robim descreveu inúmeros dermatófitos em seu livro *Histoire naturelle des végétaux parasites*^{40,45}.

Assim no período de quase cinquenta anos, poucos foram os progressos científicos no campo das infecções de pele, posto que, a literatura foi invadida por incompletas e inaccuradas pesquisas, até que surgisse um dos maiores nomes da Dermatologia

e Micologia- Raymond Jacques Andrieu Sabouraud. Este médico, dermatologista, trabalhando no Hospital Saint Louis de Paris, demonstrou especial interesse pelo estudo da etiologia das micoses. Estudando particularmente as *Tineas*, Raymond Sabouraud publicou o livro *Lês Teignes*, em 1910, período no qual, caracterizou o gênero *Epidermophyton* e classificou os dermatófitos em *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Achorion*^{40,46,64}. Iniciou seus estudos sobre dermatófitos em 1892 e publicou artigos até 1936, foi ele quem estabeleceu critérios sobre a taxonomia dos dermatófitos e características de apresentação clínica^{21,66}. Sabouraud descreveu o método para cultivar os dermatófitos que até hoje é reproduzido no mundo inteiro. Sua base metodológica e astutas observações científicas permaneceram praticamente imutáveis, sendo os métodos terapêuticos por ele estabelecidos melhorados com o advento da Griseofulvina^{21,67,78}. No ano de 1928, foi observado por Devèze e Margarot que, quando se expunham os fios de cabelo parasitado por algumas espécies à luz ultravioleta estes cabelos eram capazes de se mostrar luminescentes⁴⁰.

Emmons em 1934, definiu apenas três espécies de dermatófitos, redefinindo a taxonomia ao levar em consideração a morfologia dos esporos e estruturas acessórias nos fungos e assim todos os fungos dermatofíticos passaram a pertencer apenas a três gêneros: *Epidermophyton*, *Trichophyton* e *Microsporum*. O gênero *Epidermophyton* é caracterizado pela presença de macroconídios de paredes finas agrupados em cachos e pela ausência de microconídios. Já no gênero *Microsporum*, as espécies apresentavam macroconídios de paredes mais ou menos espessas e de tamanho grande associados a microconídios, enquanto o gênero *Trichophyton* mostra como característica a presença de macroconídios de parede lisa, associados a microconídios de forma e tamanhos bastante variados^{23,65}.

Georg, em 1957, complementou o trabalho de Emmons com estudos sobre as características nutricionais e fisiológicas dos dermatófitos³². Testes nutricionais diversos foram propostos como recurso de grande valor na identificação dos dermatófitos, sendo desenvolvidas também outras provas para caracterização de algumas espécies, tais como o teste da perfuração de pêlos e a prova da uréase.

Em 1960, Donald Griffin observou que alguns fungos apresentavam estruturas de reprodução sexuada, no caso, o *M. gypseum*, que foi chamada de “forma perfeita” ou telemorfa. Assim os fungos do gênero *Trichophyton* que apresentavam reprodução sexuada, passaram a ser denominados de *Artrodherma*; nos casos do grupo *Microsporum* que apresentassem a forma telemórfica, seriam denominados de *Nanizzia*, sendo mais tarde unidos apenas como *Artrodherma*⁷⁵.

Foi Gruby que em 1844 isolou o *T. tonsurans* de material clínico mas Malmstein que descreveu os estudos de Gruby e publicou em 1845 os dados sobre o fungo com ilustrações^{29,34}. Em 1944, Carrion e Silva descreveram e ilustraram as várias formas de morfologia das colônias de *T. tonsurans*²⁹.

Atualmente, observa-se diferentes termos para caracterizar as mais diversas formas clínicas de dermatofitoses. As duas classificações mais utilizadas são as da corrente inglesa e a que segue à corrente francesa. A primeira utiliza a palavra *Tinea*, em latim, associada a outra palavra referente ao sítio anatômico. Então, *Tinea corporis* (localiza-se no corpo), *Tinea capitis* (couro cabeludo), *Tinea unguium* (unhas), *Tinea pedis* (pés), *Tinea cruris* (grandes pregas), *Tinea barbae* (barba). A segunda classifica *Tinea* como qualquer lesão dermatofítica encontrada em couro cabeludo, barba ou bigode, por outro lado as lesões dermatofíticas encontradas em região de pele glabra são chamadas de epidermofitose, já as onicomicoses dermatofíticas são as que acometem as unhas e as lesões que acometem o espaço celular subcutâneo são chamadas de dermatofitoses subcutâneas ou profundas que costumam acometer os imunocomprometidos.

A micologia até bem pouco tempo era uma ciência sem grandes pretensões científicas. Descrições inconsistentes foram e ainda são assinaladas na literatura clínica e micológica. Felizmente o bom senso vem orientando melhor micologistas e dermatologistas que procuram ser cada vez mais criteriosos na classificação clínica e etiológica da doença⁴⁷.

1.2 Generalidades dos dermatófitos

Aproximadamente 50.000 espécies compõem o reino *Fungi*, mas somente 300 destas tem-se mostrado patogênicas, entre eles os agentes causadores de dermatofitoses, os dermatófitos⁵⁹.

As dermatofitoses junto com as candidíases e micoses superficiais estritas são consideradas infecções fúngicas superficiais. Estão entre as infecções mais comuns e, freqüentemente, são consideradas triviais, mas são de fato recorrentes e refratárias.

As dermatofitoses são infecções fúngicas de tecidos queratinizados, causadas por um grupo de fungo que recebe a denominação de dermatófitos¹⁷. São fungos que em vida parasitária utilizam queratina como fonte de subsistência, limitando-se portanto as camadas queratinizadas e semiqueratinizadas da pele³¹.

Os dermatófitos são microorganismos especializados que no decorrer da sua evolução tornaram-se capazes de invadir, colonizar e se manter viáveis em tecidos queratinizados de homens e animais, produzem enzimas capazes de digerir queratina, podendo ocasionar doenças em pele glabra, couro cabeludo, unhas e tecidos subcutâneos¹. A pele responde à irritação das infecções superficiais com proliferação da membrana basal e então descamação e espessamento epidérmico⁵⁹.

A classificação de dermatófitos usadas pela maioria das escolas de Micologia é a de Emmons, de 1934, que, após um tempo foi revista por Rivalier (1966, *Taxonomies de dermatophytes*). Consiste em dividir os dermatófitos em três gêneros de acordo com sua reprodução: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Atualmente existem aproximadamente 40 espécies de dermatófitos agrupados nos três gêneros com distribuição geográfica universal, sendo que sua incidência pode variar de acordo com fatores populacionais, hábitos sociais e higiênicos, diferenças climáticas e variações sazonais¹⁷.

Seus agentes etiológicos são facilmente cultiváveis e apresentam as seguintes formas de contágio: diretamente do solo, homem-animal, homem-homem e por meio de objetos contaminados³¹.

Nos últimos anos, vem se divulgando o aumento de casos de infecções fúngicas, e as dermatofitoses apresentam lugar de destaque. Vários fatores são aventados: melhor diagnóstico clínico e laboratorial, aumento da sobrevivência de pacientes com doenças imunossupressoras e uso indiscriminado de drogas imunossupressoras e citostáticas.

Acredita-se, com base numa prevalência estimada, que de 10 a 15% da população humana mundial pode ser infectada por alguma espécie de dermatófito no decorrer de sua vida¹⁷.

Os dermatófitos apresentam uma predileção ecológica no que diz respeito a sua adaptação ao meio ambiente¹⁷. Quanto a distribuição geográfica são ubiqüitários, não havendo área ou grupo de pessoas que se encontrem isoladas destes fungos¹⁷.

1.3 *Tinea capitis* - Fundamentos teóricos

A *Tinea capitis* é uma infecção causada por dermatófitos que afeta o folículo piloso do couro cabeludo, sobrancelhas, cílios, barba e bigode e a pele adjacente, isto é, o fungo infecta o tecido queratinizado, sendo em geral confinado a superfície por inabilidade de penetrar em tecidos muito profundos, embora ocasionalmente invada o subcutâneo³⁸. É

principalmente encontrada em crianças em idade escolar e adultos jovens⁷². Os pêlos axilares e pubianos são refratários à penetração dos fungos causadores de *Tinea*.

É uma das mais antigas infecções descritas no ser humano, sendo largamente distribuída pelo mundo¹⁷, é causada por uma variedade de dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*⁵⁷. O agente etiológico pode variar com a região e com o tempo. O *T. tonsurans* é o mais comum dos organismos causadores de *Tinea capitis* nos Estados Unidos, Europa, Austrália e América Central⁵⁷. É considerado um problema de saúde pública de grande importância no Brasil e no mundo^{17,28}.

Apesar de fácil diagnóstico, o controle e o tratamento é difícil, seja por presença de portador assintomático, ou fômites contaminados, ou ainda necessidade de tratamento por via oral prolongado²⁶. O tratamento sistêmico tem-se mostrado necessário, pois os agentes tópicos não conseguem penetrar tão bem no folículo piloso, não sendo suficiente para erradicar a infecção. O tratamento-padrão é o uso da griseofulvina na dose de 10-20mg/kg de peso mas já existem trabalhos que relatam a eficácia de outros antifúngicos orais com a terbinafina, itraconazol e o fluconazol tendo como principais vantagens o curto tempo de tratamento e a menor incidência de efeitos colaterais¹¹.

Com o aumento na incidência e mudanças na epidemiologia da *Tinea capitis* em todo o mundo, se fazem necessárias revisões freqüentes e atualizações quanto à etiologia para o sucesso terapêutico da doença. Por exemplo, observou-se uma queda nas *Tinea capitis* causadas por agentes do gênero *Microsporum* e um aumento nas causadas por *Trichophyton tonsurans* nos últimos 50 anos nos Estados Unidos²¹.

1.4 Epidemiologia

1.4.1 Reservatórios e espécies relacionados as dermatofitoses

Os três reservatórios dos dermatófitos são os homens, animais domésticos (como cão e gato) e o solo⁵². Os fungos os quais tem o homem como reservatório são chamados de antropofílicos, nos que tem os cães e gatos são denominados de zoofílicos e os que se adaptam melhor ao solo são chamados de geofílicos^{52,63}. É importante reconhecer em determinada espécie a qual microecossistema ele pertence para se avaliar a resposta que poderá desencadear no hospedeiro, de modo que quanto mais distanciado filogeneticamente está um dermatófito da espécie por ele parasitado, maior a resposta inflamatória^{38,53}. As espécies

zoofílicas produzem uma resposta inflamatória mais severa nos humanos do que em animais, enquanto os fungos geofílicos produzem resposta inflamatória tanto em homens como animais, refletindo a distância filogenética. Por outro lado, sabe-se que nem todas as infecções por antropofílicos são não inflamatórias, em virtude das diferenças no hospedeiro susceptível e na virulência da espécie.

As queratinas são diferentes, em razão da sua composição, por exemplo, no cabelo humano, a queratina contém grande quantidade de cisteína; na queratina da pele, encontramos quantidade maior de metionina, achado que poderia explicar a preferência de algumas espécies por determinados sítios e espécies animais⁷¹.

A identificação dos dermatófitos é feita, na prática, pelo estudo do aspecto parasitário na amostra clínica e pela observação dos aspectos macroscópicos e microscópicos das colônias obtidos em cultivo. Na rotina algumas provas fisiológicas (prova da urease e perfuração do cabelo) e, mais raramente, provas de necessidades nutricionais são utilizadas para a correta identificação de certas espécies⁵².

Das espécies de dermatófitos, apenas oito são caracteristicamente associadas a *Tinea capitis*: *T. tonsurans*, *M. canis*, *T. violaceum*, *M. audouinii*, *T. soudanenses*, *M. ferrugineum*, *T. yaoundei* e *T. gourvilii*, sendo as duas primeiras mais comuns. Todas são antropofílicas com exceção do *M. canis*, que é zoofílico⁴⁰. *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* poucas vezes são a causa infecção do couro cabeludo.

O estudo do espectro dos dermatófitos de uma região durante um período prolongado permite estabelecer o número de espécies de ocorrência comum, esporádica ou excepcional da região⁵².

1.4.2 *Tinea capitis*

Tinea capitis é geralmente observada em crianças entre 6 meses de idade e a puberdade^{39,40} mas principalmente entre 3 e 7 anos de idade^{21,41,77}. É incomum nos adultos possivelmente pelo aumento da ação fungistática dos triglicérides do sebo que é produzido na puberdade⁴⁰. A diminuição dos triglicérides devido a redução do sebo na mulher menopausada pode predispor-la mais que o homem adulto à *Tinea capitis*.

A incidência da *Tinea capitis* pode variar quanto ao sexo dependendo da espécie, por exemplo, no caso do *M. audouinii*, a taxa é de 5 meninos para 1 menina. Quanto ao *M. canis*, se sabe da predominância também em meninos^{21,22}. Alguns autores explicam o

predomínio em meninos pelo fato de que cabelos curtos ajudariam a implantação de esporos. Aste (1996) especula que disfunções hormonais do sistema endócrino sexual poderiam facilitar a invasão do couro cabeludo pelo dermatófito através da modificação da secreção e composição do sebo⁴. A infecção por *Trichophyton* afeta meninos e meninas igualmente mas nos adultos as mulheres são mais infectadas^{21,22}. Não está claro o motivo, a não ser pelo fato do maior contato das mulheres com crianças que os homens.

Estudos relatam que a incidência de *Tinea capitis* por *T. tonsurans* pode ser relacionada com grandes famílias, moradia em condições precárias, aglomerados urbanos e baixo nível sócioeconômico^{5,21}.

Nos Estados Unidos, há predominância da *Tinea capitis* por *Trichophyton tonsurans* na raça negra, Sharma (1988) propôs que a disposição dos cabelos exporia o extrato córneo do couro cabeludo ao fungo mais facilmente e que os cremes e óleos aplicados promoveriam uma aderência dos artrosporos no local⁷⁰.

Muitas crianças portadoras de *Tinea capitis*, que apresentam grandes manifestações clínicas com sinais inflamatórios, tendem a sofrer de ostracismo social, autoestima baixa e sensação de exclusão perante os colegas²¹.

Certas espécies de dermatófitos são endêmicas em áreas geográficas específicas e outras são cosmopolitas³².

1.4.3 Distribuição geográfica

A distribuição geográfica e a prevalência dos dermatófitos não são estáticas podendo alterar por influência do clima, migração de pessoas e por desenvolvimento de profilaxias e terapêuticas²¹.

A epidemiologia da *Tinea capitis* nos Estados Unidos passou por mudanças nos últimos anos. Em 1900, o microorganismo mais freqüente era *M. canis*^{21,35,36}, pelos anos 1940 o *M. audouinii* era então o agente mais isolado e causador de *Tinea capitis*^{21,34,68}. Com a introdução da griseofulvina e aumento da vigilância nas escolas houve um declínio da *Tinea capitis* causada pelos *Microsporum*. Estudos realizados no Texas³⁸, no Reino Unido^{40,41,50} mostraram que houve aumento na incidência de *Tinea capitis* causada pelo *T. tonsurans*, particularmente em centros urbanos a partir de 1950. Nos Estados Unidos, a introdução deste microorganismo veio a partir do México, Caribe e Porto Rico²¹.

No oeste europeu, similar aos Estados Unidos na década de 1940, os *M. canis* e *M. audouinii* eram os maiores causadores de infecções fúngicas do couro cabeludo. Quanto ao leste europeu, o fungo mais isolado, neste período, era o *T. schöenleinii*^{1,21}.

Nos dias de hoje, na América Central, Caribe e América do Sul, o predomínio é do *T. tonsurans*^{40,63}. Na Austrália e Nova Zelândia, o organismo mais comum é o *M. canis* com o *T. tonsurans* emergindo em algumas áreas. Na África, os microorganismos mais comuns incluem *T. violaceum*, *M. audouinii*, *T. soudanense*, *T. mentagrophytes* e *M. canis*⁴⁰. As estatísticas dos Estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Espírito Santo e São Paulo mostram que o *M. canis* ainda é o fungo mais envolvido nas infecções do couro cabeludo⁸. Brilhante e cols, em 2000, mostraram que, na cidade de Fortaleza, o *T. tonsurans* foi o microorganismo mais isolado em 73,9% das lesões do couro cabeludo⁹. Esta espécie de *Trichophyton* tem se mostrado bastante adaptada à temperatura e umidade relativamente elevadas das regiões Norte e Nordeste do Brasil, diferindo substancialmente do clima seco e umidade relativa do ar em níveis baixos nos estados do Sul e Sudeste. A incidência dessas micoses apresenta uma grande variedade nas diferentes regiões do Brasil¹⁵. As constantes correntes migratórias que ocorreram no país tem sido citadas como uma das principais causas para a alteração desta etiologia. Ao se observar maior incidência de *Tinea* por *T. tonsurans* devem ser relevados alguns fatores como uma transmissão mais eficiente deste fungo entre os homens, fazendo crer que uma maneira eficaz de combater o fungo é impedindo a transmissão direta homem a homem³⁸.

Um fator que deve ser levado em consideração, além do geográfico, é o período em que foi realizada a pesquisa onde há muitas mudanças de espécie dependendo da época e mudanças causadas principalmente pelo fluxo da população. Enfim, vários fatores devem ser levados em considerações como condições climáticas, práticas sociais e mobilidade de populações.

1.4.4 Portador assintomático

Outro fator importante nos casos de *Tinea capitis* causados por fungos antropofílicos, em especial o *T. tonsurans*, é o estado de portador em que há transmissão sem ter infecção. Estado de portador seria qualquer indivíduo que abriga em seu corpo (couro cabeludo) o fungo sem apresentar sintomas e distribui infecção, isto é, tem culturas positivas sem sinais clínicos de infecção²¹. A definição semiquantitativa impõem que indivíduos com

menos de dez colônias fúngicas são portadores e com mais de dez colônias são pessoas infectadas⁵. Alguns estudos em populações urbanas tem mostrado que cerca de 50% das crianças com *Tinea capitis* tem pelo menos um membro da família com cultura positiva¹¹.

O *T. tonsurans* por apresentar muitas vezes manifestações clínicas leve pode levar o individuo a ser considerado portador assintomático, em locais endêmicos cerca de 15% da população de risco pode se apresentar como portador assintomático. Embora tenha sido reportado em adultos, a maior parte é representada por crianças, especialmente entre 4 e 8 anos, com meninos e meninas igualmente infectados⁴⁰.

Na Espanha e Itália, que a *Tinea capitis* é rara, a prevalência de portador assintomático é de 0,2% em contraste com locais endêmicos onde a taxa de prevalência é de 49%^{5,21}.

1.5 Patogenia da *Tinea capitis*

A porta de entrada para a inoculação de um arthroconídio ou fragmento de hifa seria partir de uma lesão da pele ou excoriação preexistente, perda da integridade cutânea é em pacientes no qual haja a contaminação na superfície da pele. O parasita penetra a pele pela camada córnea, crescendo de maneira centrífuga, culminando em placa circular eritematosa com pápulas na borda e tendência a cura no centro³⁸.

A invasão dos pêlos por dermatófitos é secundária no homem. Inicia-se quando um filamento miceliano, depositado na pele, alcança o orifício folicular e penetra no pedículo através de sua ação sobre a cutícula. Os elementos fúngicos destacam a cutícula, penetram na espessura do pêlo avançando da superfície para a profundidade, em busca de uma nova fonte de queratina. A progressão dos fungos ao nível do bulbo piloso, à medida que vai metabolizando a queratina, forma uma linha de filamentos micelianos extremos denominada de “franja de adamson”^{40,71}. O crescimento dicotômico do dermatófito promove movimentos contrários, da profundidade contra a superfície do pêlo. O desconhecimento desta característica de crescimento fúngico indefiniu, por muito tempo, o tratamento da doença, visto que, antes do advento da griseofulvina, o uso tópico de soluções medicamentosas não era suficiente para esterilizar o pêlo, com os filamentos micelianos profundamente refugiados no interior do mesmo⁷.

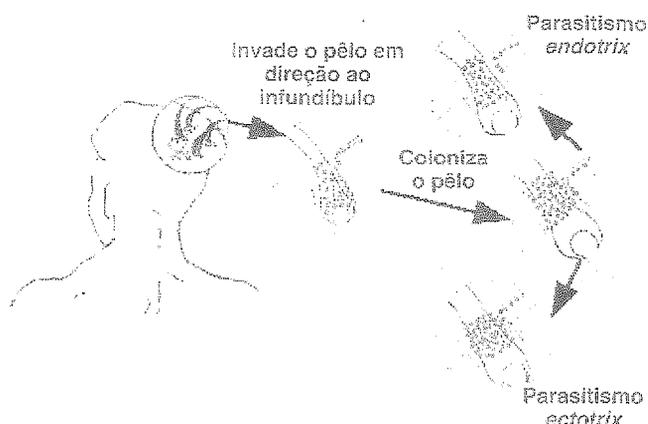


Figura1: Esquema exemplificando a invasão do pêlo pelo dermatófito

(Sidrim, J.J.C. e Rocha, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos, 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388 p., cap.14, 2004)

Quanto ao tipo de invasão pilosa, podemos classificar em *favus*, *endotrix* ou *ectotrix*^{21,55}. O tipo *favus* caracteriza-se por inflamação, gotas de líquido seroso que, quando dessecam, formam crostas amareladas ao redor do pêlo, que são denominadas de escútulas ou *godet*, formadas por conglomerados de hifas. Costuma tomar todo o couro cabeludo, poupando apenas a região da nuca e fronte. Este tipo de parasitismo associa cadeias de artroconídios, grupos pequenos de artroconídios e bolhas de ar dentro dos pêlos. O nome *favus* vem do latim favo de mel por ser semelhante às bolhas de ar no interior do pêlo²¹. O agente causador mais comum da *Tinea favica* é o *Trichophyton schoenleinii* mas pode ser causada também pelo *T. violaceum*. Este tipo de *Tinea capitis* foi a primeira doença fúngica diagnosticada. O tipo de parasitismo *endotrix* é causado principalmente pelo *T. tonsurans*, onde ocasionalmente se pode observar o *T. rubrum* como agente deste tipo de parasitismo. Eles invadem o pêlo, substituindo a estrutura central por cadeias de artroconídios que, ao emergir do folículo piloso, teria sua haste quebrada. Já o parasitismo *ectotrix* é frequentemente causado pelo gênero *Microsporum*, que se caracteriza pela presença de pequenos artroconídios em volta do pêlo (micróide *ectotrix*) ou cadeias de artroconídios grandes, também externos (*megaspórico ectotrix*) ou ainda numerosos artroconídios aglomerados e externos (*parasitismo microspórico*)⁷¹.

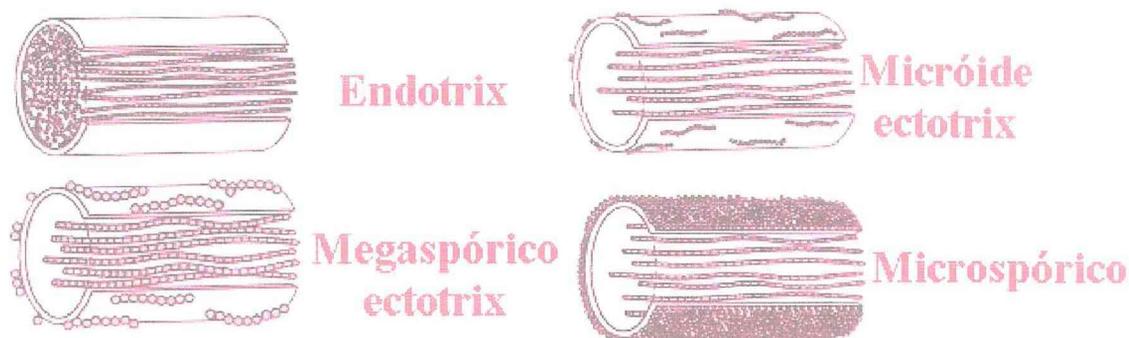


Figura 2: Desenho sobre os diferentes tipos de parasitismo piloso

(Sidrim, J.J.C. e Rocha, M.F.G. Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos, 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388 p., cap.14, 2004)

1.6 Considerações sobre o *T. tonsurans*

O *Trichophyton tonsurans*, como já expresso é um importante agente de *Tinea capitis* em crianças e adultos, desencadeando inúmeras microepidemias em locais muito populosos com creches e escolas e até pequenos surtos em pacientes hospitalizados em alas de confinamento. Este fungo é antropofílico de distribuição mundial sendo prevalentes em países da América Latina^{45,50}. *Tinea capitis* por *T. tonsurans* é mais difícil de diagnosticar que as microspóricas pois os pacientes apresentam na maioria das vezes sintomas leves quase que imperceptíveis⁵⁰. *T. tonsurans* tem baixo poder de infecção na pele glabra e em unhas.

Estudos mostram que o baixo nível socioeconômico contribui para o aumento da incidência de *Tinea capitis* causada por *T. tonsurans* sendo achado predominantemente em áreas urbanas^{5,21}. Este tipo pode ser transmitido entre pessoas, fios de cabelos infectados que tenham caído, fômites como escovas de cabelo, pentes, bonés e chapéus, roupas de cama, e ficam viáveis por meses^{21,53}. A quantidade de ácidos graxos saturados que são fungistáticos aumenta na puberdade e isto seria a explicação pela raridade da doença no adulto. Ocasionalmente, observa-se em mulheres após a menopausa, supostamente ao menor conteúdo fungistático do sebo por diminuição da secreção sebácea total²¹. Fatores como cabelos curtos e aplicação de óleos tem sido associados com predisposição. Outras possíveis explicações seriam a disseminação de uma infecção da pele glabra ou portadores assintomáticos. Podemos observar acometimento nos adultos imunocomprometidos.

Os maiores problemas no controle da *Tinea capitis* por *T. tonsurans* é devido a portadores assintomáticos de uma mesma família e pelo fato do *T. tonsurans* se manter viável

por muito tempo inclusive durante o tratamento⁵⁹. Fato este que pode ser ilustrado quando observamos que mesmo após um mês de tratamento com griseofulvina oral ainda há casos que se observa hifas no couro cabeludo⁵⁹.

1.7 Manifestações clínicas

As *Tíneas capitis* podem variar dentro de um espectro que consiste em portador assintomático, infecção não inflamatória crônica e infecção inflamatória aguda. O aspecto mais comum é a placa de tonsura, placas descamativas, muitas vezes eritematosas, alopecias com cotos pilosos rentes ao couro cabeludo. As lesões do tipo “black dot” são placas com cotos pilosos enegrecidos em razão da quebra do pêlo, por sua fragilidade, na sua emergência à superfície^{21,40}. Pode-se chamar de microspórica quando a placa de tonsura é única, grande, circular e bem delimitada ou tricofítica se as placas forem múltiplas, pequenas e mal delimitadas. A *Tinea favosa* promove inicialmente uma foliculite, lesando o folículo do pêlo e assim leva à perda definitiva do pêlo⁶⁰.

Algumas lesões clínicas lembram dermatite seborreica, como a descamação e o eritema. Cerca de 60% das *Tíneas* acometidas por *T. tonsurans* se manifestam desta maneira^{21,48}. Lesões inflamatórias agudas podem desenvolver pústulas, abscessos ou *kerion* placas inflamatórias com pústulas e muitas vezes associadas com linfadenopatia cervical dolorosa e eritema nodoso, impetigo-like^{21,38,40}.

Tinea tonsurante se caracteriza clinicamente como uma ou várias placas de alopecia com pequenos fragmentos de pêlos emergindo dos folículos pilosos. *Tinea supurativa* se caracteriza como uma placa eritematosa que acaba por culminar com edema, rubor e secreção purulenta, sinais clínicos que caracterizam o “*kerion Celsius*”, pouco dolorosa, com ou sem linfadenopatia e febre³⁸. A *tinea fávica* se caracteriza pela presença de escútuas e descamação difusa por todo o couro cabeludo, podendo haver foliculite intensa que pode levar a um processo cicatricial levando a uma alopecia definitiva.

Pacientes infectados por dermatófitos podem apresentar lesão clínica, como pápulas, placas ou vesículas, freqüentemente nas mãos, que não se isolam fungos, caracterizada por ser uma reação de hipersensibilidade à distância de uma lesão primária localizada em alguma região do corpo; não responde a antifúngicos e sim ao tratamento para resolução da lesão primária e é chamada de “ide”. O tratamento não deve ser descontinuado e, se necessário, pode-se usar corticóide tópico para minimizar os sintomas^{20,21}.

Tinea não inflamatória é mais comum associado com *M. audouinii*, *M. ferrugineum*, *T. tonsurans* e *M. canis*. As *tíneas* inflamatórias são associadas com fungos geofílicos e zoofílicos com *M. canis* ou *M. gypseum*, *T. verrucosum*, *T. schöeleinii*. A *Tinea fávica* é descrita na presença de fungos *T. schöeleinii*.

Um estudo realizado no Children's Mercy Hospital, no Kansas (EUA), sugeriu que a atividade de algumas enzimas proteolíticas do *T. tonsurans* teriam relação com o grau de severidade da doença; elas seriam potencialmente antigênicas.

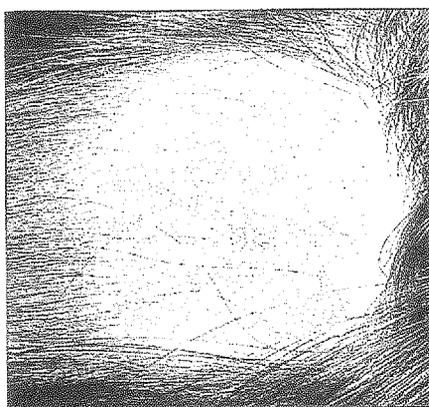


Figura 3: Tonsura em criança, do sexo masculino, com *Tinea capitis*
(Cox, N.H. & Lawrence, C.M., Diagnostic Problems in Dermatology, 1ªEd., p.9, 1998)

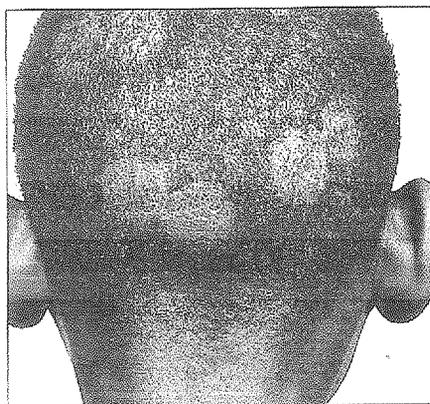


Figura 4: Descamação e tonsura em criança com *Tinea capitis*
(Cox, N.H. & Lawrence, C.M., Diagnostic Problems in Dermatology, 1ªEd., p.9, 1998)



Figura 5: Manifestação clínica inflamatória em criança, sexo feminino, com *Tinea capitis*
(*Kerion Celsius*)

(Du Vivier, A. Atlas de Dermatologia Clínica, 2ª Ed., p.13.10, 1997)

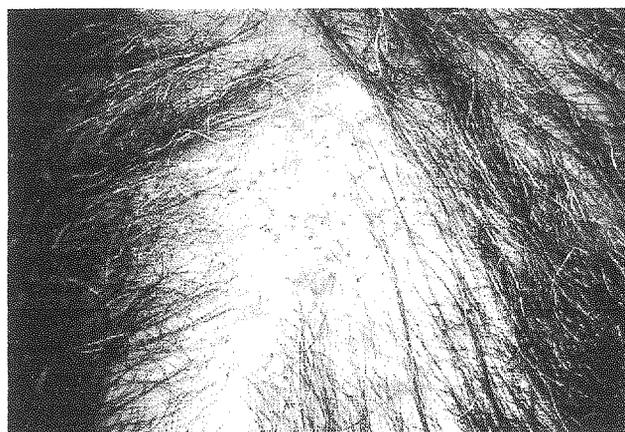


Figura 6: *Black dot* em paciente com *Tinea capitis*

(Fitzpatrick's. Dermatology in General Medicine, 5ª Ed., p.2643, 1999)

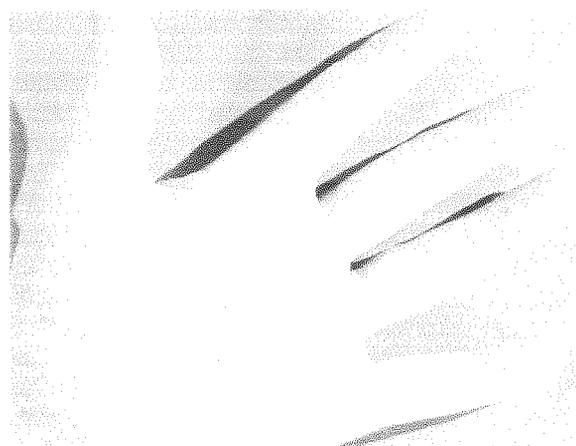


Figura 7: Reação de hipersensibilidade à distância (ide) de paciente com *Tinea capitis* (Tagliavini, R. Novo Atlas prático de dermatologia e venereologia, 3ª Ed., p.185, 1995)

1.8 Diagnóstico diferencial da *Tinea capitis*

1.8.1 Diagnóstico diferencial de *Tíneas* não inflamatórias

Os diagnósticos diferenciais considerados frente a um caso de *Tinea capitis* incluem dermatite seborreica, dermatite atópica, psoríase e pseudotinha³². Na dermatite seborreica, as escamas são oleosas, espessas, geralmente sem base eritematosa, e se localizam na linha de implantação do cabelo, canal auditivo externo, sulco nasogeniano, tórax e dorso. Na dermatite atópica, da infância, observamos placas eritemato-descamativas e regiões malares, couro cabeludo, pescoço, punhos e áreas das fraldas. Na psoríase, as escamas em geral são prateadas, brilhantes e a base é intensamente eritematosa. Por último, na pseudotinha, as escamas são espessas, esbranquiçadas e aderentes ao couro cabeludo.

Quando a alopecia é mais pronunciada, doenças como alopecia areata (AA), tricotilomania e sífilis secundária devem ser pensadas. Na AA, há placas ovais, lisas e brilhantes, sem atrofia e, na borda, pêlos com aspecto em “ponto de exclamação”. Na tricotilomania formam-se placas com pêlos partidos de tamanhos diversos. Por fim, na Sífilis secundária, o aspecto de “alopecia em clareiras” caracterizado por várias placas alopécicas difusas pelo couro cabeludo.

1.8.2 Diagnóstico diferencial de *Tineas* inflamatórias

A diferenciação é necessária com foliculite decalvante e com *Perifolliculitis capitis abscedens et suffodiens* que são doenças de origem bacteriana. Na foliculite decalvante há a formação de pústulas perifoliculares com crostas e áreas de alopecia cicatricial, enquanto na *Perifolliculitis capitis abscedens et suffodiens*, há formação de abscessos recorrentes intercomunicantes e evolui para alopecia cicatricial.

1.9 Identificação laboratorial do *T. tonsurans*

O gênero *Trichophyton* é o mais freqüentemente isolado, podendo acometer tanto a pele como os cabelos e unhas. O *T. tonsurans* é um parasita antropofílico clinicamente responsável por lesões tonsurantes no couro cabeludo.

Os procedimentos de rotina para a identificação do *T. tonsurans*, bem como das outras espécies de dermatófitos baseiam-se no exame de microscopia direta, exame macroscópico das colônias, na micromorfologia, velocidade e várias características fisiológicas como a produção da enzima urease, teste da perfuração do pêlo, crescimento em ágar arroz e requerimentos de certas vitaminas, como a tiamina e algumas outras fontes de carbono inorgânico como o inositol^{6,7,13,16}.



Figura 8: Parasitismo endotrix à microscopia direta pelo *T. tonsurans*
Preparação com Hidróxido de Potássio a 30%. 40x
(Du Vivier, A. Atlas de Dermatologia Clínica, 2ª Ed., p.13.9, 1997)

As colônias de *T. tonsurans*, quando inoculadas em ágar Sabouraud, iniciam seu crescimento rapidamente, por volta do 3-5º dias da sementeira primária e atingem a maturação

entre 12-16^o dia. Em ágar batata o *T. tonsurans* tem seu crescimento estimulado pela tiamina³⁰.

1.9.1 Macromorfologia do *T. tonsurans*

A macromorfologia do *T. tonsurans* apresenta aspecto bastante heterogêneo, com muitas variações, com textura que pode variar do algodonoso ao veludoso, podendo ainda mostrar-se furfurácea com o tempo. Quanto ao relevo, podem apresentar-se apiculadas, crateriformes, ou até mesmo cerebriformes com algumas pregas radiais²⁹.

Em relação à pigmentação, as colônias jovens apresentam pigmentos superficiais suaves que vão se difundindo pelo meio e tornando-se mais intensos com o tempo. As cores mais frequentemente encontradas variam de branco a creme. Em algumas cepas, é possível encontrar um pigmento castanho intenso ou até mesmo o vermelho vivo caracteristicamente produzido por cepas de *T. rubrum*^{29,30}.

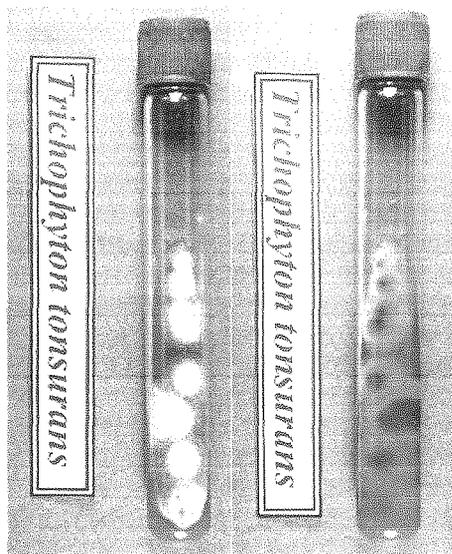


Figura 9: Achado macromorfológico do *T. tonsurans*, verso e reverso da colônia
(Foto gentilmente cedida pelo Prof. Sidrim, J.J.C.)

1.9.2 Micromorfologia do *T. tonsurans*

À microscopia óptica observam-se numerosos microconídios formados diretamente na hifa sempre em sentido contrário e de aspecto grosseiro, alguns piriformes outros globosos, dispostos em forma de acladium, clamidoconídios intercalares

principalmente em colônias mais velhas, hifas em raquetes, artroconídios e os macroconídios que quando presentes, são de aspectos irregulares e pouco contribuem para identificação final.

A identificação laboratorial dos fungos ainda segue quase que exclusivamente a análise de suas características fenotípicas exteriorizadas após crescimento em meios de cultura apropriados.

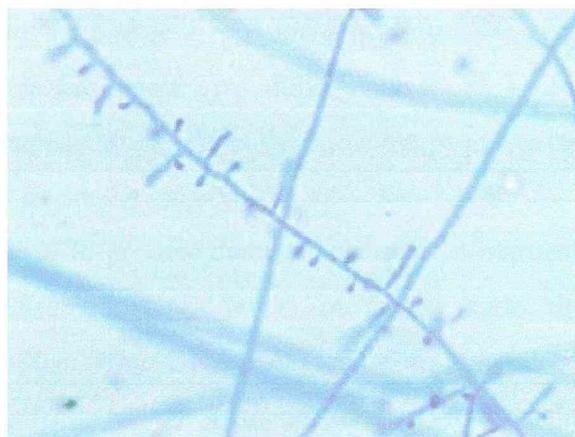


Figura 10: Achados micromorfológicos do *T. tonsurans*
(Foto gentilmente cedida pelo Prof. Sidrim, J.J.C.)

1.10 Biologia molecular do *T. tonsurans*:

Em geral, não se tem dificuldade em identificar os agentes causais das dermatofitoses com base nos estudos morfológicos. Algumas espécies, porém, podem variar ou se mostrar algumas vezes de maneira atípica promovendo, então, certa dificuldade de identificação em alguns casos. Recentemente, com o advento das técnicas moleculares como a PCR (Polymerase Chain Reaction) e seus posteriores avanços, é possível identificar e diferenciar alguns dermatófitos a partir do estudo de seu DNA.

A técnica de PCR é particularmente poderosa para estudos genéticos moleculares. Essa técnica envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão^{43,44,56}.

Desnaturação: a fita dupla de DNA alvo é desnaturada, através da elevação da temperatura para 92 - 95° C.

Anelamento: nessa etapa a temperatura é reduzida rapidamente para 35 - 60° C, dependendo essencialmente do tamanho e seqüência do *primer* (pequenas moléculas de DNA de fita simples utilizadas como iniciadores que delimitam a seqüência de DNA de fita dupla

alvo da amplificação), utilizado, permitindo a hibridação DNA – DNA de cada *primer* com as seqüências complementares que flanqueiam a região alvo.

Extensão: elevação da temperatura até 72° C para que a enzima DNA polimerase realize a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. Essa extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde à seqüência alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência alvo dobra cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo⁴³.

A tecnologia do PCR produz diversas classes de marcadores moleculares que podem ser aplicados num estudo do DNA inteiro ou fragmentado, um destes métodos é o RAPD (*random amplified polymorphic DNA*). A técnica de marcadores moleculares RAPD avançou a técnica PCR por utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a relação de amplificação, eliminando assim a necessidade de conhecimento prévio da seqüência. O RAPD é interessante porque requer uma pequena quantidade de DNA, é rápido e automatizado, sendo conveniente para estudos epidemiológicos⁵⁶. Tem-se apresentado com muita utilidade a realizar identificação de cepas atípicas, estudos de taxonomia e filogenéticos e para subclassificar espécies⁴⁴.

O uso de marcadores de RAPD tem-se mostrado útil nos estudos de microorganismos onde não se tem muita informação genética. Os oligonucleotídeos são construídos em seqüências aleatórias, revelando polimorfismo em toda a extensão do genoma. Tais polimorfismos são reconhecidos pela presença de um fragmento amplificado em um dos genomas em relação à ausência, deste mesmo fragmento de outro.

A análise com RAPD é, normalmente, realizada com DNAs celulares totais, isto é, tanto o mitocondrial como o cromossomial. Estudos de hibridização com plantas e fungos mostram que a maioria dos fragmentos originados do RAPD são cromossomiais, portanto o RAPD é considerado um marcador cromossomial⁵⁶.

No caso de cepas de *T. tonsurans* não se tem dificuldade em reconhecê-las através de seu estudo macro e micromorfológico, associado a estudos de requerimentos nutricionais, em centros especializados em Micologia, mas devido a sua grande variação fenotípica pode-se aprofundar o estudo através da avaliação de seu genótipo. Em centros de estudos não familiarizados com o *T. tonsurans* podem-se apresentar dificuldade em

distingui-lo do *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ou *T. megnii*, principalmente quando são isoladas cepas de expressão atípicas⁴³.

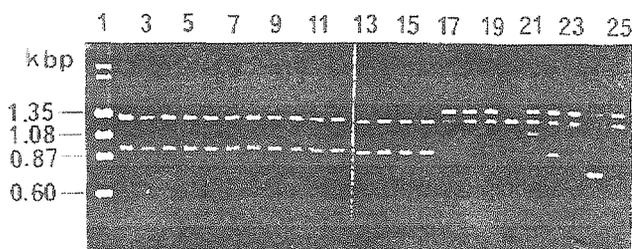


Figura 11: Perfil genético em RAPD dos *T. tonsurans* (2-15) e *T. mentagrophytes* (17-25) com primer OPAO-15

(Kim, J.A. *et al.* Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. *Mycopathologia.*, v.145, p.1-6, 1999.)

Diante do exposto coloca-se o seguinte questionamento se há homologia de DNA cromossomial entre as cepas de *T. tonsurans*, isoladas dos pacientes com *Tinea capitis* neste ensaio, e entre as cepas clássicas descritas na literatura?

1.11 Objetivo geral

Correlacionar o perfil genético ao fenotipo e o das cepas de *T. tonsurans* isoladas de pacientes portadores de *Tinea capitis*.

1.12 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência da *Tinea capitis* por *T. tonsurans* na população estudada evidenciando aspectos epidemiológicos.
- Avaliar o quadro clínico de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*.
- Estudar as características fenotípicas das cepas de *T. tonsurans*

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Estudo descritivo de corte transversal no período de agosto de 2002 a abril de 2003. Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará- COMEPE, no dia 29 de agosto de 2002, Of. número: 221/02 e protocolo número: 168/02. (ANEXO I)

2.2 População estudada

No período de agosto de 2002 a abril de 2003, foram atendidos 76 pacientes com suspeita clínica de *Tinea capitis*, envolvendo couro cabeludo e pêlos, no ambulatório de Micologia do Serviço de Dermatologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (Universidade Federal do Ceará). Os pacientes com suspeita de *Tinea capitis* eram encaminhados às segundas-feiras para realizar o preenchimento da ficha e coleta do material. **A busca por pacientes portadores de *Tinea capitis* foi conduzida até a obtenção de pelo menos 20 cepas de *T. tonsurans*.**

2.3 Critérios de inclusão

O estudo obedeceu aos seguintes critérios de inclusão:

- 1 pacientes com *Tinea capitis* tipo tonsurante tricoftica, microspórica, supurativa ou fávica;
- 2 *Tinea capitis* causada por dermatófito confirmados no exame micológico direto e cultura para fungos. A cultura deveria ser positiva;
- 3 pacientes que, com exceção desta doença, sejam saudáveis e tratados em ambulatório;
- 4 voluntários de ambos os sexos; e
- 5 idade entre 0 e 60 anos.

2.4 Critérios de exclusão

O ensaio obedeceu aos critérios de exclusão a seguir expressos:

- 1 pacientes que receberam tratamento sistêmico ou drogas que possam interferir no estudo durante os trinta dias.
- 2 uso de medicação antifúngica tópica nas últimas duas semanas antes da inclusão.
- 3 voluntários com doenças sistêmicas que cursam com imunossupressão.
- 4 voluntários com outras patologias do couro cabeludo associadas.
- 5 violação do protocolo.
- 6 desejo manifesto do paciente para se retirar do estudo.
- 7 gestantes.

2.5 Adesão ao protocolo

Os pacientes foram submetidos a um protocolo de investigação após consentimento informado (ANEXO II). Os pacientes com alterações clínicas sugestivas foram examinados e encaminhados à coleta de material de lesão no couro cabeludo. Os pacientes eram convidados a retornar no prazo de um mês para receber o resultado da microscopia direta e cultura; se positivo recebiam o tratamento com Griseofulvina (250mg/dia para as crianças com peso menor de 30kg e 500mg/dia para crianças com peso maior que 30kg e adultos) para 45 dias.

2.6 Colheita do material

A coleta se dava através de raspagem do couro cabeludo na zona de tonsura ou descamação, com uma lâmina de microscopia recém-quebrada ao meio, e retirada de alguns fios de cabelos tonsurados e/ou clinicamente anormais com uma pinça estéril. Após a colheita do material, eram preenchidas fichas epidemiológicas onde constavam informações sobre as características gerais das lesões (formato, número, presença de tonsuras, descamação, presença de “ide”, linfadenopatia, contato com animais, história familiar) (ANEXO III).

2.7 Procedimentos laboratoriais clássicos (ANEXO IV)

As amostras foram submetidas à microscopia direta, colocando-as em lâmina-lamínula na presença de agente clarificador KOH (hidróxido de potássio) a 40%, aguardado um tempo para que as substâncias clarificantes exercessem sua função e analisadas ao microscópio óptico com a objetiva de 40X.

O exame foi considerado positivo quando eram visualizadas estruturas fúngicas, tais como hifas artroconidiadas ou não e artroconídios; foram classificadas as amostras quanto ao tipo de parasitismo: endotrix ou ectotrix.

Junto ao exame direto, realizou-se cultura através de semeadura de uma alíquota do material em ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud com cloranfenicol (para diminuir o crescimento de bactérias contaminantes) e ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida (para inibir bactérias e fungos oportunistas). Os tubos foram incubados à temperatura ambiente, por um período de até 20 dias, com observações diárias a partir do 5º dia, até que se detectassem o crescimento e a maturação das amostras. A partir do desenvolvimento visual da colônia, retirava-se um pequeno fragmento, geralmente da parte central, das mesmas para análise das estruturas micromorfológicas de frutificação e ornamentação e, quando o agente identificado correspondia ao *Trichophyton tonsurans*, as cepas eram estocadas.

2.7.1 Estudo macromorfológico das colônias de *T. tonsurans*

As cepas estocadas foram repicadas nos seguintes meios de cultura: ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida.

A semeadura foi feita através da técnica de inoculação de pedaços da colônia obtida no ágar Sabouraud em três pontos equidistantes da superfície. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 20 dias, sendo realizadas observações diárias a partir do 5º dia de incubação e perdurando até 20º dia.

2.7.2 Estudo micromorfológico das colônias de *T. tonsurans*

Nessa etapa pesquisou-se a presença das estruturas de frutificação (macro e microconídios) e ornamentação (gavinhas, órgão nodular, hifa pectinada) e de resistência (clamidoconídio).

Para tanto, fragmentos das colônias desenvolvidas em ágar Sabouraud simples, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida nos tempo de crescimento equivalente ao 5º, 6º, 7º, 8º, 9º, 10º, 11º, 12º, 13º, 14º, 15º e 20º dias de incubação foram analisados.

Este estudo foi feito através da montagem de pequenos fragmentos das colônias, adicionada 1 ou 2 gotas do corante lactofenol azul-algodão, em lâminas de microscopia. Essas preparações foram levadas ao microscópio óptico e examinadas em aumento de 400x.

Realizou-se ainda o microcultivo que proporciona o estudo detalhado das diferentes estruturas fúngicas, bem como a disposição ao longo da hifa. A cultura em lâmina era montada mediante o corte, com bisturi, de blocos de 5mm x 5mm de ágar batata; estes blocos eram transferidos para lâminas de microscopia estéreis. Inoculava-se um pequeno fragmento de cultura aos quatros lados do bloco, cobria-se com uma lamínula estéril e incubava-se em uma câmara úmida estéril por um período de 15 a 20 dias à temperatura ambiente. Após este período, removia-se a lamínula com o micélio aderido do bloco de ágar, colocava-se um gota de lactofenol azul-algodão e uma lamínula cobrindo o material; levava-se ao microscópio para leitura e análise das estruturas ao longo da hifa. Esta análise era feita de maneira duplo-cega, oportunidade em que os observadores descreviam o número absoluto de micro, macro e clamidoconídios em cada campo. Determinou-se que deveria ser dois ou três campos por lado dos quadrados do bloco de ágar batata, totalizando 10 campos, observados no aumento de 40x. Calculava-se a média do número de estruturas e classificava-se dentro de intervalos prédeterminados. Quanto aos microconídios estes intervalos eram: < 10, 10-20, 20-50 e >50. Os macroconídios e clamidoconídios eram divididos em < 5, 5-10, 10-20 e >20.

2.7.3 Estudos das habilidades biológicas e ação enzimática das Cepas de *T. tonsurans*

- **Prova da uréase**

A prova da uréase é utilizada na identificação dos dermatófitos, sendo particularmente útil na diferenciação do *T. mentagrophytes* das demais espécies de *Trichophyton*. Este teste baseia-se na capacidade de algumas espécies de dermatófitos em produzir a enzima uréase, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, promovendo a mudança de coloração do meio de amarelo para rosa-escuro.

Um pequeno fragmento da colônia de *T. tonsurans* foi inoculado em ágar uréia de Christensen's e incubado à temperatura ambiente por cinco dias com observações diárias. O teste foi considerado positivo quando ocorreu a modificação da coloração do meio, com a viragem da cor inicial de amarelo para rosa. Nos tubos em que a coloração permaneceu amarela, a reação foi considerada negativa. A leitura deverá ser realizada até sete dias, uma vez que ao longo prazo, com o esgotamento do substrato ao meio, os dermatófitos morrem, liberando substâncias alcalinas ao meio o induzindo à viragem da coloração do meio, inutilizando o teste.

- **Prova da perfuração do pêlo *in vitro***

Este teste permite diferenciar o *T. mentagrophytes*, que apresenta órgão perfuradores típicos, de outras espécies de *Trichophyton*.

Para o teste da perfuração do pêlo *in vitro*, foi utilizada a seguinte metodologia: numa placa de Petri, de 70 mm de diâmetro, contendo o meio de cultura água gelosada, foram inoculados, de maneira equidistante, pequenos fragmentos das colônias a serem analisadas e sobre estas fêz-se o depósito de alguns fios de cabelo de uma criança loura pré-púbere, previamente esterilizados (este tipo de fio de cabelo foi utilizado por ser mais fácil visualizar as perfurações).

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por um período de até 40 dias, sendo que, a cada sete dias, retiravam-se alguns fios, sobre os quais o crescimento de colônias fúngicas podia ser detectado a olho nu. Esses fios de cabelo eram colocados sobre uma lâmina de microscopia com duas gotas do corante lactofenol azul-algodão. A preparação era então

levada ao microscópio óptico para a visualização de perfurações radiais no pêlo em decorrência da ação de órgãos perfuradores.

• **Prova de requerimentos nutricionais**

Estas provas são de grande valia na identificação das diferentes espécies de *Trichophyton*, pois possuem características de macro e micromorfologia, mas, na grande maioria das vezes, fundamentadas apenas nas diferentes exigências nutricionais.

A pesquisa das necessidades nutricionais de nossas cepas de *T. tonsurans* foi feita através da inoculação dessas cepas em uma bateria de meios de culturas suplementados de histidina, tiamina, ácido nicotínico, inositol, nitrato de amônia e caseína. Esses meios são conhecidos como Ágar T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ e T₇ na dependência dos componentes encontrados (a composição desses meios encontra-se descrita no apêndice).

Depois da suspensão pronta, esta era agitada num agitador eletrônico por 30 segundos e 100µl dela eram transferidos para os tubos de ensaio contendo os ágar T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ e T₇, os quais eram incubados por 14 dias em temperatura ambiente.

A leitura dos tubos foi feita através da quantificação subjetiva e comparativa do crescimento fúngico em cada tubo de ensaio contendo os diferentes requerimentos nutricionais (um tubo com ágar Sabouraud simples foi incorporado à bateria para servir de controle positivo, pois não contém nenhum suplemento vitamínico). Os valores eram comparados à tabela de valores adaptada de Larone, 1995.

Tabela: Provas nutricionais para diferenciação das espécies de *Trichophyton*. Adaptado de Larone (1995)

Dermatófito	ágar 1	ágar 2	ágar 3	ágar 4	ágar 5	ágar 6	ágar 7
<i>T. mentagrophytes</i>	+3	-	-	+3	+3	+3	+2
<i>T. rubrum</i>	+3	-	-	+3	-	+3	+3
<i>T. tonsurans</i>	-ou +1	-	-	+3	-	+/-	+/-
<i>T. terrestre</i>	+3	-	-	+3	-	+2	+2
<i>T. megninii</i>	-	-	-	-	-	0	+3
<i>T. scoenleinii</i>	+3	+3	+3	+3	-	-	-
<i>T. violaceum</i>	-ou+1	-	-	+3	-	-	-
<i>T. equinum</i>	0	-	-	-	+3	-	-

2.8 Extração do DNA

O protocolo utilizado foi o descrito Foster, G.D. e Twell, D., 1996. Foram selecionadas 20 cepas de *T. tonsurans* que foram estocadas em ágar batata na Micoteca do centro Especializado em Micologia Médica.

1º dia

Selecionadas as cepas retirou-se a amostra do meio de cultura da colônia que era colocada em meio BHI (brain, heart infusion) e posta em um *shaker* em 100rpi/min por aproximadamente 5 dias.

2º dia

- Extraiu-se o fungo do BHI, lavando com água destilada estéril por três vezes.
- Pré aqueceu-se o tampão de extração a 60° em banho-maria
- Foi adicionado 2-Mercaptoetanol ao tampão CTAB para concentração final de 0,2%.
- Adicionou-se suavemente o tecido pulverizado ao tampão de extração CTAB, usando tubo tipo Falcon de 15ml. Somou-se ao material, misturando gentilmente e homogeneizando repetidamente invertendo o tubo. Isto previne a formação de grumos de tecidos não digeridos.
- Incubou-se o tubo em banho-maria com agitação orbital a 60° C *overnight*.

3º dia

- Adicionou-se volume igual de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1). Misturamos invertendo o tubo várias vezes.
- Centrifugou-se a 2000-2500 rpm por 15 minutos à T A.
- Transferiu-se a fase aquosa para outro tubo devidamente marcado (usando ponteiras de ponta larga).

Nota: se a fase aquosa não estivesse clara, a extração clorofórmica deveria ser repetida

- O DNA foi precipitado, através da adição de 2/3 volume de isopropanol 100% à fase aquosa, misturando por inversão, deixando o complexo ácido nucléico-CTAB precipitar *overnight* para aumentar o rendimento de DNA.

4º dia

- Centrifugou-se a 2000 rpm à temperatura ambiente por 5 minutos. Descartou-se o sobrenadante por inversão, removendo o restante com uma pipeta.
- Foi ressuscitado o *pellet* em um mínimo de volume (usualmente 2ml é suficiente) de NaCl 1M
- Adicionou-se 2,5 volume de etanol 100% gelado, misturando por inversão.
- Centrifugou-se a 2000rpm por 5 minutos a TA
- Lavou-se o *pellet* com etanol 70%, centrifugou-se por 5 minutos para recuperar o *pellet*.
- Removeu-se o sobrenadante e esperou-se que o *pellet* secasse, mas não muito.
- Ressuscitou-se o *pellet* em água estéril (em quantidades pequenas deve se adicionar 100µl)
- Estimou-se a concentração, determinando a absorbância a 260nm e analisou-se uma alíquota em eletroforese em gel de agarose.
- Eram então armazenadas em *eppendoffs*, devidamente marcados.

Obs: tampão de extração 2% CTAB(m/v) (tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio), 1.4 M de NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2% 2-mercaptoetanol é adicionado ao tampão autoclavado logo antes do uso.

Todos os meios de cultura, corantes e soluções usados nessa pesquisa encontram-se descrito no anexo deste trabalho.

2.9 RAPD (random amplified polymorphic DNA)

Após extração do DNA das 20 cepas de *T. tonsurans* previamente selecionadas, estes foram, então, submetidos a amplificação e análise através do random amplified polymorphic DNA (RAPD).

A análise do RAPD foi realizada com o volume final total de 100µl, contendo 5µl de DNA genômico (50ng), 8µl de dNTP (2.5mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 0,5µl de 5U/ µl de Taq polymerase (Invitrogen BRA-RS), 10 µl de tampão de PCR 10x, 2,5 µl de 20pM de primer and 74 µl de água destilada. Foi utilizado o *primer* OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3', Invitrogen-BRASIL). A reação foi executada no aparelho PCR System 9700 (Perkin Elmer-USA) de acordo com o seguinte protocolo: a amplificação foi iniciada a 94°C, por 2 minutos para a desnaturação inicial, seguida por 40 ciclos de 1 minuto, a 94°C (desnaturação seguinte), 1 minuto a 34°C (anelamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), mais uma etapa, de 10 minutos, a 72°C para a completa extensão pela taq polimerase de todas as cadeias complementares. Após amplificados, foram visualizados em géis de poliacrilamida corados pela prata.

3 RESULTADOS

3.1 População estudada

Foram avaliados 76 pacientes, no período de oito meses, com suspeita clínica de *Tinea capitis*, sendo coletada de cada paciente apenas uma amostra de escama do couro cabeludo. Os resultados, mostrados na Tabela 1, revelam que, das 40 (52,63%) amostras que apresentaram culturas positivas, 32 (42,11%) tiveram microscopia direta positiva .

Tabela 1: Avaliação de positividade das microscopias direta com KOH e culturas das amostras de couro cabeludo

	Cultura positiva	Cultura Negativa	Total
Microscopia com KOH (+)	32 (42,11%)	2 (2,63%)	34 (44,74%)
Microscopia com KOH (-)	8 (10,53%)	34 (44,74%)	42 (55,26%)
Total	40(52,63%)	36(47,37%)	76 (100%)

Analisando o valor da microscopia direta frente à cultura, calculou-se sua sensibilidade, que foi 80%, enquanto a especificidade foi de 94%. O valor preditivo positivo foi de 94% e o valor preditivo negativo foi de 80%. A razão de verossimilhança do teste positivo é de 16, isto é, é dezesseis vezes mais provável encontrar microscopia direta positiva em um paciente com *Tinea capitis* quando comparado ao não doente.

3.2 Dados epidemiológicos gerais e clínicos de pacientes com suspeita de *Tinea capitis*

3.2.1 Pacientes com suspeita de *tinea capitis* quanto ao sexo

Dos 76 pacientes com suspeita de *Tinea capitis*, 46 (60,52%), eram do sexo feminino e nos pacientes com cultura positiva o sexo feminino representou 34,21% (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição dos pacientes com suspeita de *Tinea capitis* quanto ao sexo

<i>sexo</i>	<i>Cultura positiva</i>		<i>Cultura negativa</i>		<i>Total</i>	
Masculino	14	18,42%	16	21,05%	30	39,47%
Feminino	26	34,21%	20	26,31%	46	60,52%
Total	40	52,63%	36	47,36%	76	100%

3.2.2 Pacientes com suspeita de *Tinea capitis* quanto à idade

A faixa etária que procurou mais auxílio médico foi a de 6-10 anos com 33 (43,42%) pacientes. Dos pacientes com cultura positiva, entretanto, observou-se que a maior incidência (17 (22,36%)) está no intervalo de 0 a 5 anos (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição, por faixa etária, dos pacientes com suspeita clínica e diagnóstico confirmado de *Tinea capitis*.

Faixa etária	Cultura positiva		Cultura negativa		Total	
0-5 anos	17	22,36%	8	10,52%	25	32,89%
6-10 anos	14	18,42%	19	25%	33	43,42%
11-15 anos	6	7,89%	5	6,57%	11	14,47%
Maior 15 anos	3	3,94%	4	5,26%	7	9,21%
Total	40	52,63%	36	47,36%	76	100%

3.2.3 Fatores predisponentes dos pacientes com suspeita de *Tinea capitis*.

Observou-se que, dos 76 pacientes, 25 (32,89%) com cultura positiva para *Tinea capitis* relataram história familiar de dermatofitose e 30 (39,47%) tiveram contato com outras crianças em escolas ou creches. Apenas 22(28,94%) dos pacientes com cultura positiva para dermatófito apresentaram contato com animais (Tabela 4).

Tabela 4: Fatores predisponentes entre os pacientes com suspeita de *Tinea capitis*.

Fatores Predisponentes	Cultura positiva		Cultura negativa		Total	
	Contato com animais	22	28,94%	22	28,94%	44
Contato com plantas/solo	7	9,21%	18	23,68%	25	32,89%
Creche/escola	30	39,47%	14	18,42%	44	57,89%
História Familiar Positiva	25	32,89%	16	21,05%	41	53,94%

3.2.4 Manifestações clínicas dos pacientes com suspeita de *Tinea capitis*

A descamação 34 (44,73%), o eritema 16 (21,05%) e a tonsura 24 (31,57%) foram as principais manifestações clínicas presentes em pacientes com suspeição e diagnóstico laboratorial de *Tinea capitis*.

Por outro lado, pode-se observar, que dos 66 (86,64%) pacientes que apresentaram descamação, 32 (42,10%) tiveram cultura negativa, aproximando-se este valor ao dos pacientes com cultura positiva.

A tonsura com *black dot*, apesar de ter sido observado em apenas 6 (7,89%) pacientes mostrou-se como uma manifestação específica dos pacientes com *Tinea capitis*, visto que não foi observado esse achado clínico em nenhum paciente com cultura negativa. (Tabela 5)

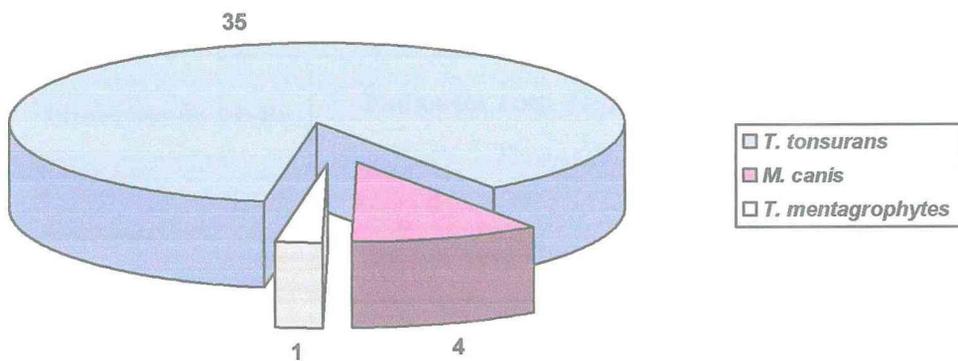
Tabela 5: Manifestações clínicas dos pacientes com suspeita de *Tinea capitis*

Manifestações clínicas	Cultura positiva		Cultura negativa		Total	
	Descamação	34	44,73%	32	42,10%	66
Eritema	16	21,05%	20	26,31%	36	47,36%
Tonsura	24	31,57%	11	14,47%	35	46,05%
<i>Black dot</i>	6	7,89%	0	0%	6	7,89%
Abscesso	2	2,63%	3	3,94%	5	6,57%
Pústula	1	1,31%	7	9,21%	8	10,52%
Crosta	3	3,94%	4	5,26%	7	9,21%
Linfadenopatia	9	11,84%	11	14,47%	20	26,31%

3.3 Espécies isoladas

Das 76 amostras analisadas, foram isoladas 35 *Trichophyton tonsurans* (15 a mais que o previsto), quatro *Microsporum canis*, e um *Trichophyton mentagrophytes* (Gráfico 1).

Gráfico 1: Espécies isoladas

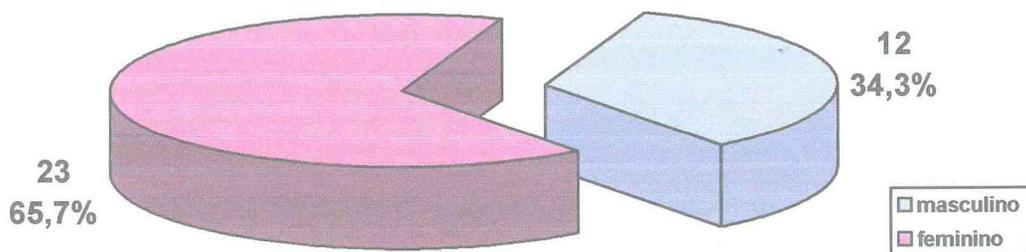


3.4 Dados epidemiológicos e clínicos de pacientes com cultura positiva para *T. tonsurans*

3.4.1 Distribuição quanto ao sexo

Foram observados 23(65,7%) pacientes do sexo feminino e 12 (34,3%) do sexo masculino entre os doentes com cultura positiva para *T. tonsurans* (Gráfico 2) .

Gráfico 2: Distribuição quanto ao sexo de paciente com *T. tonsurans*



3.4.2 Faixa etária de pacientes com *Tinea capitis* por *T. tonsurans*

Os intervalos de idade em que se observou maior incidência de *Tinea capitis* por *T. tonsurans* foram o de 0 - 5 anos com 14 (40%) pacientes e o de 6 - 10 anos com 12 (34,28%) pacientes perfazendo o somatório das duas faixas de 74,28% dos pacientes com *Tinea capitis* por *T. tonsurans*. (Tabela 6)

Tabela 6: Distribuição, por faixa etária, de pacientes com *Tinea capitis* por *T. tonsurans*.

Intervalo de idade	Pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	
0-5 anos	14	40%
6-10 anos	12	34,28%
11-15 anos	6	17,14%
Maior 15 anos	3	8,58%
Total	35	100%

3.4.3 Fatores predisponentes de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*

Dos 35 pacientes, 26 (74,28%) relataram contato com outras crianças em escolas ou creches como atividade diária, entretanto, este contato não necessariamente era com crianças infectadas. História familiar de dermatofitoses foi relatada por 22(62,8%) pacientes. Paradoxalmente, foi relatado por 17(48,5%) pacientes contato com animais de estimação (Tabela 7).

Tabela 7: Fatores predisponentes de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*

Fatores predisponentes	Pacientes com <i>Tinea capitis</i> por <i>T. tonsurans</i>	
Contato com animais	17	48,5%
Contato com plantas/solo	7	20%
Creches/escolas	26	74,28%
História familiar positiva	22	62,8%

3.4.4 Manifestações clínicas dos pacientes com *T. capitis* por *T. tonsurans*

A descamação foi a manifestação mais frequente, sendo observada em 30 (87,71%) pacientes; já a tonsura foi observada em 20 (57,1%) pacientes. Em contrapartida, achados clínicos relacionados a resposta inflamatória intensa não apresentam uma grande incidência. Assim, foram observados pústulas em apenas 1 (2,9%) paciente, crostas em 5 (14,3%) e infartamento ganglionar em 7 (20%) (Tabela 8).

Tabela 8: Manifestações clínicas dos pacientes com *T. capitis* por *T. tonsurans*

Manifestações clínicas	Pacientes com <i>T. tonsurans</i>	
Descamação	30	(85,7%)
Eritema	13	(37,1%)
Tonsuras	20	(57,1)
<i>Black dot</i>	6	(17,14%)
Pústulas	1	(2,9%)
Crostas	5	(14,3%)
Abcesso	0	0%
Linfonodos infartado	7	(20%)

3.4.4.1 Características das tonsuras por *T. tonsurans*

Foi observado que as lesões com tonsuras eram em sua maioria únicas (8 (40%)) com dimensão entre 1-3 cm (12 (60%)) e localizadas na região parietal (10 (50%)) (Tabela 9).

Tabela 9: Características das tonsuras dos pacientes com *Tinea capitis* por *T. tonsurans*

Número de tonsuras		Tamanho das tonsuras		Localização das tonsuras	
Única	8	1-3cm	12	Região frontal	4
1 a 3 placas	5	3-5cm	8	Região parietal	10
3 a 5 placas	2	Maior 5cm	0	Região occipital	0
Mais 5 placas	4	Total	20	Difusa	6
Total	20			Total	20

3.5 Achados laboratoriais dos pacientes com *T. tonsurans*

Foram avaliados achados macromorfológicos da cultura do *T. tonsurans*, tais como relevo, textura, coloração do verso, coloração do reverso. Em adição, a micromorfologia também foi analisada, visando detectar a presença e quantidade de estruturas de frutificação e ornamentação e, por último, foram avaliadas as necessidades nutricionais, habilidades enzimáticas e biológicas destas culturas.

3.5.1 Aspectos macromorfológicos das colônias de *T. tonsurans*

As culturas positivas para *T. tonsurans* apresentaram-se com predominância dos aspectos macromorfológicos, relevo apiculado 23 (82%), textura arenosa 10 (35,7%) ou com variações de glabrasas 10 (35,7%), coloração do verso bege/creme 17 (60,7%) e coloração do reverso castanho-escuro 25 (89,2%) (Tabela 10).

Tabela 10: Aspectos macromorfológicos das colônias de *T. tonsurans*

Macromorfologia	Cepas de <i>T. tonsurans</i>	
Relevo	Apiculado	23(82,14%)
	Crateriforme	0 (0%)
	Rugoso	3(10,71%)
	Cerebriforme	2(7,14%)
	Total	28(100%)
Textura	Glabrosa	4(14,29%)
	Algodonosa	0(0%)
	Periferia glabrosa	6(21,42%)
	Furfurácea	2(7,14%)
	Arenosa	10(35,71%)
	Veludosa	6(21,43%)
	Total	28(100%)
	Coloração do verso	Castanho claro
Bege/creme		17(60,71%)
Amarelo		3(10,71%)
Cobre		1(3,57%)
Total		28(100%)
Coloração do reverso	Castanho escuro	25(89,29%)
	Amarelo	3(10,71%)
	Total	28(100%)

3.5.2 Aspectos micromorfológicos das colônias de *T. tonsurans*

Nas variáveis da micromorfologia das colônias de *T. tonsurans*, foram avaliadas a quantificação da média de clamidoconídios/campo em 10 campos e a quantidade de macro e microconídios. Quase toda totalidade das amostras evidenciou de 1 a 10 clamidoconídios por campo 27(96,4%). Quanto aos microconídios, 18 (64,2%) amostras apresentaram estas estruturas numa média de 10 -50 unidades por campo; em contrapartida, não se observou a presença de macroconídios. (Tabela 11)

Tabela 11: Aspectos e quantificação micromorfológica das colônias de *T. tonsurans*

Micromorfologia	Cepas de <i>T. tonsurans</i>	
Clamidoconídios	1-5 unidades	14 (50%)
	5-10 unidades	13(46,43%)
	> 10 unidades	1(3,57%)
	Total	28(100%)
Microconídios	5-10 unidades	2(7,14%)
	10-50 unidades	18(64,29%)
	>50 unidades	8(28,57%)
	Total	28(100%)
Macroconídios	0 unidades	28 (100%)

3.5.3 Ação enzimática habilidades biológicas e requerimentos nutricionais

Na prova da uréase, 18 (64%) amostras produziram a enzima uréase; em contrapartida não foi observada a perfuração de pêlo em nenhuma amostra.

As provas de requerimento nutricional são de grande valor na identificação das diferentes espécies de dermatófitos. No estudo, observou-se que cerca de 18 (64%) cepas cresceram muito bem em T3 (rico em inositol e tiamina) e 17 (60,7%) cepas cresceram bem em T4 (rico em tiamina) (Tabela 12 a e b).

Tabela 12 a e b: Habilidades biológicas, ação enzimática e requerimentos nutricionais

a)

Perfuração do pêlo	(+)	0	0%
	(-)	28	100%
Atividade enzimática	Uréase (+)	18	64%
	Uréase (-)	10	36%

b)

Meios de cultura	0	+1	+2	+3	+4	Total
T1	5	8	5	4	6	28
T2(inositol)	2	4	6	5	11	28
T3(inositol e tiamina)	2	2	2	4	18	28
T4(tiamina)	3	1	4	3	17	28
T5(ac. nicotínico)	12	3	4	6	3	28
T6(dextrose)	23	3	0	1	1	28
T7(histidina)	25	0	1	1	1	28

Legenda: 0: sem crescimento; 1:muito pouco crescimento; +2: pouco crescimento; +3: crescimento regular; +4: bom crescimento; 5: ótimo crescimento.

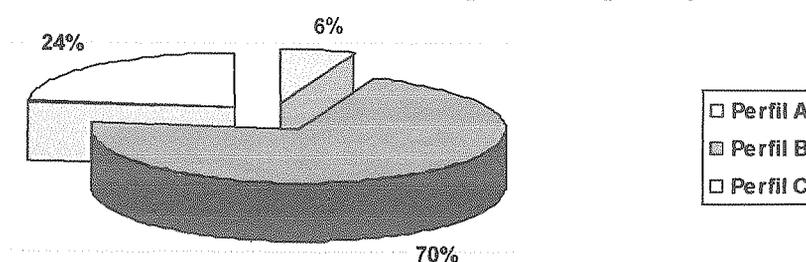
3.6 Extração do DNA e análise do RAPD com o primer OPAO-15

Das 35 amostras de *T. tonsurans* isoladas foram extraídos DNA de apenas 20 amostras das quais somente 17 tiveram seu material genético isolado adequadamente. Após a extração do DNA de dezessete cepas de *T. tonsurans*, estas foram analisadas com o objetivo de correlacionar o genótipo às características epidemiológicas clínicas e fenotípicas das amostras isoladas e avaliar a homogeneidade das cepas entre si e com as descritas na literatura, ditas clássicas.

As cepas foram codificadas de acordo com os números seguintes: 01.12, 017, 023, 025, 026, 295, 2.296, 297, 300, 301, 302, 304, 306, 307, 309, 310 e 311.

Obteve-se três padrões genéticos diferentes entre as cepas de *T. tonsurans*. (gráfico 3)

Gráfico 3: Distribuição das cepas de *T. tonsurans* quanto ao perfil genético em RAPD



O primeiro padrão, chamado de perfil genético A, representado pela cepa de código 295, onde verificou-se a produção de bandas que migraram à 0.1, 0.2, 0.6 kbp e outras acima de 0.7 kbp. O segundo padrão, perfil genético B, é o representado por 15 cepas: 300, 301, 302, 304, 309, 311, 01.012, 025, 297, 307, 306, 2.296, com produção de bandas de 0.1, 0.6 e 1.5 kbp e algumas bandas acima de 2.0 kbp. O terceiro padrão, perfil genético C, aparece nas colunas 15, 16, 17 e 19. Há bandas posicionadas em 0.1 kbp, bandas entre 0.2 e 0.6 kbp e produção de duas bandas acima de 1.5 kbp.

Em relação às manifestações clínicas, o perfil genético A é representado por uma cepa em que o paciente apresentava descamação, eritema e tonsura. No perfil genético B, das 12 cepas, 83% (10) dos pacientes apresentavam descamação, 10 pacientes (83%) tonsuras, 41% (5) apresentavam eritema, 16% (2) pacientes apresentavam tonsura com *black dot*. Quanto ao perfil genético C, 100% das cepas (4) representavam pacientes com descamação e só um doente com tonsura.

Do ponto de vista laboratorial, 75% (9) cepas do perfil genético B apresentaram teste da uréia positivo e 100% (12 cepas) cresceram bem em meio rico em tiamina (ágar T3 ou ágar T4). Quanto ao relevo da colônia, na macromorfologia, 11 cepas (91%) apresentaram o tipo apiculado. A textura apresentou uma grande variação entre as cepas que representam o perfil genético B

4 DISCUSSÃO

Tinea capitis é uma das dermatofitoses mais freqüente nos seres humanos, correspondendo a cerca de 10% a sua prevalência, podendo variar com a região. Sabe-se também que a distribuição geográfica dos dermatófitos pode variar segundo sua adaptação ao meio ambiente, com migração humana, convívio com animais domésticos, aspectos socioeconômicos, sexo, idade e imunidade^{15,21}.

Observou-se, com o estudo, que a flora dermatofítica de um lugar obedece uma ciclicidade de tempo. Algumas espécies são as mais prevalentes em um local por um determinado tempo, passando por um declínio, sendo então mais difícil isolá-las em outro momento, mas podendo tempos mais tarde restabelecer sua antiga incidência¹⁷.

Neste trabalho, dos casos suspeitos de *Tinea capitis* (76 pacientes), confirmou-se o diagnóstico através da cultura positiva em 40 pacientes (60,52%). Todas as amostras dos pacientes foram, então, submetidos à microscopia e à cultura, independentemente do resultado da microscopia direta. Em um estudo em São Paulo foram realizados exames de microscopia direta em 353 com clínica de *Tinea capitis*, entretanto a cultura foi realizada em apenas 164 pacientes que apresentaram microscopia direta positiva¹⁷. Neste ensaio foram observadas alta sensibilidade (80%) e alta especificidade (94%) da microscopia direta, o que a situa em posição de destaque, já que é mais rápida e barata do que a cultura considerada padrão-ouro. Este estudo mostrou que 80% (32 pacientes) das culturas positivas apresentaram microscopia direta positiva. Estudo realizado em dez anos na cidade de São Paulo sobre dermatófitos revelou que apenas 4,2% dos exames micológicos direto positivos foram enviados para cultura por baixo número de requisições por parte do médico, resolvendo o caso apenas com a microscopia direta¹⁴. Em revisão sobre *Tinea capitis* no ano de 2000, observou-se que a microscopia era suficiente para evidenciar hifas ou esporos nos fios de cabelos e para caracterizar o tipo de parasitismo, permitindo realizar o tratamento; pois, pela clínica e conhecimento epidemiológico da região, poder-se-ia supor o agente etiológico²¹.

De alguns estudo realizados em regiões como o Norte e Nordeste, notou-se que o *Trichophyton tonsurans* é o principal agente etiológico isolado em casos de *Tinea capitis* nestas regiões. Este estudo revelou que 35 (87,5%), dentre os 40 casos de *Tinea capitis*, que eram causados por *T. tonsurans*⁹. Em estudo realizado em Fortaleza, em 2000, observou-se

que, entre os casos de *Tinea capitis*, o agente mais isolado foi o *T. tonsurans* 73,9%, corroborando os resultados deste estudo onde este dermatófito foi o mais prevalente⁹. Estudo realizado de 1980 a 1987, também na cidade de Fortaleza revelou que 87,9% das *Tinea capitis* foram causadas por *T. tonsurans*³¹. Trabalho realizado em Goiânia, de janeiro a dezembro de 1999, mostrou o *M. canis* como o agente mais prevalente, com 60,3% dos casos de *Tinea capitis*¹⁵. Outro estudo de Goiânia, mais atual, realizado no período de janeiro de 1999 a julho de 2002, com 164 casos de *Tinea capitis*, revelou 71,3% de *M. canis* e apenas 11% de *T. tonsurans*, ratificando o estudo anterior¹⁷. Em Maringá, uma investigação clínica realizada durante 11 anos, no período de agosto de 1989 a julho de 2000, 64% dos casos representavam *Tinea capitis* causada por *M. canis*⁶⁰. Estudos clássicos da literatura anteriores à década de 1970 referiam que o *M. canis* seria o agente mais isolado dentre os casos de *Tinea capitis*^{40,63}. Em São Paulo, no período de 1996 a 1998, observou-se também que o fungo predominante foi o *M. canis*³. Um outro estudo também em São Paulo, no período de 1992 a 2002, mostrou que 65% de casos de *Tinea capitis* eram por *M. canis* e apenas 28% o agente etiológico era o *T. tonsurans*¹⁴. Em contrapartida, estudos mais recentes mostram o aumento excepcional de casos por *T. tonsurans*. Gupta e Summerbell relatam que a frequência de *Tinea capitis* por *T. tonsurans* subiu de 9% para 76% entre os anos 1985 e 1996 em Ontário, no Canadá³⁹.

O *M. canis* ainda é o agente mais isolado nos laboratórios da Europa, mas o grande aumento dos casos de *T. tonsurans* vem colocando este agente em posição de destaque e necessidade de maiores estudos. Por ser antropofílico e comprovadamente contagioso entre crianças, acredita-se que o seu aumento tem relação direta com as circunstâncias em que vive hoje as populações de baixa renda, com moradia precária e em aglomerados²¹. Especificamente na cidade de Fortaleza, *T. tonsurans* vem se mantendo como o principal agente causador de *Tinea capitis* há mais de uma década, como mostram os estudos de Gonçalves e cols em 1989 e de Brilhante e cols em 2000^{9,31}. Estes resultados levaram os autores a valorizar a influência socioeconômica nestes estudos. Enquanto nas regiões mais ricas o maior causador da doença foi um fungo zoofílico, a espécie mais prevalente no Nordeste é antropofílica, que está bem adaptada ao meio^{28,31}. Quando se trata de fungos antropofílicos, pode-se esperar epidemias de maior monta, visto que os fungos são mais adaptados ao homem.

Este trabalho mostrou maior prevalência entre as mulheres. Dos 40 casos com cultura positiva, 26 (65%) eram do sexo feminino e 14 (35%) eram do sexo masculino e, entre os casos de *Tinea capitis* causada apenas por *T. tonsurans* (35 pacientes), 23 (65,7%) eram

mulheres (mais da metade). Em estudo realizado em Fortaleza nas mesmas condições, o sexo feminino correspondeu a mais de duas vezes a incidência do sexo masculino⁹. Quanto ao sexo, algumas pesquisas mostram que as *Tinea capitis* são praticamente equiparados. Estudo realizado em João Pessoa relata que 52,8% eram do sexo feminino e 47,2% eram do sexo masculino³. Londero & Ramos, em 1963, relataram maior prevalência no sexo masculino em trabalho realizado no Rio Grande do Sul (67,6%)⁵². Vieira *et al* em 1965, no Recife, encontrou-se maior frequência nos homens⁸. Towersey *et al*, em 1987, relatou em Niterói aumento discreto no sexo masculino⁸. Em Manaus, Sousa, F.H.C., (em 1997), apresentou resultados com o sexo feminino prevalente em números semelhantes aos da presente investigação⁷⁴. Na Grécia (2000), o sexo feminino foi acometido igualmente ao masculino⁶⁰. Em estudo realizado em Chicago (EUA) ,em 1983, o predomínio do sexo feminino foi discreto¹⁰. Na publicação sobre *Tinea capitis* em Londres (1996), foram avaliadas 514 crianças, tendo sido relatada a equiparação quanto ao sexo (49% do sexo feminino e 51% do sexo masculino), o patógeno mais incidente foi o *T. tonsurans* (38%)⁴¹.

O motivo da discordância na literatura é a variação do agente etiológico envolvido. Elewski *et al* (2000) relata que, em casos de *Tinea capitis* causados por *M. canis*, os homens seriam mais infectados por terem mais contato com animais²¹. Nos casos em que o agente etiológico é um *Trichophyton*, podem variar com a idade; nas crianças, o sexo masculino e feminino seriam equivalentes e, nos adultos, a predominância é nas mulheres²¹. Nos casos de *Trichophyton tonsurans*, observou-se predomínio nas mulheres o que poderia ser explicado pelo maior contato delas com crianças infectadas e pelo uso de cremes e óleos nos cabelos, o que facilita a adesão dos arthroconídios nos fios⁵⁰.

No que diz respeito à idade, no presente ensaio, a maior incidência foi no intervalo de 0-5anos (40%), considerando que apenas um doente se apresentava com idade inferior a 2 anos (1ano e 8 meses). As crianças entre 2 e 5 anos foram as mais frequentes, seguidas pelas crianças entre 6-10 anos(34,28%). Em idade superior, os hormônios estimulam as glândulas sebáceas e dificultam a aderência dos arthroconídios, pois o sebo possui fatores inibidores ao crescimento do fungo¹⁷.

Londero *et al* (1963) observaram durante seis anos, no Rio Grande do Sul, de modo, semelhante a este estudo, o predomínio da faixa etária de 0-5 anos⁵². Em estudos realizados na Austrália a faixa etária de 0-5 anos, foi a mais incidente (61,1%)⁵⁴; no Qatar ¹⁹, na Arábia Saudita⁷⁶, em Florença na Itália²⁴, também evidenciaram a faixa etária entre 0-5 anos como a mais freqüente. Em contrapartida, em Manaus²⁸ observou-se que a faixa etária

entre 7-12 anos foi a mais predominante e; no Rio de Janeiro(1997), o grupo etário mais acometido foi entre 6-12 anos⁷⁴. Sehgal (1985), na Índia, encontrou metade dos casos entre 6-10 anos⁶⁹. Elewisk *et al* relatam o predomínio entre a faixa etária de 3-7 anos, nos casos de estudos revisados por eles, da Europa e Estados Unidos²¹. Estudos clássicos, como a revisão de Gupta & Summerbell, relatam o predomínio entre crianças e adolescentes em comparação aos adultos referenciando a maior frequência entre pessoas de 5-18 anos⁴⁰.

Diferente das *Tinea capitis* causadas por *Microsporum*, as em que o agente etiológico é o *Trichophyton* não se resolvem com a chegada da puberdade, associada a dificuldade no tratamento, altas taxas de recidivas e por serem recalcitrantes, podemos encontrar casos na vida adulta. Observa muito mais, porém, este adulto como portador assintomático do que como indivíduo doente. Estudo efetivado em Fortaleza na década de 1980 relatou a maior incidência entre crianças em idade escolar (7-12 anos)³¹. O estudo de Fortaleza (2000), ratificou o fato de que os indivíduos mais acometidos foram os compreendidos na faixa etária de 0-10 anos explicado pela maior exposição destas crianças a precários hábitos higiênicos e aglomerações de escolas e creches⁹. Estudo realizado em Goiânia (2003), demonstrou que a maior parte dos indivíduos eram crianças entre 3-13 anos e justificou-se pela ausência de ácidos graxos de cadeia média (C8-C12) ,no couro cabeludo, que inibem o desenvolvimento de dermatófitos nesta região do hospedeiro¹⁷.

Entre os fatores predisponentes já se teceu comentários quanto á alta incidência entre crianças, que reflete os hábitos precários e a maneira com vivem e estudam em aglomerados de creches e escolas^{9,21,31}. Algumas crianças são portadores assintomáticos, sendo assim fonte de contaminação de artroconídios transmitindo a doença, e muitas vezes sendo o motivo das reinfecções consideradas erroneamente como refratárias. A história familiar é um dos fatores predisponentes de maior destaque na literatura em virtude da grande frequência de portador assintomático no domicilio do indivíduo doente, estes indivíduos são os maiores reservatórios de fungos que causam *Tinea capitis* por fungos antropofílicos²¹. Neste estudo, a história familiar foi observada em 62,8% dos casos de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*, confirmando a facilidade de transmissão interpessoal deste fungo antropofílico e sua alta adaptabilidade em domicílios de indivíduos de baixo nível socioeconômico, que caracteriza a maior parte dos pacientes. Elewisk *et al* refere que a prevalência de *Tinea capitis* em contatos familiares é 5 vezes maior do que em um grupo de controle^{21,45}.

As manifestações clínicas da doença podem variar com o agente, sendo observado desde descamação do couro cabeludo à reação inflamatória intensa. A maioria apresenta a

forma clínica branda com eritema, descamação e tonsura, mas em alguns casos pode-se observar *kerion*⁷¹.

Os aspectos clínicos resultam da combinação de destruição da queratina associada a uma resposta inflamatória, mais ou menos intensa, na dependência do binômio parasita/hospedeiro. Nos casos de *Tinea capitis* tricoftica, a literatura caracteriza a lesão pela presença de mais de uma placa alopecica (tonsura) e que pode ser acompanhada de descamação e *black dot*^{21,40}.

Neste trabalho os achados segundo as manifestações clínicas corroboram a literatura quando mostram que a descamação ocorreu em 85,7% dos casos, o eritema em 37,1% e a tonsura em 57,1%. É descrito na literatura que as lesões não inflamatórias são mais comuns do que as inflamatórias. Mohamed *et al* (1999), no Paquistão, um estudo em que correlacionou a clínica e a etiologia das *Tinea capitis*, relatou que 56,4% de lesões eram não inflamatórias e 43,6% eram inflamatórias⁵⁷. Neste estudo, a lesão do tipo *black dot* apareceu em 6 indivíduos (17,14%). Apesar de baixa incidência, foi bem específica para os portadores de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*. Laude (1985), publicou em estudo epidemiológico que aproximadamente 60% dos casos de *Tinea capitis* se apresentam como descamação do tipo dermatite seborreica^{21,48}. O eritema pode refletir o início da infecção e então o desenvolvimento das escamas seria a evolução da lesão clínica. Gupta & Summerbell citam que lesões do tipo *black dot* são associadas a infecções por *T. tonsurans* e *T. violaceum*⁴⁰. Gonçalves & Lamy (1959), revelaram maior prevalência em lesões como descamação, eritema, tonsura e crostas⁶¹. Babel *et al* demonstraram, entre os seus casos de *Tinea capitis* que as lesões clínicas variavam em tonsuras com descamação, 48 pacientes (96%), *black dots* (86%), 19 pacientes (38%) com pústulas e 8% com linfadenopatia cervical discordante apenas na frequência de *black dot* e nas pústulas, muito maior no seu estudo⁶.

Neste estudo, caracterizou-se a tonsura quanto ao número, tamanho e localização e observou-se que a placa única (tipo *microspórica*- causada por *Microsporum*) foi a mais comum, indo contra a literatura que descreve as tonsuras como pequenas e múltiplas, neste estudo, observou-se que a maior frequência foi das tonsuras de 1-3cm (60%) e a localização mais comum foi a parietal (50%). Esta região anatômica do couro cabeludo é local de maior contato com escovas, pentes, chapéus e bonés, sendo também de maior contato com fronhas, promovendo a transmissão entre os indivíduos por fômites.

As lesões que refletem inflamação, como pústulas e crostas podem ser manifestações em casos de *Tinea capitis* por *T. tonsurans*, mas são mais comuns em espécies

zoofílicas e geofílicas⁴⁰. Neste estudo observou-se um caso de pústula e 5 com crostas, que caracterizam como a dessecação de secreções por infecção bacteriana. No trabalho de Bronson *et al* (1983), em Chicago, 34% se apresentaram como *kerion* e 22 % com foliculite, enquanto que manifestações não inflamatórias representaram 40% dos casos¹⁰. Ramos-e-Silva, J. (1956), no Rio de Janeiro, apresentou 21 casos de *Tinea capitis* com foliculite e formação de abscessos, dos quais 14 (66%) foram causados por *T. tonsurans*⁶².

A linfadenopatia cervical e occipital é freqüente em regiões onde o gênero *Microsporum* é prevalente. Alguns autores incentivam a investigação clínica dos casos em que a manifestação esteja ausente⁴⁰. Neste estudo a incidência foi pequena apenas sete pacientes (20%) com cultura para *T. tonsurans* positiva apresentaram linfadenopatia, na maioria dolorosa e móvel. Conclui-se que as *Tinea capitis* causadas por *T. tonsurans* apresentam grande variedade de manifestações clínicas e que as não inflamatórias são mais prevalentes; o que se justifica por ser um fungo antropofílico, ocasionando uma reação com baixa resposta inflamatória no hospedeiro.

Classicamente, o *T. tonsurans* pode apresentar uma variedade na morfologia das colônias quando bem desenvolvidas. Quanto ao relevo, pode-se apresentar apiculado, crateriforme, rugoso e cerebriforme. Neste estudo, foram observadas 23 cepas (82,14%) com relevo apiculado. Na literatura, os trabalhos clássicos de Lucille Georg (1956), revelam que apesar da grande variedade na macromorfologia, o relevo apiculado é o mais freqüente^{16,29,30}.

Quanto à textura, considerada o mais importante achado macromorfológico utilizado na caracterização de uma colônia fúngica, observou-se variações do algodinoso ao veludoso. As texturas das colônias de *T. tonsurans*, em agar batata ou agar Sabouraud, que predominaram neste estudo foram a arenosa(10 cepas-35,71%) e a glabrosa, tanto na região central como na periferia das colônias (10 cepas-35,71%), sendo esta última característica das colônias de leveduras.

Badillet, em 1986, individualizou quatro variedades de *T. tonsurans*, segundo seus aspectos macroscópicos, e descreveu a variedade *acuminatum*, quando a colônia tem uma pequena saliência (apiculação) central circunscrita por pregas radiais, a variedade *cerebriforme* quando predomina um relevo com aspecto de circunvoluções no centro da colônia, a variedade *crateriforme*, quando a colônia apresenta forte depressão central, e, por fim, a variedade *sulfureum*, mostrando uma depressão central associada a forte pigmento amarelado⁷.

O aspecto glabroso de algumas colônias se contrapõe a todas as descrições de colônias de *T. tonsurans* existente, pois embora seja considerado variação na morfologia, não há relatos que mencionem o desenvolvimento de colônias glabrasas em nenhuma de suas variedades.

A coloração da colônia é bastante variável, tendendo para os tons de branco a bege^{16,29,30}. No presente estudo, a coloração predominante foi o bege, enquanto no reverso se observou o predomínio do castanho-escuro.

Em contraste com a diversidade macroscópica, as características micromorfológicas das cepas clássicas de *T. tonsurans* são homogêneas, caracterizado-se pela presença de numerosos microconídios de tamanhos e formas variáveis, dispostos em acládium e de aspecto grosseiro associados ou não a estruturas de frutificação ou ornamentação como hifa em raquete, hifas em espiral e clamidoconídios. Os macroconídios, quando presentes, em nada contribuem para a identificação final³⁰.

Neste ensaio observou-se a presença de microconídios em 10-50 unidades/campo que se assemelha ao descrito na literatura.

Este estudo confirma a presença de clamidoconídios em cadeias na microscopia da cultura em ágar Sabouraud, conforme descrito em estudo anterior realizado em Fortaleza⁹. São estruturas que até podem estar presentes mas em pequena quantidade e são consideradas de resistência, estando relacionadas com o tempo de maturação das colônias fúngicas e com a diminuição de substrato³⁰. São estruturas arredondadas que quando presentes em grandes quantidades podem levar ao aspecto macroscópico mucóide como as colônias de textura glabrosa. Quando feita a microscopia de colônia oriundas do ágar batata, estes clamidoconídios diminuem em quantidade mas continuam presentes tendo sido observado neste estudo uma média de 1-10/campo (40x).

Georg relata que o surgimento de esporádicos clamidoconídios só ocorre entre o 15º e 21º dia de semeadura, associando-se à idade avançada da colônia²⁹.

Na prova da uréase, a literatura descreve que pode ser positiva ou negativa. Este estudo revelou que 64% (18) de cepas foram capazes de produzir a uréase e alcalinizar o meio em estudo. Sua principal função é diferenciar as cepas de *T. tonsurans* das de *T. mentagrophytes*.

Quanto à prova de requerimento nutricional, estudos prévios mostraram a deficiência e necessidade de tiamina pelo *T. tonsurans*^{29,30}. Nos meios T3 (inositol e tiamina) e T4 (tiamina), as cepas deste ensaio confirmaram o melhor crescimento- 18 cepas (64,2%)

tiveram bom crescimento em T3 e 17 cepas (60,71%) apresentaram bom crescimento em T4. São provas de grande valor na identificação definitiva das diferentes espécies de *Trichophyton*⁷¹.

Testes genéticos são de grande utilidade quando realizados para identificar cepas atípicas, estudos taxonômicos e filogenéticos e subclassificar espécies^{25,43}. Alguns artigos revelam dificuldade em diferenciar o *T. tonsurans* do *T. mentagrophytes* quando da análise de DNA^{42,43,51,58}. Estudo realizado por Kim *et al* (1999) observou o perfil genético semelhante entre *T. tonsurans* de diferentes expressões fenotípicas, de diversas regiões de isolamento (Brasil, Estados Unidos, Japão, Coreia e Taiwan), provando a homogeneidade da espécie. Quando comparado o *T. tonsurans* ao *T. mentagrophytes*, com o *primer* ATGS (5'-ATGGATC(G,C)(G,C)C-3'), mostraram bandas de padrão similar no RAPD, com o *primer* ATG (5'-ATGGATCGGC-3'), não foi possível distinguir os *T. tonsurans* de algumas cepas de *T. mentagrophytes* revelando existir uma intensa proximidade genética entre estas espécies. Com o uso do *primer* OPAO-15 (5'-GAAGGCTCCC-3'), o *T. tonsurans* foi facilmente diferenciado das cepas de *T. mentagrophytes*, fazendo desse o melhor *primer* para se utilizar com estudos genéticos desta espécie. As cepas de *T. tonsurans* produziram perfis, iguais entre si, compostos de bandas em 1.28 e 0.94 kbp quando da utilização do *primer* OPAO-15⁴³.

Neste estudo foram amplificados DNAs de 17 cepas de *T. tonsurans*, utilizando-se o *primer* OPAO-15, por ser considerado na literatura como o melhor para diferenciar as cepas de *T. tonsurans* de outras espécies. Foram observados três perfis genético diferentes entre as cepas de *T. tonsurans* com produção de bandas com pesos moleculares variados entre os três perfis e diferentes do perfil genético descrito na literatura, como o clássico do *T. tonsurans*⁴³. Artigos destacam a intensa homogeneidade genética das cepas de *T. tonsurans* o que vai contra o observado neste trabalho em que tanto há heterogeneidade entre as cepas deste estudo como diferença com as cepas de artigo também utilizado o *primer* OPAO-15^{43,51}.

O perfil A apresentou bandas com aproximadamente 0.1, 0.2, 0.3, 0.6 e várias bandas que migraram acima de 1.5 kbp. Das 17 cepas que foram amplificados o DNA, 12 cepas (70%) apresentaram o perfil que foi chamado de B, onde há bandas com até 0.6 kbp, aproximadamente 1,2 kbp e muitas acima de 1.5 kbp, também diferente das cepas descritas na literatura⁴³. O perfil C produziu mais de 10 bandas, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 1.5 kbp e outras bandas acima de 2.07 kbp.

À análise das manifestações clínicas, observou-se que 83% dos pacientes portadores das cepas que representam o perfil genético B, apresentavam descamação e

tonsura. Do ponto de vista laboratorial, 75% das cepas produziram uréase em agar uréia, característica das cepas do *T. mentagrophytes* e 100% cresceram muito bem em meio rico de tiamina (agar T3 e T4), característica de cepas do *T. tonsurans* e *T. mentagrophytes*.

Diante dos resultados pode-se sugerir estarmos diante de uma nova espécie de dermatófito, com a grande variação morfológica, características atípicas na macromorfologia (colônias com textura glabrosa) e na micromorfologia (presença de grandes quantidades de clamidoconídios em isolamento primário e em repiques subsequentes), e com esta apresentação genotípica diferente das descritas na literatura.

A partir deste estudo, devem-se seguir outros que possam realizar a análise genômica do seguimento ITS (*internal transcribed spacer*) do DNA ribossomal, que caracteriza cada espécie e analisar qual seria a melhor classificação filogenética destas cepas com perfil genético diferente do *T. tonsurans* descrito na literatura.

5 CONCLUSÃO

- A *Tinea capitis* por *T. tonsurans* foi mais freqüente no sexo feminino, no intervalo entre 0-5 anos e com manifestações não inflamatórias.
- *T. tonsurans* manifestou-se como lesão do tipo microspórica, isto é, lesão em placa única em 40% dos casos onde a tonsura estava presente.
- Os aspectos fenotípicos do *T. tonsurans* apresentaram uma tendência para colônias de aspecto mucóide e micromorfologicamentecom grande quantidade clamidoconídios.
- Variações genéticas com o *primer* OPAO-15 das encontradas na literatura, associada a uma homogenia de padrões no *T. tonsurans* estudado, sugere um distanciamento filogenético dessas cepas do *T. tonsurans* clássico.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AJJELLO, L. Natural history of the dermatophytes and related fungi. *Mycopath. Mycol. Appl*, v.53, p.93-110, 1974.
- 2 ALIBERT, J.L. Description des maladies de la peau observées à l'hôpital Saint-Louis et exposition des meilleures méthodes suivies pour leur traitement, Barrois, Paris, p. 129, 1806.
- 3 AQUINO, P.M.L.P., LIMA, E.O., FARIAS, N.M.P. *Tinea capitis* em João Pessoa: visão socioeconômica. *An. bras. Dermatol.*, v.78, n.6, p.713-717, 2003.
- 4 ASTE, N., PAU, M., BIGGIO, P., *Tinea capitis* in adults. *Mycoses*, v.39, p.299-301, 1996.
- 5 BABEL, D.E., BAUGHMAN, S.A. Evaluation of the adult carrier state in juvenile *Tinea capitis*. *J. Am. Acad. Dermatol*, v.21, p.1209-1212, 1989.
- 6 BABEL, D.E., ROGERS, A.L., BENEKE, E.S. Dermatophytosis of the scalp: Incidence, immune response and epidemiology. *Mycopathologia*, v.109, n.2, p.69-73, 1990.
- 7 BADILLET, G. *Dermatophyties et dermatophytes-Atlas clinique et biologique*. Paris ; ed. Varia, 3ª edição, 1986.
- 8 BERGSON, C. L. *Tinea capitis: estudo de portadores assintomáticos e doentes adolescentes, adultos e idosos coabitantes com crianças com a infecção*. Rio de Janeiro, 1999. 99 p. Dissertação de Mestrado- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, 1999.

- 9 BRILHANTE, R.S., PAIXÃO, G.C., DIÓGENES, M.J.N., BANDEIRA, S.P., ROCHA, M.F.G., SIDRIM, J.J.C. Enfoque epidemiológico das dermatofitoses em Fortaleza-CE- o *Trichophyton tonsurans* como importante agente da *Tinea capitis*. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v.33, n.5, p.417-425, 2000.
- 10 BRONSON, D.M., DESAI, D.R., BARSKY, S., FOLEY, S.M. An epidemic of infection with *Trichophyton tonsurans* revealed in a 20-year survey of fungal infections in Chicago. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.8, p.322-330, 1983.
- 11 CHAN, YUIN-CHEW, FRIEDLANDER, S.F. New treatments for tinea capitis. **Curr. Opin. Infect. Dis**, v.17, p.97-103, 2004.
- 12 CHEN, A.W.J., KUO, J.W.L., SUN, C.C., HUANG, S.F. Dermatophyte pseudomycetoma: a case report. **Br. J. Dermatol.** V.129, p.729-732, 1993.
- 13 CHERMETTE, R., BUSSIRAS, J. **Parasitologie vétérinaire. Tome Mycologie.** Service de Parasitologie, École nationale vétérinaire, Alfort, 1993.
- 14 CHINELLI, P.A.V., SOFIATTI, A.A., NUNES, R.S., MARTINS, J.E.C. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** v. 45, n.5, p.259-63, 2003.
- 15 COSTA, M., PASSOS, X.S., SOUZA, L.K.H., MIRANDA, A.T.B., LEMOS, J. A., Oliveira Júnior, J.G., Silva, M.R.R. Epidemiologia e etiologia das dermatofitoses em Goiânia, GO, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v.35, n.5, p.19-22, 2002.
- 16 DE VRIES, G.A. Observations on *Trichophyton tonsurans*. **Sabouraudia**, v.9, p.1-5, 1971.
- 17 DIAS, T., FERNANDES, O.F.L., SOARES, A.J., PASSOS, X.S., COSTA, M., SOUZA, L.K.H., SILVA, M.R.R. Tinha do couro cabeludo em crianças de Goiânia, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.**, v.36, n.6, p.653-5, 2003.

- 18 DONALD, G.F. The history, clinical features and treatment of *tinea capitis* due to *Trichophyton tonsurans* and *Trichophyton violaceum*. **Aust. J. Dermatol**, v.5, p.90-102, 1959.
- 19 EL-BENHWI, M.O., FATHY, S., MOUBASSHER, A.H., ALEN, N.S. Mycologic study of *tinea capitis* in Qatar. **Int. J. Dermatol.**, v.30, n.3, p.204-205, 1991.
- 20 ELEWISK, B.E., HAZEN, P. The superficial mycoses and dermatophytes. **J. Am. Acad. Dermatol**, v.21, p. 655-673, 1989.
- 21 ELEWISK, B.E. *Tinea capitis*: a current perspective. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.42, n.1, part 1, p. 1-20, 2000.
- 22 ELEWISK, B.E., In: dermis, D.J., editor. *Tinea capitis* in clinical dermatology; Philadelphia: J.B. Lippincott, v.3, p.1-23, 1999.
- 23 EMMON, C.W. Dermatophytes: natural grouping based on the form of spores and accessory organs. **Arch. Dermatol. Syphilol**, v.30, p.337-362, 1934.
- 24 FLAMMIA, M., VANNINI, P., DIFONZO, E.M. *Tinea capitis* in the Florence area between 1985 and 1993. **Mycoses**, v.38, p.325-328, 1995.
- 25 FOSTER, L.M., KOZAC, K.R., LOFTUNS, M.G. The polymerase chain reaction and its application to filamentous fungi. **Mycol Res.**, v.97, p.769-781, 1993.
- 26 FRIEDEN, I.J., HOWARD, R. *Tinea capitis*: Epidemiology, diagnosis, treatment and control. **J. Am. Acad. Dermatol.** v.31, n. 3, Part 2: S42-S46, 1994.
- 27 FULLER, L.C., CHILD, F.C., HIGGINS, E.M. *Tinea capitis* in south-east London: an outbreak of *Trichophyton tonsurans* infection. **Br. J. Dermatol.**, v.136, p.139, 1997.

- 28 FURTADO, M.S.S., IHARA, L.T., Marója, M.F. *Tinea capitis* na cidade de Manaus-AM. **An. Bras. Dermatol.**, v.60, n.5, p.315-318, 1985.
- 29 GEORG, L.K. Studies on *Trichophyton tonsurans*. I. Taxonomy of *T. tonsurans*. **Mycologia**, v.48, p.65-82, 1956.
- 30 GEORG, L.K. Studies on *Trichophyton tonsurans*. I. Taxonomy of *T. tonsurans*. **Mycologia**, v.48, p.354-370, 1956.
- 31 GONÇALVES, H.M.G., MAPURUNGA, A.C.P., QUEIROZ, J.A.N., DIÓGENES, M.J.N., Dermatofitoses. Principais agentes etiológicos identificados em Fortaleza. **An. Bras. Dematol.**, v.64, n.1, p.25-27, 1989.
- 32 GOSLEN, J.B., KOBAYASHI, G.S. Fungal diseases with cutaneous involvement. Mycologic infections. In: eds. Fitzpatrick, T.B., Eisen, A.S., Wolff, K., Freedberg, I.M., Austen, K.F. **Dermatology in General Medicine**. New York. Ed. Mc Graw Hill Book Company. 3ªed., p.2193-248, 1987.
- 33 GRUBY, D. Mémoire sur une végétation qui constitue la vraie teigne. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v. 13, p.72, 1841.
- 34 GRUBY, D. Recherches sur la cryptogames qui constituent la maladie du cuir chevelu décrite sous le nom de Teignes tondante (Mahon), Herpes tonsurans (Cazenave). *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v.18, p. 583, 1844.
- 35 GRUBY, D. Recherches sur la nature, le siège et la développement du Porrigo declavens ou Phytoalopécie. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v.17, p.301, 1843.
- 36 GRUBY, D. Su rune espèce de mentagre contagieuse résultant du développement d'un nouveai cryptogames dans la racine des poils de la barbe de l'homme. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, v.15, p.512, 1842.

- 37 GRUBY, D. Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences* (Paris), v. 13, p. 309-312, 1841.
- 38 GUPTA, A.K., HOFSTADER, S.L., Adam, P., Summerbell, R.C. *Tinea capitis*: an overview with emphasis on management. *Pediatr Dermatol.*, v.16, n.3, p. 171-89, 1999.
- 39 GUPTA, A.K., SUMMERBELL, R.C. Increased incidence of *Trichophyton tonsurans Tinea capitis* in Ontario, Canada between 1985 and 1966. *Med. Mycol.*, v. 36, p. 55-60, 1998.
- 40 GUPTA, A.K., Summerbell, R.C. *Tinea capitis*. *Med Mycol.*, v.38, p. 255-287, 2000.
- 41 HAY, R.J., CLATON Y. M., DE SILVA, N., Midgley, G., Rosser, E. *Tinea capitis* in south-east London: a new pattern of infection with public health implications. *Br. J. Dermatol.*, v.135, p.955-958, 1996.
- 42 KAC, G., BOUGNOYX, M.E. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. *Br. J. Dermatol.*, v.140, p.839-844, 1999.
- 43 KIM, J.A, KAYOKO, TAKIZAWA, K., FUKUSHIMA, K., NISHIMURA, K. & MIYAJI, M. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. *Mycopathologia.*, v.145, p.1-6, 1999.
- 44 KIM, J.A., TAKAHASHI, Y., TANAKA, R., FUKUSHIMA, K., MIYAJI, M. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophyte* by random amplified polymorphic DNA. *Mycoses*, v.44, p.157-165, 2001.
- 45 KWON-CHUNG, K.J., BENNET, J.E. Dermatophytoses. In: Kwon-Chung, K.J., Bennet, J.E, eds. *Med. Mycol.*, Lea & Febiger, Philadelphia, 1^a ed. P. 114-54, 1992.

- 46 LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. Morfologia e biologia dos fungos de interesse médico. In: **Micologia Médica**, São Paulo, Sarvier, 695p., cap.2, p.31-84, 1991-a.
- 47 LACAZ, C.S., PORTO, E., MARTINS, J.E.C. Fungos, actinomicetos, algas do meio ambiente. Epidemiologia das Micoses. In: **Micologia Médica**, São Paulo, Sarvier, 695p., cap.5, p.94-106, 1991-b.
- 48 LAUDE , T.A. Epidemiology of *Tinea capitis*. **Pediatr. Dermatol.**, v.2, p.234-236, 1985.
- 49 LAUDE, T.A. Skin disorder in black children. **Curr. opin. Pediatr.**, v.8, n.4, p.381-385, 1996.
- 50 LEEMING, J.G., ELLIOTt, T.S. The emergency of *Trichophyton tonsurans Tinea capitis* in Birmingham. UK. **Br. J. Dermatol**, v.133, p.929-931, 1995.
- 51 LIU, D., COLOE, S., BAIRD, R., PEDERSEN, J. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Br. J. Dermatol.**, v.137, p.351-355, 1997.
- 52 LONDERO, A.T., RAMOS, C.D. Agentes de dermatofitoses humanas no interior do Estado do Rio Grande do Sul no período 1960-1987. **An. Bras. Dermatol.**, v.64, n.3, p.161-164, 1989.
- 53 MACKENZIE, D.W.R. "Hairbrush diagnosis" in detection and eradication of non-fluorescent scalp ringworm. **Br. Med. J.**, v.ii, p.363-365, 1963.
- 54 MC ALLER, R. Fungal infections of the sacalp in Western Austrália. **Sabouradia**, v.18, p.185-190, 1980.

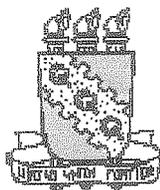
- 55 MC GINNIS, M.R., Tilton, R.C. Dermatophytes. In: Howard, B.J., editor. **Clinical and Pathogenic Microbiology**. 2nd ed. St Louis: Mosby-Year Book, p.587-595, 1993.
- 56 MOSHIZUKI, T., SUGIE, N., UEHARA, M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. **Mycoses**, v.40, p.405-409, 1997.
- 57 MOHAMMAD JAHANGIR, M.C.P.S., MSC, I., HUSSAIN F.C.P.S., K. KHUSHID, F.C.P.S. and T. S. HARRON, F.R.C.P. A clinico-etiological correlation in *Tinea capitis*. **Int. J. Dermatol**, v.38, p.275-278, 1999.
- 58 NISHIO, K., KAWASAKI M., ISHIZAKI, H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. **Mycopathologia**, v.117, p.127-132, 1992.
- 59 ODOM, R. Pathophysiology of dermatophyte infections. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.28:S2-S7, 1993.
- 60 OLIVEIRA, A.C.P., GUILHERMETTI, E., KIOSHIMA, É. S., SVIDZINSKI, T.I.E., & PEDRA, M.R. *Tinea capitis* em Maringá, Paraná. Um estudo de 11 anos. **An. Bras. Dermatol**, v.77, n.3, p.321-328, 2002.
- 61 PADILHA GONÇALVES, A., LAMY, N. Tinha tonsurante microspórica do couro cabeludo em adulto. **An. Bras. Dermatol. Sif.**, v.34, n.2, p.23-25, 1959.
- 62 RAMOS e SILVA, J. Perifoliculite abscedante de Hoffmann, sua possível etiologia micótica. **O Hospital.**, v.50, n.6, p.767-780, 1956.
- 63 RIPPON, J.W. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophytes species. **Curr. Top. Med. Mycol.**, v.1, p.208-234, 1985.

- 64 RON, E., MODAN, B., BOICE, J.D., et al. Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. **New Eng. Med. J.**, v.319, p.1033-1039, 1988.
- 65 SABOURAUD, R. **Les teignes**. Paris, Masson, 1910.
- 66 SABOURAUD, R.J.A. Les maladies desquamative : pityriasis et alopecies pelliculaires. **Maladies du cuir chevelu. II**. Paris : Masson et cie ;1904.
- 67 SABOURAUD, R.J.A. **Les trychophyties humaines**. Paris : Rueff et cie, 1894.
- 68 SABOURAUD, R.J.A., Noiré, H. Lesteignes cryptogamique et les rayons X. **Annales de l'Intitut Pasteur**, v.18, p.7, 1904.
- 69 SEGHAL, V.N., SAXENA, A.K., KUMARI, S. *Tinea capitis*- A clinicoetiologic correlation. **Int. J. Dermatol.**, v.24, p.116-119, 1985.
- 70 SHARMA, V., HALL, J.C., KNAPP, J.F., SARAI, S., GALLOWAY, D., BABEL, D.E. scalp colonization by *Trichophyton tonsurans* in an urban pediatric clinic. **Arch. Dermatol.**, v.124, p. 1511-13, 1988.
- 71 SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. In: **Micologia Médica à Luz dos Autores Contemporâneos**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 388 p., cap. 14, p.135-161, 2004.
- 72 SOGAIR, S.A., HAY, R.J. Fungal Infection in Children, **J. Clin. Dermatol.** v.18, p. 679-685, 2000.
- 73 SOLOMONS, B. Disorders of the hair and their treatment before the 18th century. **Br. J. Dermatol.** v.78, p.113-120, 1996.

- 74 SOUSA, F.H.C. *Tinea capitis por trichophyton tonsurans em criança: papel dos portadores assintomáticos*. Rio de Janeiro, 1997. 40p. Tese para obtenção do grau de Mestre em Dermatologia pela Faculdade de Medicina da Universidade federal do Rio de Janeiro.
- 75 TAKASHIO, M. Sexual reproduction of some *Arthroderma* and *Nannizzia* on diluted Sabouraud agar with or without salts. *Mykosen*, v.15, p. 11-17, 1972.
- 76 VENUGOPAL, P.V., VENUGOPAL, T.V. *Tinea capitis* in Saudi Arabia. *Int. J. Dermatol.*, v.32, n.1, p.39-40, 1993.
- 77 WILLIAMS, J. V., HONING, P.J., MCGINLEY, K.J., LEYDEN, J.J. Semiquantitative study of *tinea capitis* and the asymptomatic carrier state in inner-city school children. *Pediatric*, v.96, p.265-7, 1995.
- 78 WILLIAMS, D.I., MARTIN, R.H., SARKANY, L. Oral treatment of ringworm with griseofulvin. *Lancet*, v.2, p. 1212, 1958.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Fortaleza, 02 de setembro de 2002

Of. N° 221/02

Protocolo n° 168/02

Pesquisador responsável: Dra. Luciana Maria Pereira de Oliveira Depe./Serviço:
Departamento de Clínica Médica UFC

Título do Projeto: "O *trichophyton tonsurans* um patógeno emergente: correlação de nova apresentação fenotípica, aspectos clínicos, resposta terapêutica e homologia de DNA"

Levamos ao conhecimento de v.sa. que o Comitê de Ética em Pesquisa e do Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará - C01v1EPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde, Resolução n0196 de 10 de outubro de 1996 e Resolução n° 251 de 07 de agosto de 1997, publicadas no Diário Oficial, em 16 de outubro de 1996 e 23 de setembro de 1997, respectivamente, aprovou o projeto supracitado na reunião do dia 29 de agosto de 2002.

Atenciosamente,

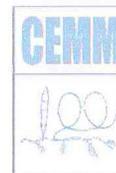
Assinatura manuscrita em tinta preta de Mirian Parente Monteiro.

Ora. Mirian Parente Monteiro
Coordenadora Adjunta do Comitê
de Ética em Pesquisa
COMEPE/IIUWC/UFC

ANEXO II



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Título do Estudo: O *Trichophyton tonsurans* um patógeno emergente: aspectos clínicos e homologia de DNA.

Investigador Principal: Dra. Luciana Maria Pereira de Oliveira

Local da Investigação: Centro Especializado em Micologia Médica e Ambulatório de Dermatologia da Universidade Federal do Ceará.

Eu estou sendo solicitado a participar de um estudo clínico. Entretanto, antes de fornecer meu consentimento para participar, eu li as informações e farei as perguntas necessárias para entender o que minha participação envolveria.

Objetivo do Estudo: Analisar o padrão de DNA cromossômico das espécies isoladas de *Trichophyton tonsurans* e relacioná-lo à resposta terapêutica e apresentação clínica e tentar estabelecer se as cepas de *Trichophyton tonsurans* isoladas em nosso meio caracterizam uma nova espécie ou variedade melhor adaptada às condições climáticas da região Nordeste do Brasil.

Procedimento a serem seguidos durante o estudo:

Fui convidado (a) participar desta Pesquisa Clínica, pois tenho entre 2 e 60 anos de idade, encontro-me em bom estado de saúde e possuo *Tinea capitis*. Antes do início do estudo, participarei de um exame de seleção, que consistirá em um histórico médico, para verificar se tenho condições de participar deste estudo.

Colher-se-ão amostras de escamas e fios do meu couro cabeludo, serão submetidos a exames micológicos direto, culturas para fungos (estudo macromorfológico e micromorfológico das colônias), estudos das habilidades biológicas e ação enzimática das cepas (prova da uréase, perfuração do pêlo *in vitro* , provas de requerimento nutricionais e caracterização do padrão de DNA.

Participação Voluntária:

Eu entendo que a minha participação deste estudo é totalmente voluntária e eu poderei descontinuar minha participação a qualquer momento sem prejuízos.

Quem Contatar:

Se, a qualquer momento, eu tiver qualquer dúvida sobre o estudo eu deverei contatar o médico responsável: dra. Luciana- fone 454-1390.

Confidencialidade:

Eu entendo que meus registros médicos serão mantidos confidenciais, eles podem apenas ser inspecionados pelo médico responsável, pelo Comitê de Ética e/ou por um designado das Autoridades de Saúde do país. Em qualquer caso de uso de meus resultados meu nome na o será divulgado.

Consentimento:

Este formulário de consentimento contém as informações necessárias para eu decidir se é do meu interesse participar deste estudo.

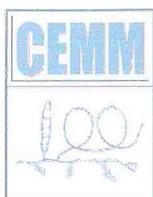
Antes de eu assinar este consentimento, eu tive a oportunidade de fazer perguntas. Baseado nesta informação, eu voluntariamente concordo em participar deste estudo e recebo uma cópia deste consentimento assinado.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do responsável: _____

Assinatura da pessoa que explicou o Consentimento: _____



ANEXO III



Centro Especializado em Micologia Médica Serviço de Dermatologia do HUWC/UFC

Protocolo para Dermatofitoses

Telefone de contato: _____ número da ficha: _____ / 200 _____

Data: ____ / ____ / ____ Origem/Procedência: _____

Dados do Paciente:

- Nome: _____
- Prontuário: _____ Idade: _____
- Data de nascimento: __ / __ / __ Profissão: _____
- Endereço: _____

Diagnóstico Clínico:

- *Tinea:*

() Tons. Tricofítica () Tons. Microspórica () Supurativa

- Exame clínico:

() descamação () eritema () "black dot" () tonsuras

() placa única () < 3 placas () 3- 5 placas () > 5 placas

() < 1cm () 1- 3cm () > 3cm

() exulceração () crosta () infiltração () atrofia (cicatriz)

() vesículas () pústulas () abscesso

() frontal D () frontal E () temporal D () temporal E

() parietal D () parietal E () occipital E () occipital D

() presença de dermatofitose/ localização: _____

() < 5 linfonodos () > 5 linfonodos

() < 2cm () 2- 5cm () > 5cm () amolecidos () endurecidos

() fistulizados () coalescentes () aderidos a planos profundos

- Hábitos:

Contato com cachorro () gato () outros () _____
 água/ sabão () plantas/ solo ()

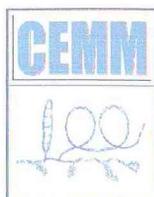
- Lazer/ “hobby”:

História familiar () positiva () negativa

Possível contato () creche/ escola

1. Tratamento:

- a) () griseofulvina 10- 15mg/ Kg + shampoo de cetoconazol 28 dias
- b) () griseofulvina 10- 15mg/ Kg + shampoo de sulfeto de selênio 2,5% 28 dias
- c) () cetoconazol 100mg + shampoo de cetoconazol 28 dias
- d) () cetoconazol 100mg + shampoo de sulfeto de selênio 2,5% 28 dias
- e) () itraconazol 100mg + shampoo de cetoconazol 28 dias
- f) () itraconazol 100mg + shampoo de sulfeto de selênio 2,5% 28 dias



ANEXO IV



UFC - CENTRO ESPECIALIZADO EM MICOLOGIA MÉDICA

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS

Data de entrada do exame: _____

Número do paciente: _____

Micológico direto: _____

Cultura: _____

Macromorfologia das colônias:

Relevo:

- Apiculado
- Crateriforme
- Rugoso
- Cerebriforme

Textura:

- Glabrosa
- Algodonosa
- Veludosa
- Furfurácea
- Arenosa
- Penugenta

Pigmento:

- Difusível
- Não difusível

Coloração _____

Coloração reverso _____

Micromorfologia

(observado em 10 campos do bordo de crescimento na objetiva de 40X):

Macroconídio 0 1-5 5-10 >10

Microconídio 0 1-10 10-50 >50

Hifa estéril

Estrutura de ornamentação:

Clamidoconídio

Hifa em espiral

Hifa em raquete

Hifa pectinada

Candelabro

Cabeça de prego

Órgão nodular

Testes nutricionais

T1	NT	0	+1	+2	+3	+4
T2	NT	0	+1	+2	+3	+4
T3	NT	0	+1	+2	+3	+4
T4	NT	0	+1	+2	+3	+4
T5	NT	0	+1	+2	+3	+4
T6	NT	0	+1	+2	+3	+4
T7	NT	0	+1	+2	+3	+4

Testes complementares

Uréase Positiva () Negativa ()

Perfuração do pêlo Positiva () Negativa ()

Outras características complementares

Características Positivas

Características negativas

Espécie isolada:

Trichophyton rubrum

Trichophyton tonsurans

Trichophyton mentagrophytes var. mentagrophytes

Trichophyton mentagrophytes var. interdigitale

Microsporum canis

Microsporum gypseum

Epidermophyton floccosum

Término da identificação: _____

Identificador: _____

Data de envio para estoque: _____

ANEXO V

MEIOS DE CULTURA, CORANTES E SOLUÇÕES

MEIOS DE CULTURA

Ágar Batata

OBJETIVO

Usado para realização de microcultivos de fungos filamentosos e estoque.

COMPOSIÇÃO

Infusão de batatas	500ml
Glicose	10g
Agar bacteriológico	15g
Água destilada	1000ml

PREPARO

Cozinhar 250g de batata inglesa (*solanum tuberosum*) descascada em 500ml de água por 1 hora. Filtrar a infusão de batatas através de gaze e restituir o volume inicial de água (500ml) e acrescentar 500ml de água destilada. Adicionar o agar e a dextrose dissolvendo-os completamente. Autoclavar o meio por 15 minutos à 121°C e distribuir em tubos de vidro. Deixar solidificar, na posição inclinada.

Esse meio pode ser adquirido comercialmente sob a denominação de Ágar batata desidratado(DIFCO), *Potato destrose Agar* (OXOID) e *Agar Pomme-de-Terre* (Sanofi-INSTITUT PASTEUR)

Ágar Sabouraud

OBJETIVO

É o principal meio de cultura usado na Micologia. Utiliza-se para o cultivo primário geral dos fungos (leveduras, filamentosos a alguns dimórficos), em especial para os dermatófitos, uma vez que, as principais características macro e microscópicas desse grupamento fúngico são classicamente descritas, a partir do seu crescimento nesse meio. A composição do ágar sabouraud foi, inicialmente, proposta por Raymond Sabouraud, em 1904, e vem apresentando inúmeras modificações com o passar dos anos, com alterações na quantidade de alguns componentes tais como a dextrose e a adição de substâncias inibidoras como o cloranfenicol e a cicloeximida. Dessa forma, descreveremos a sua composição clássica e falaremos de algumas modificações, mostrando suas vantagens frente a formulação original do meio.

COMPOSIÇÃO CLÁSSICA

Peptona	10 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver ágar, peptona e dextrose em água destilada, aquecendo em banho-maria. Autoclavar por 15 minutos, a 121°C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

MODIFICAÇÕES

Redução da concentração de dextrose para 20 g/litro (Ágar Sabouraud a 2% de dextrose, modificado por Emmons)

Essa modificação eleva o pH final do meio de 5.9 para 7.0, favorecendo o crescimento e conidiogênese dos dermatófitos, sendo atualmente, a formulação preferida na maioria dos laboratórios de Micologia. Além de otimizar o isolamento dos dermatófitos, essa formulação ainda favorece o desenvolvimento de outros fungos, tais como o *Blastomyces dermatitidis*, que se mostram incapazes de crescer na presença de teores mais elevados de dextrose.

Adição de antibióticos (ágar Sabouraud com cloranfenicol)

Essa formulação utiliza antibióticos de largo espectro, visando inibir o crescimento de bactérias, eventualmente presentes em materiais clínicos, as quais por possuírem maior velocidade de crescimento, podem esgotar o substrato do meio e impedir o crescimento de fungos. Os antibióticos mais utilizados são o cloranfenicol e a gentamicina. Abaixo, descreveremos a formulação do ágar Sabouraud a 2% de dextrose e acrescido de cloranfenicol

Composição

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml

Preparo

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORANFENICOL

Dissolver 0.05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico.

Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento. Adicionar a solução de cloranfenicol. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome *Sabouraud agar Chloramphenicol* (SANOFI-Institut Pasteur).

Adição de substâncias antibióticas e antifúngicas (ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloeximida)

Nessa formulação, além da adição de antibióticos, já descrita anteriormente, acrescentamos a cicloeximida (actidione), com a função de inibir o crescimento de fungos contaminantes do ar, os quais dificultam o crescimento e visualização dos fungos patogênicos. No entanto, a cicloeximida não tem ação seletiva apenas para fungos contaminantes, podendo inibir o crescimento de vários fungos patogênicos, tais como: *Cryptococcus neoformans* e várias espécies de *Candida*.

Composição

Peptona bacteriológica	10 g
Dextrose	20 g
Ágar bacteriológico	10 g
Água destilada q.s.p	1000 ml
Solução de cloranfenicol	10 ml
Solução de cicloeximida	10 ml

Preparo

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CLORANFENICOL

Dissolver 0.05 g de cloranfenicol em 10 ml de álcool etílico.

PREPARO DA SOLUÇÃO DE CICLOEXIMIDA

Dissolver 0.5 g de cicloeximida em 10 ml de acetona.

PREPARO FINAL DO MEIO

Dissolver a peptona, dextrose e ágar em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Adicionar as soluções de cloranfenicol e cicloeximida. Autoclavar por 15 minutos, a 121°C. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de aproximadamente 6 cm.

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob os nomes *Agar Mycosel* (DIFCO) e *Agar Mycobiotic* (SANOFI-Institut Pasteur).

Agar *Trichophyton* 1(ÁgarT1)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, baseando-se em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

COMPOSIÇÃO

Ácido casamínico (sem vitaminas)	2.5 g
Fosfato monopotássico	1.8 g
Sulfato de magnésio	1 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver todos os componentes em água destilada sob aquecimento em banho-maria. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm..

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, sob a forma desidratada, sob a denominação de Agar *Trichophyton* 1 (DIFCO).

Agar *Trichophyton* 2 (Ágar T2)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, baseando-se em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

COMPOSIÇÃO

Agar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de i-inositol	2 ml

PREPARO

Preparo da Solução de i-Inositol:

Inositol	250 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

Preparar o Ágar *Trichophyton* 1 (ágar T1) e autoclavá-lo a 121°C, por 15 minutos. Esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de inositol e distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

Agar *Trichophyton* 3 (ágar T3)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente o *T. verrucosum*, que tem seu crescimento estimulado, quando em presença de tiamina e inositol.

COMPOSIÇÃO

Agar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de i-inositol	2 ml
Solução de tiamina	2 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Tiamina

Tiamina	10 mg
Água destilada q.s.p	1.000 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

Preparo da Solução de i-Inositol

Inositol	250 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar por filtração e conservar a 5°C.

Preparar o agar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo a 121°C, por 15 minutos; esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar as soluções de tiamina e inositol. Distribuir, alíquotas de 4 ml, em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície de 6 cm.

Agar *Trichophyton* 4 (Ágar T4)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente *T. tonsurans* e *T. violaceum*, que tem seu crescimento otimizado pela presença da tiamina, contrastando com as demais espécies do gênero.

COMPOSIÇÃO

Agar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de tiamina	2 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Tiamina

Tiamina	10 mg
Água destilada q.s.p	1.000 ml

Esterilizar a solução por filtração, e conservar a 5°C.

Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo a 121°C, por 15 minutos; esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de tiamina e distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Agar *Trichophyton* 5 (Ágar T5)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente o *T. equinum*, que tem seu crescimento bastante estimulado com a adição do ácido nicotínico, contrastando com as demais espécies do gênero.

COMPOSIÇÃO

Agar <i>Trichophyton</i> 1	100 ml
Solução de ácido nicotínico	2 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Ácido Nicotínico:

Ácido nicotínico	100 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar à 5°C.

Preparar o ágar *Trichophyton* 1 e autoclavá-lo a 121°C por 15 minutos; esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de ácido nicotínico e distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Agar *Trichophyton* 6 (Ágar T6)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, baseando-se em seus diferentes requerimentos vitamínicos.

COMPOSIÇÃO

Nitrato de amônio	1,5 g
Fosfato monopotássico	1,8 g
Sulfato de magnésio	0,1 g
Dextrose	40 g
Ágar bacteriológico	20 g
Água destilada q.s.p	1000 ml

PREPARO

Dissolver todos os componentes em água destilada aquecendo em banho-maria. Autoclavar a 121°C, por 15 minutos. Distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio e deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm .

**Esse meio pode ser adquirido comercialmente, na forma desidratada, sob o nome de *Agar Trichophyton* 6 (DIFCO).

Agar *Trichophyton*7 (Ágar T7)

OBJETIVO

Diferenciar espécies de *Trichophyton*, especialmente o *T. megninni* do *T. rubrum*, baseando-se na capacidade que a primeira espécie tem de ter seu crescimento estimulado pela presença de histidina, em oposição ao que ocorre com o *T. rubrum*.

COMPOSIÇÃO

Agar <i>Trichophyton</i> 6	100 ml
Solução de histidina	2 ml

PREPARO

Preparo da Solução de Histidina

Histidina	150 mg
Água destilada	100 ml

Esterilizar a solução por filtração e conservar a 5°C.

Preparar o ágar *Trichophyton* 6 e autoclavá-lo a 121°C, por 15 minutos; esperar esfriar até atingir a temperatura aproximada de 48°C. Adicionar a solução de histidina e distribuir alíquotas de 4 ml em tubos de ensaio. Deixar solidificar, na posição inclinada, de modo a obter uma superfície aproximada de 6 cm.

Ágar Uréia de Christensen's (Sólida)

OBJETIVO

Utilizado para diferenciar algumas espécies do gênero *Trichophyton*, como o *T. mentagrophytes* (que hidrolisa a uréia) e o *T. rubrum* (que não hidrolisa a uréia). É usado ainda para diferenciar as leveduras pertencentes aos filos Ascomycotina (p. ex. *Candida sp*, que não hidrolisa a uréia) e Basidiomycotina (p. ex. *Rhodotorula sp* e *Malassezia sp*, que hidrolisam a uréia). Esse teste se baseia na capacidade que determinadas espécies fúngicas possuem de produzir enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do meio vire de amarelo para rosa-escuro.

COMPOSIÇÃO

Solução A:

Uréia	agar	base	29 g
(Christensen's)			
Água destilada	q.s.p		100 ml

Suspender o ágar base uréia e em água destilada. Misturar até dissolver completamente. Esterilizar por filtração. Distribuir em alíquotas de 10 ml e manter, sob refrigeração, até o momento do uso.

Solução B:

Agar bacteriológico	15 g
Água destilada	900 ml

Dissolver o ágar em água destilada. Distribuir alíquotas de 90 ml em balões de vidro e esterilizar em autoclave, a 121°C por 15 minutos.

PREPARO

Para preparar 100 ml do meio, é necessário fundir 90 ml da solução B, esperar esfriar até que a mesma atinja aproximadamente 50°C e adicionar 10 ml da solução A. Homogeneizar bem a mistura e distribuir alíquotas de 1 ml em tubos de ensaio estéreis. Deixar solidificar na posição inclinada.

INTERPRETAÇÃO

A leitura desse teste deve ser feita, até 96 horas após semeado, uma vez que, a longo prazo, com o esgotamento do substrato do meio, os fungos morrem e conseqüentemente, liberam metabólitos alcalinos que promoverão a viragem da coloração do meio, inutilizando a leitura.

CORANTES

Lactofenol Azul-Algodão

OBJETIVO

Fluido de montagem entre lâmina-lamínula para examinar a micromorfologia das colônias fúngicas.

COMPOSIÇÃO

Ácido láctico	20 g
Fenol	20 g
Glicerina	20 g
Azul algodão	0.05 g
Água destilada	20 ml

OBS: O azul algodão pode ser substituído por qualquer azul de metileno.

Fundir os cristais de fenol e juntar com as demais substâncias. Esperar 24 h e filtrar com papel-filtro. Acondicionar em um frasco conta-gotas de cor âmbar.

** Esse corante pode ser adquirido já preparado sob as denominações: Lactophenol cotton blue (BBL) e corante azul algodão (Newprov).

TÉCNICA

Coloca-se 2 gotas do lactofenol sobre uma lâmina de microscopia limpa. Retira-se um pequeno fragmento da colônia fúngica a ser estudada e o imerge no líquido. Cobre com uma lamínula e observa-se ao microscópio óptico na objetiva de 40 X.

SOLUÇÕES

Solução Salina

OBJETIVO

Estoque de fungos.

COMPOSIÇÃO

Cloreto de sódio	0.9 g
Água destilada	100 ml

Misturar a água destilada e o cloreto de sódio. Autoclavar e distribuir alíquotas de 10 ml em tubos de vidro com tampa de roscar.

Solução de Hidróxido de Potássio (Potassa)

OBJETIVO

Utilizada para realização de exames diretos dos diversos espécimes clínicos. Promove a clarificação de escamas de pele e pêlos, proporcionando um índice de refração ótimo para a visualização de elementos fúngicos.

COMPOSIÇÃO

Hidróxido de potássio	30 g
Água destilada	100 ml

Dissolver o hidróxido de potássio em água destilada. Homogeneizar e acondicionar em frasco conta-gotas limpo.

OBS: A concentração de hidróxido de potássio pode variar entre 10 e 40%. Na nossa, achamos que a concentração ideal é a de 30%.

TÉCNICA

Colocar sobre uma lâmina de microscopia estéril 2 gotas da solução clarificante e sobre esta adicionar pequenas alíquotas do material clínico. Cobrir com lamínula. Aquecer levemente sob a chama do bico de Bunsen. Aguardar 10-15 minutos e observar ao microscópio óptico.

OBS: Caso a lâmina não seja observada na hora, deve-se acondicioná-la em uma câmara úmida para evitar seu ressecamento, bem como a formação de cristais que podem dificultar no diagnóstico.