

# Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina in vitro em agentes de micoses superficiais e subcutâneas\*

Evaluation of the disk-diffusion method to determine the in vitro efficacy of terbinafine against subcutaneous and superficial mycoses agents

Hilda Conceição Diogo<sup>1</sup>

Márcia Melhem<sup>2</sup>

Aldo Sarpieri<sup>3</sup>

Mario Cezar Pires<sup>4</sup>

**Resumo:** FUNDAMENTOS: As micoses superficiais e subcutâneas têm alta prevalência e, muitas vezes, caráter crônico, necessitando tratamentos tópicos e/ou sistêmicos com antifúngicos. As drogas de escolha são azóis e alilaminas (terbinafina). É necessário avaliar a eficácia das drogas para tratamento em humanos e em animais. Estudos para avaliar in vitro a ação dos antimicóticos são raros, especialmente, contra fungos filamentosos.

OBJETIVO - Avaliar a eficácia in vitro da terbinafina pelo método de disco-difusão contra fungos filamentosos e leveduras agentes de micoses.

MÉTODOS - Avaliou-se a ação da terbinafina (0,125µg-100µg) contra dez espécies fúngicas pelos métodos disco-difusão e microdiluição/referência, para determinar a concentração inibitória mínima (MIC).

RESULTADOS - Observou-se alta sensibilidade à terbinafina em: *T. rubrum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *C. carrionii* e *E. floccosum* (halo ≥ 40mm com disco de 0,125µg). *S. hyalinum* e *C. parapsilosis* foram considerados sensíveis, mas com halos menores. *Fusarium* spp. apresentou menor sensibilidade (halo=12mm com disco de 2µg; MIC 8µg/mL).

CONCLUSÕES - Os resultados reiteram estudos anteriores quanto à alta eficácia da terbinafina em relação a dermatófitos. A técnica de disco-difusão foi de fácil aplicação e adequada na rotina de laboratórios clínicos.

Palavras-chave: Antimicóticos; Arthrodermataceae; Fungos; Micoses

**Abstract:** BACKGROUND: Superficial and subcutaneous mycoses have a high prevalence and, often, chronic evolution. Therefore, they need extensive treatment with topic and/or systemic antifungal agents. Azoles and allylamines (terbinafine) are first-choice drugs to treat human and animal infections. Thus, evaluation of the efficacy of these drugs is important for a successful treatment. However, there are few studies that evaluate the in vitro activity of antifungal agents.

OBJECTIVE - To evaluate the in vitro efficacy of terbinafine activity against filamentous fungi and yeasts that cause mycoses.

METHOD - The in vitro activity of terbinafine (0.125-100µg) against 10 fungi species was evaluated by the disk-diffusion and microdilution/reference methods to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

RESULTS - We found a high susceptibility to terbinafine in: *T. rubrum*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *C. carrionii* and *E. floccosum* (halo ≥ 40mm with 0.125µg disk). *S. hyalinum* and *C. parapsilosis* were considered susceptible, but less than the others. *Fusarium* spp. showed the lowest susceptibility (halo=12mm with 2µg disk; MIC 8µg/mL).

CONCLUSIONS - The results of this research confirm previous findings about the efficacy of terbinafine. The drug was shown to be highly effective to treat dermatophyte infections. The disk-diffusion method was easy to use and is a suitable technique for routine use in clinical laboratories.

Keywords: Antifungal agents; Arthrodermataceae; Fungi; Mycosis

Recebido em 03.08.2009.

Aprovado pelo Conselho Consultivo e aceito para publicação em 19.03.2010.

\* Trabalho realizado no Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos e no setor de Micologia do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo (SP), Brasil.

Conflito de interesse / Conflict of interest: O produto terbinafina pró-análise foi cedido por Novartis Biociências S.A. e o material para o antifungograma, pelo Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. (Cecon), Brasil. Os autores não receberam nenhuma remuneração

Suporte financeiro / Financial funding: Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos e Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz.

<sup>1</sup> Mestre em Ciências da Saúde pela Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; bióloga - Ciências Biológicas com licenciatura plena - pela Faculdade de Guarulhos (2003); micologista voluntária do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Mestre e doutora em Saúde Pública pela Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo (USP); pesquisadora-científica Nível VI do Instituto Adolfo Lutz, Coordenadoria de Controle de Doenças (CDC) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Especialista em Dermatologia; médico voluntário do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos - São Paulo (SP), Brasil.

<sup>4</sup> Especialista em Dermatologia; doutor em Clínica Médica pelo Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual de São Paulo; diretor do Serviço de Dermatologia do Complexo Hospitalar Padre Bento de Guarulhos - São Paulo (SP), Brasil.

## INTRODUÇÃO

As micoses superficiais são frequentes na prática diária e são causadas, principalmente, por fungos filamentosos e, menos comumente, por leveduras.<sup>1</sup> Muitas vezes, essas infecções não são suficientemente tratadas pelos antimicóticos tópicos, havendo necessidade de terapêutica sistêmica.<sup>2</sup> A descoberta dos antifúngicos azóis, como cetoconazol, itraconazol e fluconazol, ofereceu considerável avanço para o tratamento dessas micoses,<sup>2</sup> mas a emergência de cepas de fungos resistentes tornou necessária a pesquisa de alternativas terapêuticas e novos sítios de ação.<sup>3</sup> Entre as drogas com mecanismo de ação diferente dos azóis encontra-se a terbinafina, pertencente à classe das alilaminas, com atuação sobre a enzima epoxidase da célula fúngica, especialmente indicada para infecções cutâneas produzidas por fungos do grupo dos dermatófitos.<sup>4</sup> Ao contrário dos imidazólicos, a terbinafina tem ação fungicida.<sup>1,2,3</sup> A terbinafina é mais seletiva para a célula fúngica do que a anfotericina B, antifúngico considerado padrão, devido à diferença das enzimas epoxidases dos mamíferos e dos fungos.<sup>5</sup> A terbinafina possibilita administração conjunta com outras drogas e seus efeitos colaterais ou tóxicos são considerados leves,<sup>6</sup> sendo os mais comuns distúrbios gastrintestinais e alterações do paladar.<sup>1</sup> Foram citados raros casos de positividade do fator antinúcleo.<sup>1</sup>

A avaliação *in vitro* da eficácia terapêutica é feita por método de referência, diluição em caldo ou em ágar.<sup>7,8</sup> No Brasil, Almeida e col. avaliaram a suscetibilidade de fungos causadores de micoses superficiais aos antifúngicos por meio da técnica de microdiluição.<sup>8</sup> No entanto, não há metodologia de referência para terbinafina e são necessários mais estudos para sua validação. Além disso, não há técnica de fácil aplicação em laboratórios clínicos para orientar a terapêutica ideal em casos de micoses causadas por fungos filamentosos, aqui incluídos os dermatófitos, assim como existe para infecções por leveduras. Neste último caso, utiliza-se o método M44-A (NCCLS, 2004),<sup>9</sup> aceito como referência apenas para leveduras do gênero *Candida* spp, baseado na técnica de disco-difusão com fluconazol. O objetivo deste estudo foi propor procedimentos para técnica de disco-difusão para determinar e comparar a eficácia *in vitro* da terbinafina, além de outras drogas, diante de fungos causadores de micoses superficiais e subcutâneas.

## MÉTODO

O estudo foi realizado com amostras de culturas de agentes de micoses superficiais ou subcutâneas comuns no Brasil, obtidas de lesões de pacientes do ambulatório de dermatologia. Fizeram parte do experimento os seguintes fungos:

Dermatófitos - *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum gypseum*,

*Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum* (agentes de micoses superficiais e subcutâneas);

Fungos não dermatófitos - *Scytalidium hyalinum*, *Fusarium oxysporum* (agentes de onicomicoses) e *Cladophialophora carrionii* (agentes de micoses subcutâneas).

Foram incluídas duas culturas de cepas-padrão de *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 05533). As amostras clínicas, isoladas até três anos antes do estudo, estavam armazenadas em água destilada, de acordo com técnica padronizada em nosso laboratório<sup>10</sup>, e, após a sua recuperação, procedeu-se à reidentificação por microcultivo modificado,<sup>11</sup> com base em análise morfológica.<sup>12,13</sup> A terbinafina foi cedida por Novartis Biociências S.A., em forma de pó puro pró-análise (p.a.). Os discos de terbinafina foram preparados em 13 concentrações, realizando-se duas séries de diluições à razão 2, desde 0,125mg até 16mg e de 25mg a 100mg. Discos (Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. - Cecon, Brasil) contendo nove antifúngicos foram usados para comparação de eficácia: 5-fluorocitosina (5 FC), anfotericina B (AB), nistatina (NY), econazol (EC), clotrimazol (CTR), miconazol (MCZ), ketoconazol (KET), fluconazol (FLU) e itraconazol (ICZ).

Para os testes de sensibilidade, um inóculo de cada amostra de fungo foi preparado por adição de 5mL de solução salina 0,85% contendo 1 gota de polisorbato (*Tween* 20, Sigma) à superfície de culturas, incubadas em períodos distintos de acordo com a exigência de crescimento dos fungos filamentosos.<sup>11,12,13</sup> Os inóculos de amostras de leveduras foram preparados por suspensão de 1-5 colônias (<5mm de diâmetro) em solução salina 0,85%. Cada suspensão de fungo filamentoso ou levedura foi ajustada de modo a conter  $1 \times 10^6$  a  $5,0 \times 10^6$  UFC/mL, primeiramente, por comparação da turbidez com o tubo 0,5 da escala de McFarland.<sup>9</sup> A concentração, então, foi aferida por três metodologias, a saber:

Ajuste da transmitância (68%-70%) em espectrofotômetro a 530nm<sup>13</sup>;

Contagem em hematócitolômetro<sup>14</sup>;

Contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) em ágar Sabouraud<sup>15</sup>.

A técnica de disco-difusão foi realizada segundo recomendações descritas no método M44-A.<sup>9</sup> Empregaram-se dois meios de cultura: ágar Muller Hinton contendo 2% de azul de metileno (MH-GMB) (Difco, USA)<sup>16</sup> e ágar *yeast nitrogen agar* (YMA)<sup>17</sup> (Difco, USA), os quais foram formulados segundo instruções dos fabricantes e aliquotados (70mL) em frascos lacrados, aquecidos e vertidos em placas de Petri no momento do uso. Os meios foram distribuídos em placas de Petri (150mm x 6mm) e na superfície se dis-

tribuíram os inóculos. Após a absorção completa dos inóculos, colocaram-se dez discos em pontos equidistantes contendo concentrações de terbinafina (0,125mg até 16mg). Para algumas amostras com menor sensibilidade à terbinafina (ausência de inibição diante da menor concentração ensaiada), analisaram-se, também, discos contendo concentrações maiores da droga (25mg, 50mg e 100mg). Discos com os demais antifúngicos foram avaliados segundo a mesma metodologia.<sup>9</sup> Na sequência, as placas foram invertidas e incubadas em estufa à temperatura de 30°C ± 2°C.<sup>11</sup> O grau de sensibilidade de cada amostra de fungo à terbinafina e aos demais antifúngicos foi avaliado pela medida (mm) do diâmetro da zona de inibição formado ao redor do disco após 24 horas a 120 horas da inoculação. Cada isolado foi classificado em: sensível, com sensibilidade intermediária ou resistente às drogas, conforme o tamanho da zona de inibição.<sup>17</sup> Com exceção da terbinafina, os critérios de classificação seguiram as instruções do fabricante (Cecon, Brasil). Para terbinafina, as zonas de inibição foram expressas em milímetros e a classificação das amostras foi realizada somente após comparação com os resultados da técnica de microdiluição.<sup>18</sup> As cepas-padrão ATCC foram incluídas em todos os testes.<sup>19</sup> Os critérios interpretativos das zonas de inibição, para indicar cepas resistentes, foram: 5 FC < 10mm, AB ≤ 10mm, NY ≤ 10mm, EC 10mm, CTR 10mm, MCZ 10mm, KET 10mm, FLU 14mm e ICZ ≤ 11mm.

Para a técnica de microdiluição, prepararam-se soluções-mãe (1.600µg/mL)<sup>20,21</sup> de terbinafina em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, USA). A partir dessa solução, realizaram-se dez concentrações, por diluição à razão 2, em meio líquido de RPMI-1640<sup>18</sup> (Cultilab, Brasil). Os testes foram preparados em placas de microtitulação, fundo plano, contendo 96 poços, com base no documento M38-A e recomendações descritas por Rodriguez-Tudela (2003).<sup>14</sup> Controles de crescimento negativo e positivo, além das cepas-padrão, foram incluídos em todos os testes para garantia da qualidade dos experimentos. As placas de teste foram homogeneizadas por quinze minutos a 65 rpm/minuto (Klime agitador, Marconi, Brasil) e incubadas sob temperatura de 35°C ± 2°C por até 72 horas. Após as primeiras 24 horas, fizeram-se leituras visuais para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) da terbinafina sobre cada um dos isolados ensaiados. Nos casos de crescimento insatisfatório, a placa foi reincubada e lida após 48 horas e 72 horas. A leitura do ponto final (*end point*) nos testes com fungos filamentosos foi efetivada sob espelho e considerou-se a concentração inibitória mínima da droga a que resultou em inibição completa do crescimento (IC<sub>100</sub>) do isolado. Para os testes com leveduras, utilizou-se espectrofotômetro com filtro de

492nm, para leitura automatizada do *end point*, determinado em 50% (IC<sub>50</sub>) de inibição do crescimento do isolado. Todos os testes foram feitos em duplicata.

## RESULTADOS

As culturas dos fungos usadas para avaliar a eficácia da terbinafina apresentaram alta produção de esporos, sendo, assim, adequadas para o preparo dos inóculos.<sup>22</sup> A Figura 1 ilustra os aspectos dos preparados.

As três metodologias distintas utilizadas na realização dos inóculos foram equivalentes, com as suspensões contendo 1 a 5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL. As zonas de inibição em ágar MH-GMB foram maiores, em média, do que as obtidas em YMA, independentemente do isolado ensaiado. As zonas de inibição indicaram que 70% das amostras, contendo todas as espécies de dermatófitos, foram inibidas na menor concentração (0,125mg) avaliada de terbinafina (Figura 2, Tabela 1). Somente três isolados (*Candida parapsilosis*, *Fusarium oxysporum* e *Scytalidium hyalinum*) não apresentaram zona de inibição nessas condições. No experimento com disco de 2µg/mL, conseguiu-se separar isolados com níveis de sensibilidade distintos, expressos em valores de zonas de inibição:

Sensível (zona > 40mm), categoria encontrada para dermatófitos;

Intermediária (zona 24mm a 35mm), verificado para *S. hyalinum* e *C. parapsilosis*;

Resistente (zona de 12mm), encontrada para *Fusarium oxysporum*.

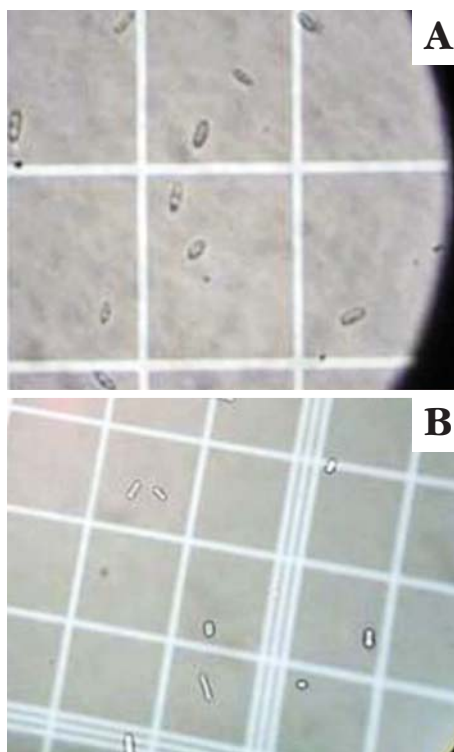


FIGURA 1: A e B. Aspecto microscópico de esporos (400x) de *Cladophialophora carrionii* e *Trichophyton tonsurans* - preparação do inóculo e contagem de esporos em câmara de Neubauer



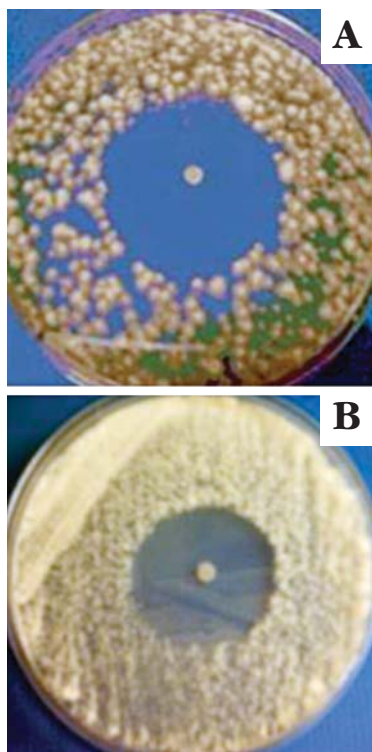


FIGURA 1: A e B. Placas de Petri com culturas de dermatófitos exibindo halos de inibição exagerados diante da menor concentração (0,125 $\mu$ g) de terbinafina

A zona de inibição para os isolados com sensibilidade à terbinafina classificados como intermediários e resistentes está demonstrada na tabela 2. Os resultados de MIC, pelo método de microdiluição em caldo, para as três amostras menos suscetíveis à terbinafina foram: 0,25mg/mL (*Scytalidium hyalinum*); >8mg/mL (*Fusarium oxysporum*) e 0,5mg/mL para *Candida parapsilosis*. Para *Trichophyton mentagrophytes*, o MIC da terbinafina foi de 0,015mg/mL.

A comparação da eficácia da terbinafina com a dos outros nove antifúngicos por microdiluição e disco-difusão está demonstrada nas tabelas 3 e 4.

## DISCUSSÃO

Os isolados clínicos foram armazenados em água destilada por três anos,<sup>9</sup> sem necessidade de repiques periódicos, evitando-se contaminação; desse modo, obteve-se alta produção de esporos livres de hifas, conforme recomendado para testes de sensibilidade.<sup>22</sup> Os inóculos preparados com três distintos procedimentos possibilitaram resultados similares. O método de contagem de esporos em hematocítômetro foi considerado o melhor, por: reduzir risco biológico da passagem do conteúdo do tubo de ensaio para a cuba de cristal do espectrofotômetro; assegurar a concentração desejada do inóculo de fungos filamentosos sem interferência da cor, forma e tamanho dos esporos,<sup>23</sup> ao contrário do que pode ocorrer na técnica com espectrofotômetro.<sup>14</sup> Além disso, o método que emprega hematocítômetro apresenta maior praticidade e rapidez em relação ao de contagem de unidades formadoras de colônias, que demanda procedimento adicional de semeadura.

Outro parâmetro avaliado no teste de disco-difusão foi o meio de cultura, sendo melhor o MH-GMB, por proporcionar a difusão da terbinafina e permitir maior zona de inibição em relação ao YMA. Outra vantagem de MH-GMB é o fato de estar disponível em laboratórios de microbiologia que executam testes de sensibilidade para bactérias. A temperatura de incubação adotada neste estudo (30°C  $\pm$  2°C) resultou em crescimento visível e homogêneo e, portanto, foi considerada adequada para as espécies ensaiadas. As zonas de inibição foram evidentes e de fácil mensuração após 24 horas para *C. parapsilosis* e 72 horas a 120 horas para os outros agentes, de acordo com o tempo de crescimento.

Quanto à concentração nos discos de terbinafina, observou-se que os resultados obtidos com valores  $\geq$  2mg resultaram em zonas de inibição para todas as

TABELA 1: Valores de diâmetros de zonas de inibição (mm) por disco-difusão com terbinafina diante de agentes de micoses superficiais e subcutâneas

Espécies	Concentração de TBF ( $\mu$ g)									
	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	5,0	8,0	10,0	16,0
<i>C. parapsilosis</i>	Ø	Ø	10	20	24	30	32	38	40	42
<i>C. carrionii</i>	40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40
<i>T. mentagrophytes</i>	40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40	$\geq$ 40
<i>T. tonsurans</i>	62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62	$\geq$ 62
<i>T. rubrum</i>	55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55
<i>M. canis</i>	47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47	$\geq$ 47
<i>M. gypseum</i>	50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50	$\geq$ 50
<i>E. floccosum</i>	55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55	$\geq$ 55
<i>F. oxysporum</i>	Ø	Ø	Ø	8	12	18	20	22	25	27
<i>S. hyalinum</i>	Ø	16	20	29	35	40	41	43	46	48

**TABELA 2:** Valores do diâmetro (mm) de zonas de inibição para isolados resistentes ou com sensibilidade intermediária a 2µg/mL de terbinafina em dois meios distintos: MH-GMB (Mueller Hinton Agar + 2% de glicose e azul de metileno) e YMA

Agente	Concentrações adicionais de TBF					
	25mg		50mg		100mg	
	MH-GMB	YMA*	MH-GMB	YMA	MH-GMB	YMA
<i>S. byalinum</i>	51	50	56	54	61	59
<i>C. parapsilosis</i>	44	41	46	44	48	46
<i>F. oxysporum</i>	29	25	33	31	38	35

Zona de inibição (mm) de três agentes menos sensíveis à TBF

espécies ensaiadas. Disco de 2mg expõe o isolado a concentrações equivalentes às verificadas no soro de seres humanos, mimetizando, assim, parte do que ocorre *in vivo*. A concentração de 2mg foi considerada adequada para o teste de disco-difusão, desde que permitiu separar perfis distintos de suscetibilidade à terbinafina. Em testes com dermatófitos, grupo de fungos com alta suscetibilidade à terbinafina que produzem zonas de inibição  $\geq 61$ mm, recomenda-se colocar apenas um disco de 2mg por placa de Petri.

Este estudo comprovou achados anteriores que demonstraram a alta eficiência (100%) da terbinafina em relação ao grupo de dermatófitos.<sup>24</sup> Zonas de inibição  $\geq 35$ mm foram obtidas com discos de 2µg, correspondendo a MIC de 0,03µg/mL, no método de microdiluição. Esse valor de MIC está muito abaixo da dose sérica (0,8µg/mL a 1,5µg/mL)<sup>6</sup> e tecidual estabelecida na fase de desenvolvimento do medicamento,<sup>25</sup> o que permitiu classificar as amostras em três cate-

gorias: sensível, intermediária e resistente à terbinafina. Os testes com a maioria dos agentes mostraram grandes zonas de inibição de crescimento, o que coincidiu com dados da literatura consultada.<sup>26</sup> Vale ressaltar que, até o presente momento, não se estabeleceu nenhum valor-limite (*breakpoint*), ou critério interpretativo, para designar cepas resistentes à terbinafina. Não existem, até o momento, trabalhos clínicos disponíveis na literatura pesquisada que dêem suporte para a correlação *in vitro-in vivo* da resistência de fungos aos antimicóticos. Somente estes estudos, associados aos conhecimentos da farmacodinâmica e farmacocinética (PK-PD) da droga, poderiam permitir a determinação de valores-limites de sensibilidade (*breakpoint*).

Os resultados aqui encontrados não podem ser comparados com estudos anteriores em que foi adotado o critério interpretativo de sensível para fungos filamentosos que apresentaram zonas de inibição de

**TABELA 3:** Eficácia da TBF e outras nove drogas [halo de inibição - mm, (S) Sensível (R) Resistente]

ANTIFÚNGICOS (°g)	<i>S. byalinum</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	MH-GMB	YMA	MH-GMB	YMA	MH-GMB	YMA
AB (100)	55 (S)*	40 (S)	26 (S)	13 (S)	13 (S)	12 (S)
5 FC (1)	Ø (R)*	Ø (R)	Ø	Ø	Ø (R)	Ø (R)
NY (100 U.I.)	61 (S)	55 (S)	36 (S)	23 (S)	20 (S)	13 (S)
CTR (50)	40 (S)	45 (S)	41 (S)	41 (S)	11 (R)	11 (R)
MCZ (50)	42 (S)	43 (S)	28 (S)	32 (S)	Ø (R)	Ø (R)
KET (50)	30 (S)	26 (S)	55 (S)	53 (S)	Ø (R)	Ø (R)
EC (50)	60 (S)	61 (S)	34 (S)	35 (S)	25 (S)	21 (S)
ICZ (10)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
5 FC(10)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
FLU (25)	24 (S)	33 (S)	28 (S)	22 (S)	Ø (R)	Ø (R)
TBF (25)	51	50	44	41	29	25
TBF (50)	56	54	46	44	33	31
TBF (100)	61	59	48	46	38	35

\* Zona de inibição em mm

**TABELA 4:** Comparação da eficácia da terbinafina e outros nove antifúngicos diante de agentes causadores de micoses por método de disco-difusão

Agentes antifúngicos (concentração, °g)	<i>S. hyalinum</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	MH-GMB	YMA	MH-GMB	YMA	MH-GMB	YMA
Anfotericina B (100)	55* (S)**	40 (S)	26(S)	13 (S)	13(S)	12
5 fluorocitosina(1)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
Nistatina (100 UI)	61 (S)	55 (S)	36(S)	23(S)	20(S)	13 (S)
Clotrimazol (50)	40 (S)	45 (S)	41(S)	41(S)	11(R)	11(R)
Miconazol (50)	42 (S)	43 (S)	28(S)	32(S)	Ø (R)	Ø (R)
Cetoconazol (50)	30 (S)	26 (S)	55(S)	53(S)	Ø (R)	Ø (R)
Econazol (50)	60 (S)	61 (S)	34(S)	35(S)	25(S)	21(S)
Itraconazol (10)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
5 fluorocitosina (10)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)	Ø (R)
Fluconazol (25)	24 (S)	33 (S)	28(S)	22(S)	Ø (R)	Ø (R)
TBF (25)	51	50	44	41	29	25
TBF (50)	56	54	46	44	33	31
TBF (100)	61	59	48	46	38	35
TBF (100)	61	59	48	46	38	35

\*Diâmetro do halo de inibição (mm)

\*\*S: sensível; I: intermediário; R: resistente; U.I.: unidade internacional

25mm a 28mm em relação a discos com  $30\mu\text{g}^{26}$  de terbinafina. Neste estudo, observou-se que discos contendo concentrações maiores do que  $10\mu\text{g}$  não permitiriam discriminar isolados com perfis distintos de sensibilidade (Tabela 1).

*S. hyalinum* e *C. parapsilosis* em 2mg de terbinafina exibiram, respectivamente, zonas de 35mm e 24mm, correspondendo à MIC  $0,25\mu\text{g/mL}$  e MIC  $0,5\mu\text{g/mL}$ . Essas espécies foram classificadas na categoria de sensibilidade intermediária, pela proximidade da MIC aos valores séricos da terbinafina. *Fusarium oxysporum* foi considerado resistente (zona  $\leq 12\text{mm}$  com disco de  $2\mu\text{g/mL}$ ) pelos resultados de MIC de  $8\mu\text{g/mL}$  na microdiluição, valor muito acima do encontrado na dose sérica. De fato, essa espécie mostra baixa suscetibilidade à terbinafina, como descrito anteriormente,<sup>27</sup> sendo necessárias concentrações superiores a  $32\mu\text{g/mL}$  para inibição de espécies de *Fusarium* spp.<sup>28,29,30</sup> *Fusarium oxysporum* foi utilizada, neste estudo, como modelo para comparação da eficácia entre as drogas investigadas. Essa espécie, mesmo sendo resistente, apresentou zonas de inibição maiores diante da terbinafina, em comparação com as outras nove drogas avaliadas, quando empregadas as mesmas concentrações.

Espécies de *Candida* spp. e outros agentes não dermatófitos, de interesse em Dermatologia, têm sensibilidade variável à terbinafina. Portanto, seu perfil de suscetibilidade não é previsível à droga, indicando-se, nesses casos, implantação de testes de triagem em laboratórios de rotina, com vistas à orientação terapêutica.

Conclui-se que o método de disco-difusão, com os parâmetros propostos, foi de fácil aplicação para rotina laboratorial e permitiu identificar isolados clínicos com baixa sensibilidade à droga. Indica-se para os testes de disco-difusão a concentração de 2mg de terbinafina, meio de Mueller-Hinton com 2% de glicose e azul de metileno, incubação à temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , por período de 24 horas a 120 horas, de acordo com a espécie do fungo; para testes com dermatófitos, recomenda-se a colocação de um único disco por placa e a adoção de *Fusarium oxysporum* como cepa-controle de qualidade do método. A terbinafina demonstrou boa ação, *in vitro*, contra dermatófitos e sua ação foi menor contra leveduras. Futuros estudos são necessários para correlacionar cepas com menor sensibilidade *in vitro* à terbinafina e evolução clínica de casos tratados com essa droga. A validação de *breakpoints* para terbinafina e sua importância no prognóstico clínico são fundamentais e demandam investigações adicionais. □

## REFERÊNCIAS

1. Soares Z, Costa AR. Micose superficiais e profundas. In: Sittart JAS, Pires MC, editores. *Dermatologia na prática médica*. São Paulo: Roca; 2007. p.201-26.
2. Vera JRM, Cervera LA. Ventajas y desventajas de los antifúngicos de uso tópico. [acesso 14 Maio 2006]. Disponível em: [www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0301/rev1](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0301/rev1).
3. Soares MMSR, Cury AE. *In Vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. *Brazilian J Microbiol.* 2001;32:130-4.
4. Mellado E, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. *Enferm Infec Microbiol Clin.* 2002;20:523-30.
5. Gupta AK, Kohli Y. *In vitro* susceptibility testing of ciclopirox, terbinafine, ketoconazole and itraconazole against dermatophytes and nondermatophytes, and in vitro evaluation of combination antifungal activity. *Br Assoc Dermatol.* 2003;149:296-305.
6. Jain S, Sehgal VN. Terbinafine, a unique oral antifungal: current perceptions. *Int J Dermatol.* 2000;39:412-23.
7. Jensen JC. Clinical Pharmacokinetics of Terbinafine (Lamisil). *Clin Experiment Dermatol.* 1989;14:110-3.
8. Almeida LMM, Souza EAF, Bianchin DB, Svidzinski TIE. Resposta in vitro de fungos agentes de micose cutânea frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. *An Bras Dermatol.* 2009;84:249-55.
9. NCCLS - Clinical Laboratory Standards Institute Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Proposed Guideline - M. 44A .2004;23.
10. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC. Preservação de fungos em água destilada. *An Bras Dermatol.* 2005;80:591-4.
11. Diogo HC, Sarpieri A, Pires MC, Melhem MSC. Técnica Alternativa para Microcultivo de Fungos Filamentosos. In: VI encontro do Instituto Adolfo Lutz; 2005 out 3-6; São Paulo. Brasil: Secretaria de Estado da Saúde; 2005. p.155.
12. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Guia para Identificação - Fungos - Actinomicetos - Algas De Interesse Médico. São Paulo: Sarvier; 1998.
13. Laroni DH. Medically Important Fungi - A guide to Identification. 3rd ed. Washington: ASM Press; 1995. p.20-206.
14. Carrillo-Muñoz AJ, Santos P, Del Valle O, Casals JB, Quindós G. ¿Es activa la anfotericina B frente a hongos dermatófitos & *Scopulariopsis brevicaulis*? *Rev Esp Quimioterap.* 2004;17:244-9.
15. Rodríguez-Tudela JL, Chryssanthou E, Petrikkou E, Mosquera J, Denning DW, Cuenca-Estrella M. Interlaboratory Evaluation of Hemacytometer Method of Inoculum Preparation for Testing Antifungal Susceptibilities of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol.* 2003;5236-7.
16. Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Unidad de Micología Centro Nacional de Microbiología Instituto De Salud Carlos III. Determinación Mínima Inhibitoria de Antifúngicos frente a Hongos Filamentosos. Protocolo. 2001.
17. Pfaller MA, Boyken L, Messer SA, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Evaluation of the ETEST Method Using Mueller-Hinton Ágar With Glucose and Methylene Blue for Determining Amphotericin B MICs for 4.936 Clinical Isolates of Candida Species. *J Clin Microbiol.* 2004;49:77- 4979.
18. Xu J, Vilgalys R, Mitchell TG. Colony size can be used to determine the MIC of fluconazole for pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2383-5.
19. NCCLS - Clinical Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi: Approved Standard - M38-A. 2002;22.
20. Elsevier.com [homepage]. Barros MES, Santos DA, Handam JS. *In vitro* methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton spp.* *J mycres* [acesso 14 Maio 2006]. 2006;110:355-360. Disponível em: [www.elsevier.com/locate/mycres](http://www.elsevier.com/locate/mycres).
21. Meletiadis J, Méis JFGM, Mouton JW, Donnelly JP, Verweij PE. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-Dimethyl-2Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromide (MTT) Methods of In Vitro Susceptibility Testing of Filamentous Fungi and Development of a New Simplified Method. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2949-54.
22. Serena C, Pastora FJ, Ortoneda M, Capilla J, Nolard N, Guarro J. In Vitro Antifungal Susceptibilities of Uncommon Basidiomycetous Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2724-6.
23. Santos DA, Handan JS. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *J Clin Microbiol.* 2005;1917-1920.
24. Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. Pueden basarse las indicaciones de los Antifúngicos en los Estudios de Sensibilidad? *Rev Iberoam Micol.* 2002;19:133-8.
25. Ryder NS, Wagner S, Leitner I. In Vitro activities of Terbinafine against Cutaneous Isolates of *Candida albicans* and Other Pathogenic Yeasts. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42: 1057-61.
26. Esmerino LA, Pereira AV, Adamowicz T, Borges DM, Talacimon EA, Schelesky ME. Método Microbiológico para Determinação da Potência de Antimicrobianos. *UEPG Ci Biol Saúde.* 2004;53-60.
27. Vivas JRC, Torres - Rodriguez JM. Sensibilidad de Hongos Miceliares Dematiáceos a Diez Antifúngicos Empleando um Método de Difusión em Ágar. *Rev Iberoam Micol* 2001; 18:113 -7.
28. Speeleveid E, Gordts B, Van-Landuyt HW, De-Vroey C, Raes-Wuytack C. Susceptibility of Clinical of *Fusarium* to antifungal drugs. *Mycoses* 1996;39:37-40.
29. Garcia-Effron G, Gomez-Lopez A, Mellado E, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. In vitro activity of terbinafine against medically important non-dermatophyte species of filamentous fungi. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53:1086-9.
30. Bossche HV, Engelen M, Rochette F. Antifungal agents of use in animal health - chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J Vet Pharmacol Therap.* 2003;26: 5-29.

---

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA / MAILING ADDRESS:

Hilda Conceição Diogo  
 R. Diogo Feijó, 135  
 07055 170 Guarulbos - SP  
 E-mail: [hilpeixe@yahoo.com.br](mailto:hilpeixe@yahoo.com.br)

Como citar este artigo/How to cite this article: Diogo HC, Melhem M, Sarpieri A, Pires MC. Avaliação do método de disco-difusão para determinação da eficácia da terbinafina *in vitro* em agentes de micose superficiais e subcutâneas. *An Bras Dermatol.* 2010;85(3):324-30.