UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de
Neoscytalidium dimidiatum e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a
fotossensibilizadores

Ludmilla Tonani Carvalho

Ribeirão Preto

2015

Ludmilla Tonani Carvalho

Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de
Neoscytalidium dimidiatum e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a
fotossensibilizadores

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcia Regina von
Zeska Kress

Ribeirão Preto

2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Tonani, Ludmilla

Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a fotossensibilizadores
137 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Kress, Marcia Regina von Zeska

1. *Neoscytalidium dimidiatum*. 2. Teste de sensibilidade a antifúngicos. 3. Inativação fotodinâmica antimicrobiana. 4. Fotossensibilizadores fenotiazínicos. 5. MLST.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Ludmilla Tonani Carvalho

Título do trabalho: Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a fotossensibilizadores

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Bioquímica

Orientador: Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICO ESSE TRABALHO,

aos meus pais Ivan e Silvia Helena pelo exemplo de vida, orientação e amor incondicional;

ao meu querido marido Paulo Victor pela força, dedicação e compreensão nos momentos de ausência,

aos meus irmãos Ivan Luis e João Victor pelo grande carinho e amizade;

a minha avó Dodozinha pelo cuidado e docura que sempre demonstra em seus olhos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Marcia Regina von Zeska Kress pelo reconhecimento e incentivo na minha vida acadêmica e pelas críticas construtivas que ajudaram na minha evolução;

Ao Prof. Dr. Gilberto Úbida Leite Braga pela colaboração com os experimentos de inativação fotodinâmica de fungos e pelas inúmeras discussões que tanto enriqueceram esse trabalho;

À funcionária Maria Emília Nadaletto Bonifácio pela doação dos isolados clínicos utilizados nesse trabalho;

Ao aluno de doutorado Henrique Dantas de Menezes do Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da FCFRP-USP pelo auxílio na realização dos experimentos de inativação fotodinâmica de fungos;

À Gabriela Braga Rodrigues pela colaboração com os experimentos de citometria de fluxo;

Aos meus amigos do LEGPFF (Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungo Filamentoso) Tiago Alexandre Cocio, Mario Henrique Paziani, Henrique Dantas de Menezes, Natália Morosini, Natália Nossi, Raphael Festuccia e Raquel Santos e aos meus amigos do LEBEM (Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular) Carolina Capizzani, Renata Galetti, Natália Caçador, Eduardo Clímaco, Leonardo Andrade, Anelise Ballaben, Joseane Cristina Ferreira e André Pitondo pela colaboração nos momentos de trabalho e alegria vividos durante esses anos;

Aos meus primos Juliano da Silva, Vanessa Souza da Silva, Felipe Souza da Silva e Pedro Souza da Silva pelo carinho constante;

Aos meus amigos Larissa Pereira Eiras, Igor Lupino, Sabrina Coppola, Henrique Theodoro, Denise Souza, Danilo Melo, Élike Scañavez, Nãbila Cristensen, Mara Rúbia Paçilha, Guilherme Ferraz e Juliana Machado Carvalho pela parceria de muitos anos;

Aos amigos que me trazem alegria e que me incentivam tanto na minha vida acadêmica;

À minha nova família Rosemary Machado Carvalho, João Carlos Prado Carvalho, Daniele Machado Carvalho, Victor Hugo Machado Carvalho, Leonardo Laudino, Clotildes Prado Carvalho, Juliano Carvalho Arantes, Irma Machado por me incluírem realmente nessa família;

Aos meus irmãos Ivan Luis Tonani e João Victor Tonani pelas conversas, pelo grande apoio e carinho;

A meu querido Paulo Victor Machado Carvalho por se fazer tão presente e iluminado;

Aos meus pais, Ivan Tonani e Sílvia Helena Gineti Tonani e minha avó Santina Meloni (Dodô) pelo pilar de sustentação e guia para toda vida.

A Deus por sempre iluminar meu caminho e por fazer possível a realização de mais esse sonho!

RESUMO

Tonani, L. **Caracterização do perfil de susceptibilidade de isolados clínicos de *Neoscytalidium dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos antifúngicos e a fotossensibilizadores.** 2015. 137 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O gênero *Neoscytalidium* está crescentemente sendo associado às infecções superficiais e profundas causadas em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. O fungo filamentoso *Neoscytalidium dimidiatum* é um microrganismo saprofítico e fitopatogênico, encontrado no solo e vegetação de regiões de clima tropical e subtropical. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e *N. dimidiatum* estão envolvidos em infecções superficiais de pele e unha sendo que a espécie produtora de melanina, *N. dimidiatum*, está associado preferencialmente a infecções profundas sugerindo que a espécie variante não produtora de melanina, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, pode ser menos virulenta que a pigmentada. Pouco é descrito na literatura sobre as variedades em questão tanto em relação à sensibilidade a drogas antifúngicas e ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFDA), bem como a características fisiológicas referentes à tolerância a variações de temperatura e pH. Assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo de isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* obtidos de infecções de pele e unha. Neste estudo foram realizadas a identificação molecular, a filogenia multilocus, a verificação *in vitro* do desenvolvimento em diferentes temperaturas e pHs e a caracterização *in vitro* do perfil de susceptibilidade a antifúngicos e TFDA com fotossensibilizadores (FSs) fenotiazínicos, bem como os efeitos do TFDA nas biomoléculas dos artroconídios das variedades estudadas. A filogenia multilocus foi realizada pelo sequenciamento de sete diferentes *loci* onde foi evidenciado polimorfismo na região *Internal Transcribed Spacer* (ITS) 1 e nos genes β -Tubulina (TUB), Fator de Alongamento de cadeia 1 α (EF1) e Histona H3 (HH3). O agrupamento dos isolados clínicos deste estudo em genótipos distintos permitiu a separação em 6 tipos de sequência (TSs), sendo que o TS5 foi composto apenas pela espécie variante *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. A análise de desenvolvimento em diferentes temperaturas e pHs demonstrou um tamanho de colônia reduzido para todos os isolados de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Anfotericina B, voriconazol e terbinafina foram os antifúngicos mais eficientes para ambas variedades. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) encontrados para os derivados azólicos foram baixos para todos os isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Os isolados clínicos de *N. dimidiatum* mostraram ser menos sensível ao TFDA com os FSs azul de metileno (MB), novo azul de metileno N (NMBN), azul de toluidina O (TBO) e novo derivado sintético (S137) quando comparado à variedade hialina. NMBN e S137 mostraram maior eficiência para inativação de *Neoscytalidium* spp. Adicionalmente, no TFDA todos os FSs apresentaram efeito de permeabilidade de membrana plasmática, embora somente NMBN e S137 apresentaram a produção de Malondialdeído (MDA), isto é, causaram a peroxidação lipídica nos artroconídios de *N. dimidiatum* e da variedade hialina.

Palavras-chave: *Neoscytalidium* spp., filogenia por análise de multilocus, teste de sensibilidade a antifúngicos, tratamento fotodinâmico antimicrobiano, fotossensibilizadores fenotiazínicos.

ABSTRACT

Tonani, L. **Clinical isolates susceptibility profile characterization *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* to photosensitizers and antifungals.** 2015. 137 f. Dissertation (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Neoscytalidium sp. is increasingly being associated with superficial and deep infections in immunocompromised and immunocompetent patients. The filamentous fungus *Neoscytalidium dimidiatum* is a saprophytic and plant pathogenic microorganism that is found in soil and vegetation of tropical and subtropical regions. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* and *N. dimidiatum* are involved in superficial skin and nail infections. The melanin producer *N. dimidiatum* is preferably associated with deep infections suggesting that the clinical isolate without melanin, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, may be less virulent than the pigmented variety. Little is described in the literature regarding the varieties *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* about the sensitivity to antifungal drugs and photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), and the physiological characteristics related to the growth at different temperature and pH. Therefore, the present study aimed to investigate clinical isolates of *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* obtained from skin and nail infections. Here in this study were performed the molecular identification, multilocus phylogeny, the *in vitro* characterization of development at different temperatures and pHs, and the characterization of *in vitro* susceptibility to antifungal agents and PACT with phenothiazinium photosensitizers (PSs), as well the PACT effects on the biomolecules of the *Neoscytalidium* spp. arthroconidia. The multilocus phylogeny was performed by sequencing seven different *loci* where polymorphism were identified in the Internal Transcribed Spacer (ITS) 1 region of rDNA and in the genes β -tubulin (TUB), elongation factor 1 α (EF1) and Histone H3 (HH3). The grouping of the clinical isolates from this study in different genotypes allowed the clustering in 6 sequence types (ST), in which the ST5 was composed exclusively by all *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates from this study. The analysis of development at different temperatures and pHs showed a reduced colony size for all *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates. Amphotericin B, voriconazole and terbinafine were the most effective antifungal for both varieties. The minimal inhibitory concentrations (MICs) values found for the azoles derivatives were low for all *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates. *N. dimidiatum* clinical isolates have shown to be less sensitive to PACT with the PS methylene blue (MB), new methylene blue (NMBN), toluidine blue O (TBO) and new synthetic derivative (S137) when compared to hyaline variety. NMBN and S137 have shown more effectiveness for the inactivation of *Neoscytalidium* spp. Additionally, all PS in PACT have caused plasma membrane permeability, although only NMBN and S137 showed the production of malondialdehyde (MDA), i.e., caused lipid peroxidation in both *N. dimidiatum* and hyaline variety.

Keywords: *Neoscytalidium* spp., multilocus phylogeny, antifungal sensitivity test, photodynamic antimicrobial chemotherapy, phenothiazine photosensitizers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Esquema representativo do TFD.....	9
Figura 2 –	Estrutura química dos FSs fenotiazínicos utilizados no estudo.....	27
Figura 3 –	Espectro de absorção no visível dos FSs fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137.....	28
Figura 4 –	Fluxograma demonstrativo do experimento de fotossensibilização.....	28
Figura 5 –	Características macro e micromorfológicas de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>.....	35
Figura 6 –	Aspecto macromorfológico de <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> (A e B) e <i>N. dimidiatum</i>.....	35
Figura 7 –	Árvore gerada a partir da análise UPGMA da combinação dos sete <i>loci</i> gênicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>.....	41
Figura 8 –	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> apresentou reduzido crescimento das hifas em diferentes temperaturas e pHs. A. e B.....	44
Figura 9 –	Fração de sobrevivência dos artroconídios não germinados dos isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> ao TFDA com os FSs MB, NMBN, TBO e S137.....	58
Figura 10 -	Fração de sobrevivência dos artroconídios germinados e não germinados dos isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> no TFDA com os FSs.....	59
Figura 11 -	Fração de sobrevivência <i>versus</i> permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com MB.....	61
Figura 12 -	Fração de sobrevivência <i>versus</i> permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com NMBN.....	62
Figura 13 -	Fração de sobrevivência <i>versus</i> permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com TBO.....	63
Figura 14 -	Fração de sobrevivência <i>versus</i> permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com S137.....	64
Figura 15 -	Fração de sobrevivência <i>versus</i> quantidade de MDA no TFDA com os FSs MB, TBO, NMBN e S137.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	<i>Primers</i> utilizados neste trabalho.....	22
Tabela 2 –	Aspectos epidemiológicos dos isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> isolados de infecção de pele e unha no Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP no período de 2004 a 2014.....	36
Tabela 3 –	Mutações encontradas entre os isolados clínicos avaliados nesse estudo.....	39
Tabela 4 –	Médias geométricas de CIM50 e CIM90 dos isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> na presença de diferentes drogas antifúngicas.....	48
Tabela 5 –	Intervalo e média geométrica da CIM90 obtida nos testes de sensibilidade a antifúngicos com os isolados clínicos e linhagens ATCC de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>, agrupados de acordo com os tipos de sequência (TSs).....	51
Tabela 6 –	Concentração inibitória mínima (CIM) dos FSs TBO, MB, NMBN e S137, na ausência de luz, para os isolados clínicos estudados.....	53
Tabela 7 –	Faixa e média da concentração inibitória mínima (CIM) obtida no TFDA com os isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
×	Vezes
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
A	Adenina
ABI	<i>Applied Biosystem Institute</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American type culture collection</i>
C	Citosina
CBS	<i>Centraal Bureau voor Schimmelcultures</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM	Concentração fungicida mínima
CHS	Quitina sintase
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm	Centímetro
cm ²	Centímetro quadrado
CoCl ₂ .5H ₂ O	Cloreto de cobalto pentahidratado
Cu(SO ₄).5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido

DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EF1	Fator de alongamento de cadeia 1 α
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
FS	Fotossensibilizador
g	Grama
g	Gravidade
G	Guanina
GPD	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
h	Hora
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HH3	Histona H3
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
IF	Inativação fotodinâmica
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer</i>
J	Joule
KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potássio
kJ	Kilojoule
KOH	Hidróxido de potássio
l	Litro
LED	<i>Light-emitting diodes</i>
Log P	Coeficiente de partição
m	Metro

M	Molar
m/v	Relação massa-volume
m/z	Relação massa-carga
MB	Azul de metileno (<i>Methylene blue</i>)
MDA	Malondialdeído
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
MES	<i>2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid</i>
$(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Molibdato de amônio tetrahidratado
mg	Miligrama
MG	Média geométrica
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio heptahidratado
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de manganês tetrahidratado
NaCl	Cloreto de sódio
Na_2HPO_4	Fosfato dibásico de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NaNO_3	Nitrato de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NMBN	Novo azul de metileno N (<i>New methylene blue N</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PhBP _a	Fotossensibilizadores fenotiazínicos (<i>Phenothiazinum based photosensitizers</i>)

PBS	Salina tamponada com tampão fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDA	Ágar Batata Dextrose (<i>Potato dextrose agar</i>)
PDAY	Ágar Batata Dextrose acrescido de extrato de levedura (<i>yeast extract</i>)
PDB	Caldo Batata Dextrose (<i>Potato dextrose broth</i>)
pH	Potencial de hidrogênio iônico
PI	Iodeto de propídio
¹ PS	Fotossensibilizador no estado fundamental
¹ PS*	Fotossensibilizador no estado excitado singlete
³ PS*	Fotossensibilizador no estado excitado triplete
p/v	Razão peso-volume
ϕ_A	<i>Quantum yields</i>
rDNA	DNA ribossomal
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorfism</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
S137	Derivado do azul de metileno não comercial
SAC	Serviço de Análises Clínicas
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
T	Timina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBO	Azul de toluidina O (<i>Toluidine blue O</i>)
TFD	Tratamento fotodinâmico
TFDA	Tratamento fotodinâmico antimicrobiano

TS	Tipo de sequência
TUB	Cadeia beta de tubulina
UFC	Unidades formadoras de colônias
TFDA	Tratamento fotodinâmico antimicrobiano
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume-volume
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinco heptahidratado

SUMÁRIO

RESUMO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	v
1. Introdução	1
1.1. Morfologia e Taxonomia do Fungo	1
1.2. Filogenia molecular e <i>Multilocus Sequence Typing</i>	3
1.3. O fungo causador de dermatomicose	4
1.4. Suscetibilidade de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> à terapia antifúngica	6
1.5. Ação de antifúngicos na célula fúngica	7
1.5.1. Anfotericina B	7
1.5.2. Antifúngicos azólicos	7
1.5.3. Equinocandinas	7
1.5.4. Flucitosina	8
1.5.5. Terbinafina	8
1.6. O tratamento fotodinâmico	8
2. Objetivos	12
2.1. Objetivos gerais	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. Materiais e Métodos	15
3.1. Meios de Cultura	15
3.2. Soluções	16
3.2.1. Soluções de uso geral	16
3.2.2. Soluções para ensaio com DNA	17
3.3. Verificação da viabilidade e da pureza dos isolados clínicos cedidos pelo Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto	18
3.3.1. Identificação clássica dos isolados clínicos de fungos filamentosos	19
3.3.2. Identificação molecular dos isolados clínicos de fungos filamentosos	19

3.4. Análise de polimorfismo por <i>Multilocus Sequence Typing</i> dos isolados clínicos das variedades de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	20
3.4.1. Extração de DNA genômico de fungo filamentosos	20
3.4.2. Amplificação por PCR das regiões ITS do rDNA e dos genes quitina sintase, β -tubulina, histona H3, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fator de alongamento de cadeia 1 α	21
3.4.3. Sequenciamento e análise de polimorfismo	22
3.5. Análise do crescimento dos isolados clínicos frente a variações de pH e temperatura	23
3.6. Análise do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos a antifúngicos segundo o protocolo M38A e M38A2 do <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	23
3.6.1. Preparação dos antifúngicos	23
3.6.2. Preparo do inóculo	25
3.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima	25
3.7. Análise da resposta dos isolados clínicos frente ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano	26
3.7.1. Avaliação do tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela concentração inibitória mínima	26
3.7.2. Avaliação do tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela fração de sobrevivência em artroconídios não germinados e germinados	29
3.7.3. Análise de permeabilidade de membrana em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano	30
3.7.4. Avaliação da peroxidação lipídica em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela análise da produção de malondialdeído	31
3.8. Análise estatística	32
4. Resultados	34
4.1. Isolados Clínicos	34
4.2. Análise de polimorfismo por <i>Multilocus Sequence Typing</i> e análise filogenética	37
4.3. Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura	42
4.4. Teste de sensibilidade a antifúngicos	45
4.5. Tratamento fotodinâmico antimicrobiano	52
4.5.1. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico antimicrobiano nos artroconídios de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> pela concentração inibitória mínima	52

4.5.2. Inativação fotodinâmica antimicrobiana pela avaliação da fração de sobrevivência	56
4.5.3. Análise de permeabilidade de membrana em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano	60
4.5.4. Avaliação da peroxidação lipídica em artroconídios pela análise da produção de malonaldeído expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano.....	65
5. Discussão.....	68
6. Conclusões.....	76
7. Referências bibliográficas	78
APÊNDICES	86
APÊNDICE I: Tabela de identificação molecular dos isolados clínicos de <i>N. dimidiatum</i> e <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	86
APÊNDICE II – Identificação das sequências depositadas no <i>GenBank</i>	87
APÊNDICE III: Sequências depositadas no <i>GenBank</i>	88
APÊNDICE IV: Diâmetros das colônias dos isolados clínicos (cm) de acordo com o tempo de crescimento. Crescimento acompanhado a 28 e 37 °C sob leitura de 12 em 12 h.....	112
APÊNDICE V: Manuscrito submetido à <i>Mycoses</i> , intitulado: “Antifungal susceptibility and molecular features of <i>Neoscytalidium dimidiatum</i> isolated from skin and nail infections”	114

INTRODUÇÃO

"A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nós acostumamos a ver o mundo".

(Albert Einstein)

1. Introdução

1.1. Morfologia e Taxonomia do Fungo

O fungo *Natrassia mangiferae* foi primeiramente descrito em 1933 por Natrass como um fitopatógeno. Em 1970 foi descrito o primeiro caso desta espécie de fungo causando infecção de pele e unha (Gentles; Evans, 1970). Desde a primeira descrição deste fungo, a nomenclatura vem sofrendo alterações. Anteriormente foi denominado *Scytalidium lignicola* ou *Fusicoccum dimidiatum*, mais tarde passou a ser nomeado *Hendersonula toruloidea*, considerado sinônimo de *N. mangiferae* e anamorfo de *Scytalidium dimidiatum*. Em uma revisão taxonômica, Crous *et al* (2006) propuseram na família *Botryosphaeriaceae* a espécie *Neoscytalidium dimidiatum*, o qual é filogeneticamente indistinguível do fungo hialino, *Scytalidium hyalinum*, que passou a ser considerado uma variedade da espécie demácea *N. dimidiatum* (Roeijmans *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 2009; Phillips *et al.*, 2013), ou ainda *N. diminiatum* var. *hyalinum*, como será identificado nesse trabalho. Estudos sugerem que a melanina seja o pigmento presente em *N. dimidiatum* (Roeijman *et al.*, 1997; Morris-Jones *et al.*, 2004).

Neoscytalidium sp. apresenta a forma sinanamorfa, isto é, mais de uma forma anamórfica ou estado mitospórico. A forma anamorfa picnidial, *N. mangifera*, caracteriza-se pela presença de picnídios ostiolados contendo numerosos fialoconídios, inicialmente unicelulares, hialinos e posteriormente tornando-se tricelulares e marrons, com a célula central de coloração mais forte. O picnídio é formado em culturas mais velhas, com aproximadamente três semanas de desenvolvimento. A forma anamorfa artroconidial, *N. dimidiatum* apresenta cadeias de escuros artroconídios unicelulares ou bicelulares, medindo aproximadamente 3,5 a 5 µm por 6,5 a 12 µm, produzidos por fragmentação holotática de hifas indiferenciadas. As culturas de *Neoscytalidium* sp. são efusas e de aspecto penugento, com coloração variando de cinza a castanho escuro na frente e creme a ocre no verso em

N. dimidiatum; e branco a creme em *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, frente e verso, respectivamente (Frankel; Rippon, 1989; Sutton; Dyko, 1989).

Os genomas de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* ainda não foram sequenciados. Apenas algumas sequências de genes do genoma dessas variedades foram determinadas: DNA ribossomal (rDNA), β -tubulina (TUB), histona H3 (HH3), proteína de choque térmico constituída de 81 aminoácidos, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GPD), Fator de alongamento de cadeia 1 α (EF1) e da quitina sintase (CHS). A sequência destes genes está depositada no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI.

A determinação da composição molecular do DNA cromossômico para as regiões já sequenciadas mostrou a mesma porcentagem de guanina (G) e citosina (C) (Davison *et al.*, 1980). Experimentos de *Restriction Fragment Length Polimorfism* (RFLP) evidenciaram a similaridade da sequência de rDNA entre *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Foram encontrados diferentes perfis de restrição para os isolados de *N. dimidiatum* estudados e um único perfil para todos *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e dois *N. dimidiatum* (Roijmans *et al.*, 1997). O sequenciamento da subunidade 18S do rRNA identificou um único polimorfismo, com G em isolados de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e adenina (A) ou G em isolados de *N. dimidiatum* (Machouart-Dubach *et al.*, 2002; Machouart *et al.*, 2004). Madrid *et al.* (2009) verificaram sete regiões polimórficas pelo sequenciamento parcial de três *loci* (*Internal Transcribed Spacer* - ITS1 e 2 e os domínios D1/D2 do gene 28S do rRNA, TUB e do gene CHS) de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolados de diferentes regiões geográficas. Pela combinação das regiões polimórficas, cinco tipos de sequências (TSs) foram encontradas. Entre os TSs, dois foram encontrados em plantas, dois em isolados clínicos, e um último em isolados clínicos e em plantas.

1.2. Filogenia molecular e *Multilocus Sequence Typing*

A sistemática é a ciência que estuda os padrões evolucionários da diversidade biológica, incluindo a identificação, a classificação e as relações entre as variedades em um determinado período. Assim, a sistemática inclui a taxonomia e a filogenia, sendo essa última responsável pela relação entre organismos com base em eventos evolucionários. A filogenia considera as relações de parentesco e a história evolutiva das espécies, considerando que as espécies evoluem de um ancestral comum, onde as espécies mais próximas têm mais características em comum do que as distantes. A inferência entre táxons e grupos é feita a partir de caracteres morfológicos, fisiológicos, e/ou moleculares. Foi em 1965 que Zuckerkandl e Pauling tiveram a ideia de usar dados moleculares na inferência filogenética, a partir do princípio que substituições em nucleotídeos ou aminoácidos ocorriam em uma taxa proporcional ao relógio molecular (Soltis *et al.*, 1992).

A filogenia molecular surgiu então pelo crescimento de duas áreas, a análise filogenética e a biologia molecular. A filogenia molecular consiste em uma técnica de grande vantagem na filogenia, visto que cada base do DNA ou aminoácido das proteínas é um caráter analisado separadamente (Arriel *et al.*, 2006).

Quando a análise comparativa entre os organismos é feita utilizando a tecnologia do sequenciamento, um importante ponto a ser considerado é a sequência adotada para a comparação. A reconstrução filogenética baseada em dados moleculares deve ser feita utilizando sequências ortólogas, ou seja, com um único ancestral comum. Somente esse tipo de sequência fornecerá informações importantes para o relógio molecular. Há diversos tipos de análises possíveis após a obtenção dos alinhamentos múltiplos das sequências de um grupo de organismos. Dentre as análises estão as matrizes baseadas em distâncias, que seriam os métodos quantitativos, e os métodos baseados em caracteres, que seriam os métodos qualitativos (Matioli; Fernandes, 2001). O método de *Unweighted Pair-Group Method with*

Arithmetic means (UPGMA - agrupamento pareado não ponderado utilizando media aritmética) consiste na hipótese que nenhuma mutação seja mais provável que outra e a distância evolutiva é calculada pelo menor valor de distância do par (Pinto, 2004).

Multilocus Sequence Type (MLST) é uma técnica de caracterização molecular, filogenética e investigação epidemiológica, amplamente aplicada à microbiologia, proposto por Maiden *et al.* (1998) que se baseia na identificação de mutações pontuais presentes em diferentes alelos de genes conservados (*housekeeping genes*). O conjunto de alelos dos diferentes *loci* estudados no MLST determina o perfil alélico ou TS e ainda permite realizar a inferência filogenética dos organismos em análise (Maiden *et al.*, 1998).

1.3. O fungo causador de dermatomicose

N. dimidiatum é um fungo saprofítico e fitopatógeno encontrado no solo e vegetação de clima tropical e subtropical da América do Sul, Caribe, Ásia e África. Nas regiões consideradas áreas endêmicas, a infecção pelo fungo representa de 35 a 45% das dermatomicoses de pé (Gugnani; Oyeka, 1989; Lacroix; Chauvin, 2008). Além disso, devido ao aumento de viagens internacionais, tem sido encontrado em diversas regiões não endêmicas (Madrid *et al.*, 2009). Há relatos de isolados de diversas espécies de plantas com grande interesse econômico como bananas, ameixas, limão, lima e árvores de toranja (Godoy *et al.*, 2004). O habitat de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* ainda é desconhecido e alguns pesquisadores consideram-no uma variante antropofílica do *N. dimidiatum* (Lacaz, 2002).

Nas últimas décadas, com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), o aumento do uso de terapias imunossupressoras, do diabetes e da expectativa de vida, tem crescido o número de pacientes susceptíveis a muitos tipos de infecções causadas por fungos. Há relatos na literatura de infecções profundas e superficiais causadas pelo gênero *Neoscytalidium* em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes. Várias formas

clínicas são citadas, incluindo abscesso no sistema nervoso central, endoftalmite, sinusite, osteomielite, fungemias, infecções subcutâneas, eumicetoma, linfangite, linfadenite, *tinea pedis*, onicomicoses, entre outras (Elinav *et al.*, 2009; Lacaz *et al.*, 1999).

Curiosamente, *N. dimidiatum* tem sido mais associado a infecções profundas quando comparada a sua variante hialina, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, que está envolvido em infecções de pele e unha, sugerindo que o isolado clínico deficiente na produção de pigmento melanina seja menos virulento que o pigmentado. Apesar disso, não há evidências que os diferem em relação ao padrão de sensibilidade a antifúngicos *in vivo* (Elinav *et al.*, 2009; Madrid *et al.*, 2009; Bueno *et al.*, 2010).

Em relação às dermatomicoses, uma especial atenção deve ser dada à onicomicose, já que *Neoscytalidium* sp. encontra-se dentre os principais agentes filamentosos não dermatófitos causadores desta doença juntamente com outros como *Scopulariopsis* sp., *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Onychocola* sp., merecendo especial atenção nos dedos dos pés de mulheres entre 40 e 60 anos, imunocomprometidas e diabéticas (Cursi *et al.*, 2011, Xavier *et al.*, 2010). As lesões causadas por *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* são, em geral, indistinguíveis das causadas pelos dermatófitos (Gugnani; Oyeka, 1989).

Devido à maior resistência de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* a algumas drogas, quando comparada aos fungos dermatófitos, o diagnóstico diferencial é imprescindível para o sucesso do tratamento (Bueno *et al.*, 2010). De acordo com Xavier *et al.* (2010), a patogenicidade do *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* é proveniente da produção de enzimas extracelulares, principalmente amilases, lipases e proteases, com ênfase na atividade das queratinases, responsáveis pela hidrólise da queratina presente no extrato córneo da pele humana.

1.4. Susceptibilidade de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* à terapia antifúngica

Pouco é descrito na literatura sobre a sensibilidade de diferentes isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* a drogas antifúngicas. Sabe-se que os valores da concentração inibitória mínima (CIM) são maiores para os fungos não dermatófitos, como *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, que para fungos dermatófitos (Bueno *et al.*, 2010). Baixos valores de CIMs são descritos para anfotericina B para ambos, *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, o que justifica a sua grande indicação clínica com a administração intravenosa para infecções principalmente sistêmicas (Lacroix; Chauvin, 2008).

Testes de sensibilidade *in vitro* apontam voriconazol e terbinafina como boas alternativas para o uso clínico devido às baixas CIMs apresentadas por ambas as drogas antifúngicas. Atribuem ainda voriconazol como um antifúngico de segunda linha no tratamento para uso como tratamento alternativo de doenças invasivas e disseminadas em pacientes imunocomprometidos, devido ao seu amplo espectro de atividade. Recentemente, Dunn *et al.* (2003) relataram dois casos de infecção invasiva provocada por *N. dimidiatum* em pacientes imunocomprometidos, a s quais foram submetidos ao tratamento com voriconazol e tiveram a doença estabilizada ou o fungo erradicado. Além disso, uma vez que a administração de voriconazol é por via oral, este apresenta uma vantagem no tratamento das infecções superficiais, diferente de anfotericina B, que é por via endovenosa. *N. dimidiatum* tem se mostrado mais resistente que *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em testes *in vitro* com itraconazol. A atividade antifúngica do posaconazol, caspofungina, terbinafina e anidulanfungina varia com os isolados testados. Micafungina tem mostrado altos valores de CIM para a maioria dos isolados testados (Lacroix; Chauvin, 2008).

1.5. Ação de antifúngicos na célula fúngica

1.5.1. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrocíclico poliênico de atividade antifúngica. Este se liga ao ergosterol na membrana plasmática das células fúngicas, causando um desarranjo e formando poros ou canais que alteram a permeabilidade celular. Os poros ou canais formados permitem o extravasamento do conteúdo intracelular, havendo perda de pequenas moléculas (Goodman e Gilman's, 12^aed., 2011).

1.5.2. Antifúngicos azólicos

Os antifúngicos azólicos inibem a ação da enzima microssômica 14- α -esterol-demetilase, enzima do citocromo P450 (CYP). Consequentemente, a biossíntese de ergosterol é comprometida havendo acúmulo de 14- α -metilesteróis, o que causa um desarranjo na membrana plasmática da célula, impedindo o crescimento do fungo (Goodman e Gilman's, 12^aed., 2011). Os azólicos podem ser divididos em duas subclasses: os imidazóis (cetoconazol, miconazol, tioconazol) e os triazóis (fluconazol, itraconazol, voriconazol).

1.5.3. Equinocandinas

Essa classe de droga antifúngica compreende produtos naturais, sendo metabólitos secundários de fungos formados durante a fermentação. Sua atividade biológica é a inibição do complexo enzimático responsável pela síntese de um polissacarídeo estrutural presente na parede celular fúngica, o 1,3- β -D-glucano. Este mecanismo reduz a integridade estrutural da célula fúngica, conferindo instabilidade osmótica e levando à morte celular. A caspofungina e a anidulafungina são drogas pertencentes a esta classe, aprovadas para uso clínico. Apresentam o mesmo mecanismo de ação, diferindo apenas quanto às propriedades farmacológicas (Goodman & Gilman, 12^a Ed. 2011).

1.5.4. Flucitosina

O fármaco é captado por permeases seletivas para citosina na membrana da célula fúngica, onde é deaminado a 5-fluorouracil. Uma vez na célula, é convertido a 5- fluorouracil-ribose monofosfato e em seguida convertido a 5-fluorouridina trifosfato e incorporado no ácido ribonucleico (RNA) ou convertido a 5-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato, um potente inibidor da enzima timidilato sintetase. Por consequência, a síntese de DNA é prejudicada (Goodman & Gilman 12^a ed., 2011).

1.5.5. Terbinafina

A terbinafina é uma alilamina sintética, uma classe de antifúngicos com amplo espectro fungicida. Assim como os azólicos, a terbinafina acomete o ergosterol presente na membrana celular do fungo, inibindo a esqualeno epoxidase, enzima chave na biossíntese do ergosterol fúngico, com a consequente morte da célula fúngica.

1.6. O tratamento fotodinâmico

O estudo da fotobiologia de fungos tem adquirido importância crescente nos últimos anos, tanto por fornecer contribuições relevantes para o entendimento do efeito das radiações visível e UV nas células eucarióticas (Braga *et al.*, 2001; 2006; Schiave *et al.*, 2008), como pelo surgimento de novas áreas com aplicações importantes, como é o caso do tratamento fotodinâmico antimicrobiano (TFDA), que utiliza fotossensibilizadores exógenos para o controle de microrganismos (Maisch *et al.*, 2004; Tegos *et al.*, 2005; Jori, 2006). Os fotossensibilizadores são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, inativos em seu estado fundamental, que absorvem luz na região do visível (Jori, 2006). Quando o fotossensibilizador é exposto à radiação com comprimentos de onda apropriados, sua molécula é excitada, levando a uma série de transferências moleculares de energia que

normalmente originam espécies reativas de oxigênio (EROs), como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), o ânion superóxido e o radical hidroxila, que são extremamente reativos e citotóxicos (Soukos *et al.*, 1998; Friedberg *et al.*, 2001; Hambling *et al.*, 2002; Smijs *et al.*, 2004). Os fotossensibilizadores baseados na fenotiazina (*phenothiazinum based photosensitisers* - PhBPs), como o azul de metileno, possuem estrutura heteroaromática planas que conferem às suas moléculas propriedades fotossensibilizadoras. Os PhBPs têm mostrado potencial para serem utilizados no tratamento fotodinâmico (TFD) como agentes antitumorais e no TFDA como antimicrobianos (Harris *et al.*, 2006). A ação fotossensibilizadora de PhBPs, como o MB, em bactérias gram-negativas, gram-positivas, leveduras e vírus é conhecida há décadas (Macmillan *et al.*, 1966; Ito, 1977; Al-Rubeai e El-Hassi, 1986; Wainwright, 1996). Em leveduras e em conídios, não foi observada a internalização significativa de PhBPs, como azul de metileno (MB) ou azul de toluidina O (TBO), e a morte celular é atribuída aos danos na membrana, provocados pelo oxigênio singlete produzido no meio extracelular (Shimizu *et al.*, 1979, Al-Rubeai e El-Hassi, 1986). A figura 1 mostra a representação do principais mecanismos efetores, porém não exclusivos, em diferentes tipos celulares (Sharma *et al.*, 2012).

Figura 1: Esquema representativo do TFD. ^1PS : Fotossensibilizador no estado fundamental; $^1\text{PS}^*$: Fotossensibilizador no estado excitado singlete; $^3\text{PS}^*$: Fotossensibilizador no estado excitado tripleto (Sharma *et al.*, 2012).

Uma grande variedade de fontes de luz, como lasers, *light-emitting diode* (LEDs) e vários tipos de lâmpadas incandescentes tem sido utilizada para a fotoativação dos PhBPs, tanto no TFD, como no TFDA (Harris *et al.*, 2006). O MB, como outros PhBPs, apresenta absorção máxima de luz na região do vermelho (pico de absorção em 665 nm), que é o intervalo desejável para a terapêutica. Essa região espectral é ideal para o TFD e para o TFDA, pois as biomoléculas apresentam absorção mínima nessa região espectral, permitindo uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos durante o TFD. A química do MB está bem estabelecida e diversos estudos têm mostrado que as modificações químicas do corante produzem derivados que mantêm as características desejáveis de absorção de luz do composto original, mas que apresentam uma maior fototoxicidade para as células-alvo (Harris *et al.*, 2006). A técnica tem sido empregada no tratamento de uma ampla variedade de doenças nos últimos 15 anos (Dos Santos; Eriksson, 2006).

O uso de fotossensibilizadores para a eliminação de microrganismos antecede a quimioterapia antimicrobiana baseada na utilização de antibióticos. A primeira demonstração da fotoinativação de células microbianas foi descrita em 1900 por Oscar Raab, que observou que corantes, como a acridina e a eosina, inativavam rapidamente *Paramecium caudatum* na presença de luz (Dougherty *et al.*, 1998; Hockberger, 2002; Maisch *et al.*, 2004).

A inativação fotodinâmica de microrganismos baseia-se no princípio de que, se um microrganismo demonstra seletividade por um determinado corante, que também é fotossensibilizador, deve ser possível destruí-lo expondo-o à luz após a aplicação do corante (Wainwright, 2000). Como o TFD, a fotoinativação de microrganismos também utiliza fotossensibilizadores e luz visível para promover uma resposta fototóxica, normalmente oxidativa, que é capaz de danificar virtualmente todos os tipos de biomoléculas e estruturas celulares, provocando a morte do microrganismo (Wainwright, 1996; 1998).

OBJETIVOS

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez".

(George Bernard Shaw)

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar as variedades fúngicas filamentosas causadoras de micoses em humanos, *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, isoladas de lesões de pacientes da região de Ribeirão Preto – São Paulo, Brasil, quanto ao perfil genotípico e de susceptibilidade a antifúngicos e tratamento fotodinâmico antimicrobiano com fotossensibilizadores fenotiazínicos.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar, por métodos moleculares, 39 isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* de amostras clínicas do setor de microbiologia do Serviço de Análises Clínicas (SAC) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) – Universidade de São Paulo (USP), no período de 2007 a 2014;
- Analisar o perfil genotípico por *Multilocus Sequence Typing* – MLST (regiões ITS1 e 2 do rDNA, e dos genes para CHS, TUB, HH3, GPD e EF1 dos 39 isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*;
- Analisar *in vitro* o perfil de desenvolvimento frente a variações de pH e temperatura dos 39 isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*;
- Analisar *in vitro* o perfil de susceptibilidade frente a antifúngicos representantes da classe dos poliênicos, azólicos e equinocandinas dos 39 isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*;
- Analisar *in vitro* o perfil de susceptibilidade ao TFDA de artroconídios não germinados e germinados dos isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* que apresentaram diferentes perfis de susceptibilidade aos antifúngicos;

Objetivos

- Determinar possíveis efeitos nas biomoléculas causados pelo TFDA (permeabilidade de membrana e peroxidação lipídica).

MATERIAIS E MÉTODOS

"A persistência é o menor caminho do êxito".

(Charles Chaplin)

3. Materiais e Métodos

3.1. Meios de Cultura

I- ÁGAR BATATA DEXTROSE (PDA E PDAY) (Acumedia, Brasil)

Infusão de Batata 20% (p/v)

Glicose 2% (p/v)

Ágar 1,5% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar. Para PDAY acrescentar 5 g/L de extrato de levedura.

II- ÁGAR SABOURAUD DEXTROSE (ASD) (Acumedia, Brasil)

Peptona 1% (p/v)

Glicose 4% (p/v)

Ágar 1,5% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

III- CALDO BATATA DEXTROSE (PDB) (BD Difco, Brasil)

Infusão de Batata 20% (p/v)

Glicose 4% (p/v)

Completar o volume com água destilada e autoclavar.

IV- MEIO DE CULTURA MÍNIMO

Solução de Sais 1X

Elementos traços 0,1% (v/v)

Glicose (Sigma Aldrich, EUA) 1% (p/v)

Ágar (BD Difco, Brasil) 2% (p/v)

Ajustar para o pH 6,5, completar o volume com água destilada e autoclavar.

V- MEIO DE CULTURA RPMI 1640

RPMI 1640 (Sigma Aldrich, EUA) 1,04% (p/v)

(com glutamina e vermelho de fenol e sem bicarbonato)

MOPS (Sigma Aldrich, EUA) 0,165 M

Dissolver o pó em 90% do volume final de água. Acrescentar o MOPS. Ajustar para o pH 7. Completar o volume com água e esterilizar por filtração.

3.2. Soluções

3.2.1. Soluções de uso geral

I- SOLUÇÃO DE ELEMENTOS TRAÇOS 1000X

ZnSO₄.7H₂O 75 mM

H₃BO₃ 180 mM

MnCl₂.4H₂O 25 mM

FeSO₄.7H₂O 18 mM

CoCl₂.5H₂O 6 mM

Cu(SO₄).5H₂O 6 mM

(NH₄)₆MO₇O₂₄.4.H₂O 1 mM

EDTA 140 mM

Adicionar os sólidos na ordem listada em 1/8 do volume final de água destilada.

Dissolver cada um completamente antes de adicionar o próximo. Aquecer a solução até 100°C. Resfriar para 60°C e ajustar o pH entre 6,5 e 6,8 com NaOH. Resfriar até atingir a temperatura ambiente e completar para o volume final.

II- SOLUÇÃO DE SAIS 20X

NaNO ₃	3,2 M
KCl	0,14 M
KH ₂ PO ₄	0,2 M
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,04 M

Dissolver em água destilada e completar o volume.

III- TAMPÃO SALINA-FOSFATO 10X (PBS)

NaCl	350 mM
KCl	180 mM
Na ₂ HPO ₄	25 mM
KH ₂ PO ₄	18 mM

Dissolver em água destilada, acertar o pH 7,4 e completar para o volume final.

IV- Solução de TBA (Ácido Tiobarbitúrico)

Ácido Tiobarbitúrico (Sigma Aldrich, EUA)	1% (p/v)
Ácido acético glacial	30% (v/v)

Misturar os itens e dissolvê-los em água. Para facilitar a dissolução, a mistura pode ser colocada em aparelho de ultrassom.

3.2.2. Soluções para ensaio com DNA**I- SOLUÇÕES TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE DNA**

Tris-HCl pH 8,5	200 mM
NaCl (JT Baker, EUA)	250 mM
EDTA (Sigma Aldrich, EUA)	25 mM

SDS (Promega, EUA)	0,5% (p/v)
--------------------	------------

Dissolver em água destilada.

II- TAE 50X PH 8

Tris Base	242 g
-----------	-------

CH ₃ COOH (ácido acético glacial) (JT Baker, EUA)	57,1 mL
--	---------

EDTA 0,5M pH 8,0	100 mL
------------------	--------

Água destilada q.s.p.	1 L
-----------------------	-----

Dissolver em água, acertar para o pH 8.0 e acertar o volume final.

III- TAMPÃO DE AMOSTRA PARA ELETROFORESE DE DNA

Azul de bromofenol (Sigma Aldrich, EUA)	0,25% (p/v)
---	-------------

Xileno cianol FF (Sigma Aldrich, EUA)	0,25% (p/v)
---------------------------------------	-------------

Glicerol (Promega, EUA)	30% (v/v)
-------------------------	-----------

Dissolver em água destilada e acertar o volume final.

3.3. Verificação da viabilidade e da pureza dos isolados clínicos cedidos pelo Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Foram analisados neste projeto isolados clínicos de *Neoscytalidium* spp. gentilmente cedidas pelo SAC da FCFRP - USP. Estes isolados foram obtidos a partir de amostras clínicas de unha ou pele (tabela 2) de 29 pacientes. Entre os isolados existem 33 amostras de *N. dimidiatum* e 6 amostras de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* que foram previamente isolados e identificados pela metodologia clássica.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP/USP conforme a 118ª reunião extraordinária realizada em 24.06.2013 segundo o ofício CEP/FCFRP nº034/2013.

3.3.1. Identificação clássica dos isolados clínicos de fungos filamentosos

A identificação clássica de fungos filamentosos foi realizada pela análise microscópica do material biológico proveniente de unha ou escama de pele após tratamento com hidróxido de potássio 20% (KOH) acrescido de Tinta Parker. Em seguida foi realizada a análise macro e micromorfológica do fungo isolado em meio de cultura ASD. A análise micromorfológica foi feita através da técnica de microcultivo em meio de cultura PDA e a análise macromorfológica através da observação do aspecto, cor (frente/verso), bordas e superfície da colônia gigante crescida em meio de cultura ASD.

3.3.2. Identificação molecular dos isolados clínicos de fungos filamentosos

A identificação molecular de cada isolado clínico foi baseada na amplificação por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) de parte do gene TUB do microrganismo, seguidas pelo sequenciamento de ácidos nucleicos pelo método de Sanger, no aparelho ABI3100 Fluorescence Futomated Fequencer (Applied Biosystems). A sequência de DNA gerada em cada reação de sequenciamento foi comparada com sequências depositadas no banco de dados no NCBI utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Os fungos recebidos do SAC da FCFRP, que tiveram sua identificação comprovada pela técnica molecular, foram imediatamente semeados em meio de cultura PDAY para a produção de colônias gigantes pela incubação em estufa nas temperaturas de 28°C por 4 dias. Para a preservação dos isolados clínicos por longos períodos, foram realizados estoques de

hifas e artroconídios de cada isolado clínico. Cada estoque foi realizado mediante o recorte com bisturi estéril de blocos de 0,25 cm² da colônia gigante oriunda do crescimento em meio de cultura PDAY e adição de 1 mL de 40% glicerol estéril, em tubos criogênicos, seguido do armazenamento em ultra freezer (-80 °C) de acordo com Sambrook e Russel (2001).

3.4. Análise de polimorfismo por *Multilocus Sequence Typing* dos isolados clínicos das variedades de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*

3.4.1. Extração de DNA genômico de fungo filamentoso

Aproximadamente 5×10^7 artroconídios de cada isolado clínico foram inoculados em 50 mL de meio de cultura PDB e incubados a 28°C por 48 h a 150 rpm para a produção de micélio. Este micélio foi coletado por filtração, congelado em nitrogênio líquido e triturado com o auxílio de cadinho e pistilo. Para cada 40 mg de micélio triturado foi acrescentado 480 uL de tampão de extração de DNA. Em cada amostra foi acrescentado um volume igual de fenol-clorofórmio (1:1) e a mistura foi agitada vigorosamente por 10 min para precipitar as proteínas e quebrar as membranas e paredes das células. Para sedimentar as proteínas precipitadas, as amostras foram centrifugadas a 16000 g por 15 min (Eppendorf, Alemanha). A fase aquosa (sobrenadante) foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL (Axygen Scientific, EUA) e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio para a retirada de resíduos de fenol ou clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas a 16000 g por 5 min, e a fase aquosa superior foi transferida novamente para outro microtubo onde foi acrescentado 0,54 volumes de isopropanol (JT Barker, EUA) para precipitar o DNA. A amostra foi centrifugada a 16000 g por 1 min e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com etanol 70% e centrifugado novamente a 16000 g por 1 min. O sobrenadante foi descartado e o resíduo de etanol evaporado na temperatura ambiente por 30 min. O sedimento

foi suspenso em água estéril e estocado a 4°C. O RNA foi eliminado de cada amostra pelo tratamento com RNase a 300 ng mL⁻¹ por 1 h. O DNA genômico foi quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm (Implen, Alemanha) e sua qualidade foi observada em eletroforese de gel de agarose a 1%. A concentração de cada amostra de DNA foi ajustada para 500 ng/μL.

3.4.2. Amplificação por PCR das regiões ITS do rDNA e dos genes quitina sintase, β-tubulina, histona H3, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e fator de alongamento de cadeia 1α

A amplificação por PCR das regiões ITS 1 e 2 do rDNA e dos genes CHS, TUB, HH3, GPD e EF1 foi realizada utilizando-se 0,5 μM de cada *primer* (*foward* e *reverse* - tabela 01), 0,2 mM de dNTP, 1X de tampão apropriado para a polimerase (buffer GC), 100 ng de DNA genômico e 1 U de enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (Thermo Scientific) em volume final de 20 μL de reação. Os *primers* utilizados, assim como as temperaturas de anelamento e o tamanho dos fragmentos gerados estão descritos na tabela 1. Em seguida, o produto de cada PCR foi fracionado por eletroforese em gel de agarose 1% e cada banda contendo o produto da PCR foi excisada do gel, com o auxílio de um bisturi estéril, e purificada com o *kit* de purificação de DNA de gel de agarose, *Gel Band* (Promega, EUA), de acordo com as normas do fabricante. Em seguida, cada amostra foi quantificada por espectrofotometria e a integridade observada em eletroforese de gel de agarose 1% para posterior sequenciamento.

Amostras controle *American Type Collection Culture* (ATCC) de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* foram inseridos neste estudo, ATCC®22190™ e ATCC®38907™, respectivamente.

Tabela 01: Primers utilizados neste trabalho

Nome do gene/região	Primer	Sequência (5' → 3')	Temperatura Anelamento (°C)	Amplicon (pb)
Espaçador Transcrito Interno 1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	59	256
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
Espaçador Transcrito Interno 2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	56	332
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Quitina Sintase	CHS_f	GTGTGCGTTGTCAGCGAC	54	276
	CHS_r	TCCTTCAAACAGAAAAGCATC		
β -Tubulina	bTUB_f	CAGCTGAACTCTGAC CTGC	56	400
	bTUB_r	AGCAGTGAACGGTCACC		
Histona H3	HH3_f	CGCTGCGTCGCTGTTGC	59	503
	HH3_r	CTACAATACCGTTAGTAATGC		
Gliceraldeide-3-fosfato desidrogenase	GPD_f	AGCTGACCCACGCCACCA	61	618
	GPD_r	ACCGTCGACGGTCTTCTG		
Fator de Alongamento de cadeia 1 α	EF1_f	TCGACAAGCGTACCATCGAG	57	339
	EF1_r	AGCCTTGAGCTTGTC AAGGA		

3.4.3. Sequenciamento e análise de polimorfismo

A reação de sequenciamento do DNA dos isolados clínicos e linhagens ATCC foi realizada a partir da amplificação por PCR das regiões de interesse utilizando os *primers* descritos na tabela 01. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (USP - Campus SP) com o aparelho ABI3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). Cada sequência gerada foi analisada no programa ChromasPro e a análise de polimorfismo foi realizada utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* - MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013), pelo método de alinhamentos múltiplos. Para análise comparativa, foram incluídas sequências de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* obtidas do *GenBank* (Benson *et al.*, 2013) de linhagens *Centraal Bureau voor Schimmelcultures* CBS661.77, CBS499.66, CBS280.66, CBS251.49 e CBS204.33.

Para obtenção do dendrograma de similaridade genética entre as 41 sequências (isolados clínicos e linhagens ATCC), foram utilizadas as sequências concatenadas das sete regiões amplificadas (ITS1, ITS2, EF1, TUB, HH3, CHS e GPD) pelo método de UPGMA. Todas as posições contendo deleções ou dados perdidos foram eliminados. As análises foram realizadas pelo programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013).

3.5. Análise do crescimento dos isolados clínicos frente a variações de pH e temperatura

A partir de uma suspensão de artroconídios de cada isolado clínico foi realizada a semeadura com auxílio de uma alça de Drigalski, por toda a superfície do meio de cultura PDAY em placas de Petri de 90 x 15 mm e incubado por 4 dias a 28°C. A partir deste procedimento, novas suspensões de artroconídios foram obtidas e filtradas com lã de vidro estéril para a obtenção de uma suspensão pura de artroconídios. Cada suspensão foi ajustada na concentração de 5×10^6 UFC por mililitro com o auxílio de câmara de Neubauer. Após, 5 uL de cada suspensão foram pipetados no centro de uma placa de petri de 150 x 15 mm contendo 50 mL de PDAY e em seguida as placas foram incubadas a 28 e 37 °C. O diâmetro de cada colônia foi medido a cada 12 h, por até 72h. O experimento foi realizado em duplicata.

A mesma suspensão de artroconídio foi utilizada para análise de variação de pH. Para isso 5 uL de cada suspensão foram pipetados no centro de uma placa de petri de 90 x 15 mm contendo 20 mL de meio de cultura MM tamponado, sendo que os pHs 5,5 e 6,5 foram tamponados com 50 mM de MES (ácido 2-N-morfolinoetanossulfônico) (Sigma Aldrich, EUA) e 7,5 e 8,5 tamponados com 50 mM de Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico) (Sigma Aldrich, EUA), em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C. O diâmetro de cada colônia foi medido a cada 12 h, por até 72h. O experimento foi realizado em duplicata.

3.6. Análise do perfil de susceptibilidade dos isolados clínicos a antifúngicos segundo o protocolo M38A e M38A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*

3.6.1. Preparação dos antifúngicos

Os antifúngicos utilizados foram diluídos no solvente apropriado (Dimetil sulfóxido - DMSO ou água) na concentração 100X a máxima aplicada no teste. Foram feitas diluições

para 2X a concentração do teste em meio de cultura RPMI 1640 pH 7,0 (com glutamina, sem bicarbonato e com vermelho de fenol como indicador de pH) acrescido de 0,2% de glicose e tamponado com 0,165 M de ácido 3-(N-morfolino) propano sulfônico (MOPS), 2X a concentração final. Os testes de sensibilidade foram feitos conforme as normas e diretrizes estabelecidas no protocolo M38A e M38A2, pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) (Wayne *et al.*, 2008), que permitiram a análise das CIMs.

Os antifúngicos testados foram os pertencentes às classes: (i) poliênicos (anfotericina B (Sigma Aldrich, EUA)); (ii) azólicos (fluconazol, voriconazol e cetoconazol (Sigma Aldrich, EUA)); (iii) análogos de nucleosídeos (5-flucitosina (Sigma Aldrich, EUA)), (iv) equinocandina (caspofungina (MSD, EUA)).

Foram distribuídos 100 μ L de cada antifúngico 2X concentrado, em placas de microdiluição de 96 poços (TPP, Suíça), onde as colunas 1 e 12 foram respectivamente controles positivo (crescimento do fungo), e negativo (esterilidade do meio de cultura); e as colunas 2 a 11 foram as diluições seriadas (1:2) do agente antifúngico.

As concentrações utilizadas de cada antifúngico testado foram determinadas a partir de estudos prévios com modelos não-dermatófitos segundo o CLSI e adequados para as variedades em questão. As concentrações finais testadas foram: anfotericina B de 0,03 a 16 μ g mL⁻¹; fluconazol de 0,125 a 128 μ g mL⁻¹; voriconazol de 0,03 a 16 μ g mL⁻¹; cetoconazol de 0,03 a 128 μ g mL⁻¹; 5-flucitosina de 0,125 a 64 μ g mL⁻¹; caspofungina de 0,015 a 16 μ g mL⁻¹; terbinafina de 0,004 a 2 μ g mL⁻¹. A diluição dos agentes antifúngicos anfotericina B, voriconazol, cetoconazol, anidulafungina e terbinafina foi preparada utilizando-se DMSO como solvente enquanto que para os agentes fluconazol, 5-flucitosina e caspofungina, o solvente utilizado para diluição foi água.

3.6.2. Preparo do inóculo

Para os experimentos de sensibilidade a antifúngicos, os artroconídios foram produzidos pela distribuição de artroconídios na superfície do meio de cultura PDAY com o auxílio de uma alça de Drigalski estéril e incubados por 4 dias a 28°C. Após esse período, foi feita uma suspensão dos artroconídios em água estéril e a concentração ajustada para $5,0 \times 10^4$ artroconídios mL⁻¹. O volume de 100 µL da suspensão de artroconídios foi adicionado em cada poço da placa de microdiluição com exceção da coluna 12 da placa de microdiluição, já que esse foi utilizado como controle de esterilidade do meio de cultura RPMI 1640.

Como linhagem controle de cada experimento foi utilizado o fungo filamentoso *Aspergillus flavus* ATCC®204304™ para os antifúngicos anfotericina B, voriconazol, anidulafungina e terbinafina. Já para as drogas fluconazol, cetoconazol, 5-flucitosina e caspofungina, a linhagem *Candida krusei* ATCC®6258™ foi utilizada como controle. As placas de microdiluição foram incubadas a 37°C e as leituras foram feitas nos tempos de 24 e 48 h de desenvolvimento do fungo.

3.6.3. Determinação da concentração inibitória mínima

A leitura das CIM de cada droga seguiu as normas descritas para fungos filamentosos no protocolo M38A e M38A2 - CLSI (Wayne *et al.*, 2008). De acordo com o documento, CIM é definido como a menor concentração de um agente antimicrobiano que causa redução visível do crescimento do microrganismo, sendo CIM50 a mínima concentração que permite redução de pelo menos 50% do fungo quando comparado ao poço controle e CIM90 a mínima concentração que permite redução de pelo menos 90% do fungo quando comparado ao poço controle. Os resultados foram considerados válidos apenas quando as amostras controle apresentaram os valores de CIM de acordo com o que é padronizado pelo protocolo M38A e M38A2 - CLSI (Wayne *et al.*, 2008).

Os resultados foram expressos relatando a faixa/intervalo da CIM para cada antifúngico testado e sua respectiva média. Além disso, os resultados foram apresentados calculando-se a média geométrica (MG) dos resultados obtidos nos dois experimentos independentes realizados. A média geométrica calculada é a média que indica a tendência central dos valores “n” de CIMs encontrados utilizando a extração da raiz “n” desses números, sendo sua forma matemática expressa pela equação: “ $M_{\text{geométrica}} = \sqrt[n]{n_1 \times n_2 \times n_3}$ ”, onde “n” representa os valores de CIM encontrados.

3.7. Análise da resposta dos isolados clínicos frente ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano

3.7.1. Avaliação do tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela concentração inibitória mínima

Os experimentos de TFDA foram realizados com isolados clínicos com diferente pigmentação e genótipos de acordo com o resultado da observação visual da pigmentação e genotipagem dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Em microplacas de 96 poços (TPP, Suíça), foram pipetados 50 µL da suspensão de artroconídios e 50 µL dos fotossensibilizadores (FSs) fenotiazínicos em diferentes concentrações. A figura 2 representa as estruturas moleculares dos FSs utilizados nesse estudo. A concentração final de artroconídios foi de 4×10^4 células mL⁻¹. As concentrações finais dos FSs, diluídos em tampão PBS nas misturas foram 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 50; 75; 100 e 200 µM para o azul de metileno (MB - Sigma Aldrich, EUA), novo azul de metileno N (NMBN - Sigma Aldrich, EUA) e azul de toluidina O (TBO - Sigma Aldrich, EUA) e 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 12,5; 25; 30; 40 e 50 µM para o S137 (derivado sintético não comercial de fenotiazínico gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Mark Wainwright, da Liverpool John Moores University, UK), respectivamente.

As microplacas foram mantidas no escuro por 30 min (período de pré-incubação) e, a seguir, expostas à luz no aparelho com arranjos de 96 LEDs, no comprimento de onda de 631 nm. Na figura 3 constam os espectros de absorbâncias dos compostos utilizados no estudo. As doses de luz foram obtidas alterando o tempo de exposição do arranjo de LED a fim de obter as dose finais de 5, 10 e 20 J cm⁻² (figura 4). Após as exposições, 100 µL de meio RPMI 1640, com o dobro da concentração original, foram acrescentados aos poços. As microplacas foram incubadas a 37°C no escuro e o crescimento foi avaliado após 48, 72 e 96 h de incubação. Foi considerada a CIM a concentração de FS que foi capaz de inibir completamente o crescimento do fungo. O experimento foi realizado em duplicata. Foram feitos três experimentos independentes e o resultado foi expresso em intervalo de CIM obtido.

Figura 3: Espectro de absorção no visível dos FSs fenotiazínicos MB, TBO, NMBN e S137. Os espectros foram obtidos na concentração 10 μM (Rodrigues *et al.*, 2012). MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; TBO azul de toluidina O; S137, derivado do azul de metileno não comercial; nm, nanômetros.

Figura 4: Fluxograma demonstrativo do experimento de fotossensibilização. Diluição do FS (A), suspensão do inóculo (B), adição de ambos à microplaca de 96 poços (C), exposição à luz nas doses de 5, 10 e 20 J cm^{-2} no aparelho com arranjos de 96 LEDs (*Laser-emitting diodes*) com pico de emissão de 631 nm (D).

3.7.2. Avaliação do tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela fração de sobrevivência em artroconídios não germinados e germinados

Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 100 μ L de suspensão de artroconídios a $2,0 \times 10^7$ células por mililitro previamente filtrados em lã de vidro estéril e 100 μ L dos FSs. As concentrações dos FSs testadas foram previamente estabelecidas baseadas nos resultados do ensaio de determinação da CIM. As concentrações finais dos FSs no teste foram de: 200 μ M para MB, NMBN e TBO e 25 μ M para S137 para os isolados de *N. dimidiatum* e ainda, 25 μ M para MB e NMBN e 10 μ M para TBO e S137 para os isolados de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Em seguida, 100 μ L de cada suspensão foram colocados em placas de 96 poços (TPP, Suíça), dois poços para cada fungo. As placas foram expostas à luz emitida pelo LED600 (doses de 5, 10 e 20 J cm^{-2}). Após as exposições, as suspensões foram agitadas e diluídas (10^{-1} a 10^{-4}) e 50 μ L de cada diluição foram espalhadas na superfície de 5 mL de agar batata (PDA), suplementado com 0,12 g L^{-1} de ácido deoxicólico (Fluka, Itália), em placas de Petri (60 $\times$ 15 mm). O ácido deoxicólico, utilizado nessa concentração, reduziu o crescimento das colônias, tornando-as mais compactas, o que permite acompanhar o desenvolvimento dos fungos por um período maior de tempo. Foram preparadas duas placas-réplicas por tratamento e três experimentos independentes. As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e a contagem das colônias iniciou-se após 24 h, com auxílio de estereomicroscópio (com ampliação de 8 $\times$) Modelo SZX7, Olympus, e estendidas até 4 dias. Controles nos quais as células foram expostas apenas à luz, na ausência do FS, e controles nos quais as células foram tratadas com o FS, mas não foram expostas à luz, foram preparados em paralelo para todos os tratamentos. O efeito das diferentes concentrações dos FSs foi estimado pela determinação da fração de sobrevivência, cujo cálculo consistiu na divisão do número de colônias de um dado tratamento, denominado (n), pelo número de colônias do controle não tratado com FS e nem exposto à luz (n_0). Foram

construídos gráficos considerando os valores obtidos, onde o eixo X consistiu todos os tratamentos e o eixo Y, a fração de sobrevivência em escala logarítmica. Para análise estatística foram considerados os logaritmos dos valores normalizados de unidades formadoras de colônia (UFC) para cada tratamento. Os artroconídios que não originaram colônias após 4 dias foram considerados mortos pelo tratamento.

O mesmo procedimento descrito foi realizado após a incubação dos artroconídios na concentração de 10^7 células por mililitro em 5 mL de meio RPMI 1640, sob agitação de 150 rpm por 4 h (artroconídios germinados). Após, as suspensões, contendo artroconídios germinados, foram centrifugadas a 3000 g por 7 min e suspensas em 2,5 mL de PBS a fim da concentração final ser $2,0 \times 10^7$ células por mililitro, para a realização do experimento.

3.7.3. Análise de permeabilidade de membrana em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano

Em microtubos de 1,5 mL, foram adicionados 100 μ L de suspensão de artroconídios a $2,0 \times 10^7$ células por mililitro, previamente filtrados com lã de vidro estéril, e 100 μ L dos FSs. As concentrações dos FSs testadas foram as mesmas que as usadas para os testes de TFDA pela fração de sobrevivência. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Em seguida, 100 μ L de cada suspensão foram colocadas em placas de 96 poços (TPP, Suíça), sendo dois poços para cada fungo. As placas foram expostas à luz emitida pelo LED600 (doses de 5, 10 e 20 J cm⁻²). Após as exposições, as suspensões foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL. As suspensões foram centrifugadas a 7000 g por 5 min, o sobrenadante foi removido e o sedimento de artroconídios foi suspenso em igual volume de PBS. Após, foi adicionado 1 μ L de solução de iodeto de propídio (PI) a 1 g L⁻¹ e a mistura foi analisada por citometria de fluxo (FACSCanto – Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Foram analisados 10000 eventos por aquisição. O resultado foi visualizado no programa

FACSDiva (BD, San Jose, CA, USA). Foi calculada a fração de células marcadas com PI no total de eventos adquiridos para cada tratamento analisado. Artroconídios não expostos ao FS e/ou à luz foram utilizados como controle de viabilidade, e artroconídios expostos a 15 min em etanol 70% foram utilizados como controle de morte. Foram realizados três experimentos independentes.

3.7.4. Avaliação da peroxidação lipídica em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano pela análise da produção de malondialdeído

Lipídios poliinsaturados são facilmente oxidados no TFDA por EROs. O processo de reações envolvido leva a formação de uma série de produtos, cujo principal descrito é o malondialdeído (MDA). Assim, foi feita a avaliação da produção de MDA após ao TFDA pelo *kit Lipid Peroxidation (MDA) Assay* (Sigma-Aldrich, EUA), conforme orientação do fabricante e algumas adaptações. Brevemente, em microtubos de 1,5 mL foram adicionados 500 µL de suspensão de artroconídios a $2,0 \times 10^7$ células por mililitro, previamente filtrados com lã de vidro estéril, e 500 µL dos FSs. As concentrações dos FSs testadas foram as mesmas que as usadas para os testes de TFDA pela fração de sobrevivência. Os microtubos foram mantidos no escuro por 30 min (pré-incubação). Em seguida, 1 mL de cada suspensão foram colocadas em placas de 48 poços (poliestireno, TPP, Suíça), dois poços para cada fungo. As placas foram expostas à luz emitida pelo LED600 (doses de 10 e 20 J cm⁻²). Após as exposições, as suspensões foram colocadas em novos microtubos de 1,5 mL.

As suspensões foram centrifugadas a 7000 g por 5 min, o sobrenadante foi removido e o sedimento de artroconídios formados foi suspenso em 150 µL de *MDA Lysis Buffer* contendo 1,5 µL de BHT. As amostras foram centrifugadas a 13000 g por 10 min para retirada de material particulado. Após, 100 µL foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e foram adicionados 300 µL de solução de TBA. A mistura foi incubada em banho-maria a 95°C por 1 h, seguida pela incubação em banho de gelo por 10 min. Em seguida, 200

µL da solução foram depositadas em cada poço da placa de acrílico de 96 poços (TPP, Suíça) e foi medida a absorbância do composto formado no comprimento de onda de 532 nm com o aparelho espectrofotômetro Spectramax[®] Paradigm[®] Multi-Mode Detection Platform (Molecular Device LLC, USA). A concentração de MDA foi calculada baseada em uma curva padrão confeccionada a partir da orientação do fabricante.

3.8. Análise estatística

Análise estatística foi baseada no método *one-way analysis of variance* (*one-way ANOVA*), seguido pelo pós-teste de Tukey para análise comparativa de todos os tratamentos. Para os experimentos onde foram utilizados todos os isolados clínicos, foi realizada a análise considerando o agrupamento de acordo com os TSs, resultado da análise de sequenciamento pelo MLST.

Valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados significativos e o resultado foi considerado estatisticamente diferente. Todas as Análises foram feitas utilizando o programa Graphpad Prism (v 5.0; Graph pad Software, La Jolla, CA, USA).

RESULTADOS

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

4. Resultados

4.1. Isolados Clínicos

A identificação dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* oriundos de infecções de pele e unha foi realizada pelo método clássico no SAC da FCFRP-USP (tabela 2). A figura 5 e 6 ilustram as características macro e micromorfológicas das variedades estudadas.

Foram analisados os isolados clínicos de lesão de pele ou unha de 29 pacientes, 12 homens e 17 mulheres, sendo que para quatro pacientes houve a coleta de mais de um sítio etiológico de lesão e em mais de um período de coleta, totalizando 39 isolados. Entre eles, 43,6% foram isolados de pés e 56,4% de escamas de unha do pé. De cada isolado clínico foram observadas as características macro e micromorfológicas, inclusive a produção ou não de pigmento melanina por análise visual. Como resultado, foram identificados no SAC da FCFRP-USP 33 isolados clínicos como sendo da variedade *N. dimidiatum* e 6 da variedade *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (tabela 2). Também foi observada variação de pigmentação entre os isolados de *N. dimidiatum* (figura 6). Com o intuito de confirmar molecularmente o isolamento dos fungos *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, foi realizado o sequenciamento de parte do gene que codifica a cadeia β -tubulina de cada isolado clínico. Como resultado foi observado 100% de identidade da sequência de DNA para *N. dimidiatum* ou *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (APÊNDICE I).

Figura 5: Características macro e micromorfológicas de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Morfologia macroscópica (A e C) e microscópica (B e D) de *N. dimidiatum* (A e B) e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (C e D), objetiva de 40X em microscópio Olympus CH3. Barra de escala de 20 µm. As placas foram incubadas a 28°C por 4 dias em meio PDAY.

Figura 6: Aspecto macromorfológico de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (A e B) e *N. dimidiatum*. Em A e B, colônia de LMC 313.01 (creme), *N. dimidiatum* var. *hyalinum* frente e verso, respectivamente. Em C e D, colônia de LMC 302.01 (marrom), *N. dimidiatum* frente e verso, respectivamente. Em E e F, colônia de LMC 303.01 (cinza), *N. dimidiatum* frente e verso, respectivamente. As placas foram incubadas a 28°C por 6 dias em meio PDAY.

Tabela 2: Aspectos epidemiológicos dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolados de infecção de pele e unha no Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP no período de 2004 a 2014.

Número do paciente	Gênero do paciente	Número do Isolado	Data da Coleta	Fonte	Fenótipo/	Tonalidade da colônia
1	F	LMC 301.01	Nov 2004	Pé	Pigmentado	Marrom
2	M	LMC 302.01	Mar 2005	Pé	Pigmentado	Marrom
3	M	LMC 303.01	Fev 2006		Pigmentado	Cinza
4	F	LMC 304.01	Mar 2006	Pé	Pigmentado	Cinza
5	F	LMC 305.01	Mai 2006	Pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 305.02	Dez 2007	Pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 305.03	Dez 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
6	M	LMC 306.01	Jan 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
7	F	LMC 307.01	Jan 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
8	F	LMC 308.01	Fev 2007	Pé	Pigmentado	Marrom
9	F	LMC 309.01	Abr 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
10	M	LMC 310.01	Mai 2007	Pé	Pigmentado	Cinza
11	F	LMC 311.01	Jun 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
12	F	LMC 312.01	Jun 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
13	M	LMC 313.01	Jun 2007	Unha do pé	Não Pigmentado	Creme
14	F	LMC 314.01	Ago 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
15	F	LMC 315.01	Set 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
16	F	LMC 316.01	Nov 2007	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
17	M	LMC 317.01	Dez 2011	Pé	Pigmentado	Cinza
18	F	LMC 318.01	Jan 2012	Pé	Não Pigmentado	Creme
19	M	LMC 319.01	Jul 2012	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
20	M	LMC 320.01	Ago 2012	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
21	M	LMC 321.01	Ago 2012	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 321.02	Ago 2012	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 321.03	Ago 2012	Pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 321.04	Nov 2012	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 321.05	Nov 2012	Pé	Pigmentado	Cinza
22	M	LMC 322.01	Out 2012	Unha do pé	Pigmentado	Marrom
		LMC 322.02	Out 2012	Pé	Pigmentado	Marrom
		LMC 322.03	Nov 2012	Pé	Pigmentado	Marrom
23	F	LMC 323.01	Jan 2013	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
24	M	LMC 324.01	Jan 2013	Pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 324.02	Jan 2013	Pé	Pigmentado	Cinza
		LMC 324.03	Jan 2013	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
25	F	LMC 325.01	Jan 2013	Unha do pé	Pigmentado	Cinza
26	F	LMC 326.01	Out 2013	Unha do pé	Não Pigmentado	Creme
27	M	LMC 401.01	Jul 2014	Pé	Não Pigmentado	Creme
28	F	LMC 402.01	Ago 2014	Unha do pé	Não Pigmentado	Creme
29	F	LMC 403.01	Ago 2014	Unha do pé	Não Pigmentado	Creme

M, masculino; F, feminino; LMC, Laboratório de Micologia Clínica.

4.2. Análise de polimorfismo por *Multilocus Sequence Typing* e análise filogenética

Com o intuito de analisar o polimorfismo nos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, as regiões ITS1 e ITS2 do rDNA e os genes CHS, TUB, HH3, GPD e EF1 foram parcialmente sequenciados. Destas regiões e genes foram sequenciados os fragmentos de 203 pb da região ITS1, 288 pb da região ITS2, 230 pb do CHS, 372 pb do TUB, 458 pb do HH3, 255 pb do GPD e 269 pb do EF1. As sequências geradas foram depositadas no banco de dados público *GenBank* (APÊNDICE II e III). Como resultado não foram encontradas diferenças nas sequências da região ITS2 de nenhum dos isolados clínicos analisados, assim como não foi identificado polimorfismo para os genes GPD e CHS. Foi localizada uma mutação pontual na posição 105 bp da região ITS1 do rDNA e uma mutação na posição 265 pb do gene HH3 nos isolados clínicos LMC313.1, LMC318.1, LMC326.01, LMC401.01, LMC402.01, LMC403.01 e na linhagem ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*), responsável pela transição de G por A (Tabela 3 e APÊNDICE III) que originou uma mutação silenciosa em um códon que codifica glutamato. Foram encontradas duas mutações pontuais na sequência de TUB nos isolados LMC 304.01, LMC 311.01, LMC 319.01 e ATCC®22190™ (*N. dimidiatum*) na posição 312 pb, responsável pela transição de T por C, alterando o códon de CTT que codifica o aminoácido leucina para CCT que codifica o aminoácido prolina; e nos isolados LMC 313.01, LMC 318.01, LMC326.01, LMC401.01, LMC402.01, LMC403.01 e ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*) na posição 318 pb, responsável pela transição de C por T, mutação silenciosa que codifica uma serina. No gene EF1 foram localizadas quatro mutações pontuais, o primeiro na posição 103 pb, responsável pela transição de T por C, o segundo na posição 188 pb, responsável pela transição de C por T, o terceiro na posição 198 pb, responsável pela transição de A por G, e a quarta mutação na posição 214 pb, responsável pela transversão de A por C, sendo nas posições 103 pb e 188 pb exclusivas para ATCC®22190™ (*N. dimidiatum*) e nas posições

198 pb e 214 pb para os isolados LMC 310.01, LMC 311.01, LMC313.01, LMC 315.01, LMC 316.01, LMC 318.01, LMC 322.02, LMC 322.03, LMC326.01, LMC401.01, LMC402.01, LMC403.01, ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*) e ATCC®22190™ (*N. dimidiatum*) (Tabela 3, APÊNDICE III). Todas as mutações encontrada em EF1 foram em regiões intrônicas.

Considerando as oito mutações pontuais encontradas pela combinação das sete regiões sequenciadas foi possível agrupar as amostras em 6 tipos de sequência (TSs) conforme esquematizado na tabela 3. Nos TSs 1, 2, 3, 4 e 6 estão os isolados clínicos de *N. dimidiatum*. Interessantemente, os 6 isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e a linhagem padrão ATCC®38907™ foram agrupados isoladamente no TS5. Os polimorfismos responsáveis pelo agrupamento dos *N. dimidiatum* var. *hyalinum* foram na região ITS1 (posição 105 pb) do rDNA, nos genes TUB e HH3 nas posições 318 pb e 458 pb, respectivamente (tabela 3).

A análise evolutiva realizada pelo método de UPGMA utilizando as 2075 bases referente ao concatenado gênico formado após o sequenciamento dos sete *loci* (ITS1, ITS2, EF1, TUB, HH3, CHS e GPD) gerou um dendrograma com base na *p*- distância (figura 7). Os valores de *bootstrap* estão registrados nos nós da árvore filogenética. A maioria dos isolados puderam ser classificados em dois subgrupos A e B, classificação suportada pelos altos valores de *bootstrap*. Foi encontrada associação entre os subgrupos A e produção de artroconídios e micélio pigmentados e B (figura 7) produção de artroconídios e micélio hialinos.

A sequência parcial do gene CHS não mostrou diferença quando comparadas entre os isolados desse estudo. Contudo, de acordo com pesquisa em bancos de dados público, foi possível encontrar dois sítios de polimorfismo nos nucleotídeos nas posições 38 e 174 bp entre as linhagens de CBS (CBS661.77, CBS499.66, CBS280.66, CBS251.49 e CBS204.33)

(Madrid *et al.*, 2009) e os isolados clínicos desse estudo (Tabela 3). Ambas são mutações silenciosas onde os códons codificam glicina.

Tabela 3: Mutações encontradas entre os isolados clínicos avaliados nesse estudo.

Isolado Clínico	TS	Gene (Tamanho da sequência de DNA – pb)									
		Sitio da mutação (pb)									
		ITS1 (203)	EF-1 (269)				TUB (372)		HH3 (458)	CHS (230)	
		105	103	188	198	214	312	318	265	38	174
LMC 301.01	1	G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 302.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 303.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 306.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 307.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 308.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 309.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 312.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 314.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 317.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 320.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.04		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.05		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 322.01*		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 323.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 325.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 304.01	2	G	T	C	A	A	C	C	G	C	T
LMC 319.01		G	T	C	A	A	C	C	G	C	T
LMC 311.01	3	G	T	C	G	C	C	C	G	C	T
LMC 310.01	4	G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 315.01		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 316.01		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 322.02*		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 322.03*		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 313.01	5	A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 318.01		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 326.01		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 401.01		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 402.01		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 403.01		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
ATCC®38907™		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T

Resultados

Isolado Clínico	TS	Gene (Tamanho da sequência de DNA – pb)									
		Sitio da mutação (pb)									
		ITS1 (203)	EF-1 (269)				TUB (372)		HH3 (458)	CHS (230)	
		105	103	188	198	214	312	318	265	38	174
ATCC®22190™	6	A	C	T	G	C	C	C	G	C	T
CBS 661.77		G	-	-	-	-	T	C	-	T	T
CBS 499.66		G	-	-	-	-	T	C	-	T	T
CBS 380.36		A	-	-	-	-	T	C	-	T	A
CBS 251.49		A	-	-	-	-	T	C	-	T	A
CBS 204.33		A	-	-	-	-	T	C	-	C	T
CBS 145.78		A	-	-	G	C	-	-	-	-	-

TS, Tipo de Sequência; ATCC, *American Type Culture Collection*; CBS, *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*; ATCC®38907™, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*; ATCC®22190™, *N. dimidiatum*; ITS1, Espaçador Transcrito Interno 1; EF1, Fator de Alongamento de cadeia 1 α ; TUB, β -tubulina; HH3, histona H3; CHS, quitina sintase; bp, pares de bases; G, guanina; C, citosina; A, adenina; T, timina; “-”, não avaliado; LMC, Laboratório de Micologia Clínica, FCFRP-USP, Ribeirão Preto, Brasil.

Figura 7: Árvore filogenética gerada a partir da análise UPGMA da combinação dos sete *loci* gênicos (ITS1, ITS2, EF1, TUB, HH3, CHS e GPD) de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. A análise envolveu 41 sequências de nucleotídeos, com um total de 2075 pb cada. A análise foi conduzida no software MEGA 6. Nos nós da árvore estão indicados os valores de *bootstrap*.

4.3. Análise do perfil de sensibilidade a variações de pH e temperatura

Com o intuito de observar o perfil de crescimento dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em diferentes temperaturas, as mesmas foram inoculadas em meio de cultura PDAY e o diâmetro da colônia foi medido a cada 12 h. Como resultado foi observado que a maioria das linhagem de *N. dimidiatum* apresentou o diâmetro da colônia maior que as linhagens de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em ambas as temperaturas, 28 e 37° C, excetuando a linhagem *N. dimidiatum* ATCC®22190™ que apresentou o diâmetro da colônia semelhante aos *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em ambas as temperaturas analisadas ($p < 0,05$). As colônias dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* apresentaram os diâmetros de 8 a 14 cm em 72 h de desenvolvimento a 28°C, e 10 a 14 cm a 37°C, enquanto qas colônias dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* apresentaram os diâmetros de 3 a 5 cm em 72 h de desenvolvimento a 28°C, e 2 a 6 cm a 37°C. Todos os isolados de *N. dimidiatum*, mostraram maior diâmetro de colônia a 37°C ($p < 0,05$) quando comparado ao diâmetro alcançado a 28°C (figura 8A e B).

Em relação ao perfil de crescimento dos isolados clínicos em diferentes pHs, foi observado maior diâmetro de colônia em pH ácido e um menor diâmetro da colônia nos pHs mais básicos para todos os isolados estudados. O desenvolvimento da colônia de *N. dimidiatum* atingiu os diâmetros de 7 a 9 cm, em pH 5,5; 6 a 9 cm em pH 6,5; 4 a 7 cm em pH 7,5 e 2 a 5 cm em pH 8,5, enquanto a colônia de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* não atingiu mais que 0,7 cm de diâmetro nos pHs avaliados (figura 8C, D, E e F).

A curva de crescimento baseada no diâmetro da colônia de cada isolado clínico em cada temperatura e pH testados foram analisadas de acordo com os TSs definidos neste trabalho (figura 8). O padrão da curva de crescimento de acordo com a temperatura revelou que os isolados pertencentes aos TSs 5 e 6 apresentaram menor diâmetro de colônia em ambas as temperaturas quando comparados aos TSs 1, 2, 3 e 4 ($p < 0,05$). Além disso, os

Resultados

isolados pertencentes aos TSs 3, 5 e 6 apresentaram semelhante curva de crescimento em ambas as temperaturas analisadas ($p > 0,05$). Os isolados pertencentes aos TSs 1, 2 e 4 apresentaram maior diâmetro de colônia com a mudança da temperatura de 28 para 37 °C (figura 8A e B).

Na análise de crescimento segundo o pH, observou-se que nos pHs 5,5; 6,5 e 7,5 os isolados pertencentes aos TSs 5 e 6 apresentaram menor diâmetro de colônia quando comparados aos TSs 1, 2, 3 e 4 ($p < 0,05$). No pH 8,5 o TS5 mostrou menor diâmetro de colônia quando comparado aos TSs 1, 2, 3 e 4. Já o TS6 evidenciou menor diâmetro de colônia em relação aos outros TSs (1, 2, 3 e 4) apenas no último tempo de leitura (72 h) ($p < 0,05$). O TS3 evidenciou discreto aumento no diâmetro da colônia ($p < 0,05$) nos pHs 7,5 e 8,5 quando comparados a todos os outros TSs (figura 8C, D, E e F).

Figura 8: *N. dimidiatum* var. *hyalinum* apresentou reduzido diâmetro da colônia em diferentes temperaturas e pHs. Os isolados clínicos e as linhagens ATCC foram inoculadas em PDAY e incubadas a 28 (A) e 37 °C (B); os isolados clínicos e as linhagens ATCC foram inoculadas em meio de cultura MM com os pHs 5,5 (C); 6,5 (D); 7,5 (E) e 8,5 (F) e incubados a 37 °C. Os diâmetros das colônias foram medidos a cada 12 h até 72 h de incubação. * TS5 (linhagens de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*) e TS6 (linhagem *N. dimidiatum* ATCC®22190™).

4.4. Teste de sensibilidade a antifúngicos

O perfil de sensibilidade a diferentes drogas antifúngicas foi testado para os isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* deste trabalho seguindo as diretrizes do protocolo M38A2 (CLSI). Os valores das CIMs foram avaliados para sete agentes antifúngicos nos tempos de 24 e 48 h de incubação a 37°C, mas somente foi considerado o tempo de 48 h de incubação, uma vez que em tempo menor não houve crescimento adequado para a leitura do resultado.

Nos testes de sensibilidade realizados foram observados os valores individuais da CIM de 50% (CIM50) e 90% (CIM90) para cada antifúngico testado a fim de se obter resultados mais precisos sobre a susceptibilidade dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (tabela 4). Foi também calculado o intervalo dos valores CIM50 e CIM90 obtidos para cada droga entre os isolados clínicos de ambas as variedades.

Para os 6 isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, na avaliação da média geométrica (MG) obtida pela CIM50, foi observado que os resultados entre os isolados testados apresentaram um intervalo entre 0,25 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cetoconazol, 4 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol, 0,03 a 0,13 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol, 0,5 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-flucitosina, 0,03 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para terbinafina, 2 a 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para caspofungina e de 0,03 a 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B. Em relação aos valores encontrados para CIM90, foi observado o intervalo entre 0,5 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cetoconazol, 8 a 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol, 0,13 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol, 2 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-flucitosina, 0,5 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para terbinafina, 16 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para caspofungina e de 0,03 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina (tabela 4).

Para os 33 isolados clínicos de *N. dimidiatum*, na avaliação da MG de CIM50 foi observado que o intervalo foi entre 16 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para cetoconazol, 32 a 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol, 0,25 a 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol, 2 a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-flucitosina, 0,03 a 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para terbinafina, 2 a 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para caspofungina e 0,03 a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para

Resultados

anfotericina B. Para CIM90, foi observada a diferença entre 64 a $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentrações não testadas) para cetoconazol, 64 a $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$ para fluconazol (concentrações não testadas), 1 a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para voriconazol, 4 a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ para 5-flucitosina, 0,13 a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ para terbinafina, 16 a $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ para caspofungina e 0,03 a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para anfotericina B (tabela 4).

Em relação aos isolados clínicos, *N. dimidiatum* (*Nd* - ATCC®22190™) e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (*Nh* - ATCC®38907™) foram mais sensíveis ao fluconazol (*Nd*, intervalo de CIM de 32 a $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $45 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Nh*, CIM $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ and MG CIM $32 \mu\text{g mL}^{-1}$), cetoconazol (*Nd*, CIM $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Nh*, intervalo de CIM de 1 a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $1.42 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 5-flucitosina (*Nd*, CIM $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; *Nh*, CIM $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $4 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, ambas as linhagens apresentaram similar sensibilidade a anfotericina B, voriconazol, terbinafina e caspofungina (tabela 4).

Os antifúngicos anfotericina B (intervalo de CIM de 0,03 a $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $0,14 \mu\text{g mL}^{-1}$), terbinafina (intervalo de CIM de 0,125 a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG MIC $0,81 \mu\text{g mL}^{-1}$) e voriconazol (intervalo de CIM de 0,25 a $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG MIC $2,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram os que apresentaram maior atividade nos testes realizados com os isolados clínicos testados, seguido pela 5-flucitosina (intervalo de CIM de 4 a $32 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $15 \mu\text{g mL}^{-1}$) e caspofungina (intervalo de CIM de 16 a $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $26 \mu\text{g mL}^{-1}$). Cetoconazol (intervalo de CIM de 16 a $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $106 \mu\text{g mL}^{-1}$) e fluconazol (intervalo de CIM de 64 a $>128 \mu\text{g mL}^{-1}$ e MG CIM $114 \mu\text{g mL}^{-1}$) não foram efetivos contra os isolados testados, sendo que muitas vezes foi observada redução de desenvolvimento do fungo apenas na última concentração testada.

Agrupando-se os valores de intervalos e MG das CIM90 dos isolados clínicos, listados na tabela 5 de acordo com a classificação dos TSs, foi observado que para terbinafina e anfotericina B não houve nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$) entre os TSs estudados.

Indiscutivelmente, os isolados clínicos pertencentes ao TS5, composto exclusivamente por *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, apresentaram os menores CIMs para cetoconazol, fluconazol e voriconazol, três representantes azólicos ($p < 0,05$) (tabela 5). O isolado clínico pertencente ao TS6 apresentou menores CIMs que os outros TSs (1, 2, 3 e 4) para fluconazol e cetoconazol ($p < 0,05$). Além disso, demonstrou ser mais sensível a flucitocina que os isolados clínicos pertencentes aos TSs 1, 3 e 4. Foi comparável ao TS2 e 5 apesar desses não apresentarem diferença significativa em relação aos demais ($p < 0,05$).

Para caspofungina os TS4 e 5 mostraram-se mais resistentes que os TSs 1, 2 e 6, e comparáveis ao ST 3 apesar desse não apresentar diferença significativa em relação aos demais ($p < 0,05$).

Resultados

Tabela 4: Médias geométricas das CIM50 e CIM90 dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* na presença de diferentes drogas antifúngicas. Valores de CIM em $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtidos a partir de três experimentos independentes para cada isolado clínico.

Isolado	Anfotericina B		Cetoconazol		Fluconazol		Voriconazol		Terbinafina		5-Flucitosina		Caspofungina	
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90
	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO
LMC 301.01	0,31	0,40	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	2,00	2,00	4,00	8,00	16,00
	0,125-0,5	0,25-0,5	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	2,00	2,00	4,00	8,00	16,00
LMC 302.01	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,25	2,00	2,00	4,00	8,00	16,00
	0,125	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,25	2,00	2,00	4,00	8,00	16,00
LMC 303.01	0,06	0,13	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	2,00	1,00	4,00	2,00	16,00
	0,625	0,13	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	2,00	1,00	4,00	2,00	16,00
LMC 304.01	0,06	0,13	64,00	>128,00	64,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	1,41	1,00	2,00	2,00	16,00
	0,625	0,13	64,00	>128,00	64,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	1,00-2,00	1,00	2,00	2,00	16,00
LMC 305.01	0,20	0,25	80,63	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	4,00	0,71	2,00	4,00	16,00
	0,13-0,25	0,25	64,00-128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	4,00	0,50-1,00	2,00	4,00	16,00
LMC 305.02	0,25	0,50	64,00	>128,00	90,51	>128,00	8,00	16,00	0,71	4,00	0,35	1,00	11,31	20,16
	0,25	0,50	64,00	>128,00	64,00-128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50-1,00	4,00	0,25-0,50	1,00	8,00-16,00	16,00-32,00
LMC 305.03	0,06	0,13	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00
	0,06	0,13	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00
LMC 306.01	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	2,83	2,00	4,00	8,00	20,16
	0,125	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	2,00-4,00	2,00	4,00	8,00	16,00-32,00
LMC 307.01	0,06	0,13	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	22,63	0,50	1,41	1,00	2,00	2,00	20,16
	0,0625	0,13	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00-32,00	0,50	1,00-2,00	1,00	2,00	2,00	16,00-32,00
LMC 308.01	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,41	4,00	2,00	4,00	8,00	20,16
	0,125	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00-2,00	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00-32,00
LMC 309.01	0,25	0,50	64,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	4,00	0,50	1,00	8,00	16,00
	0,25	0,50	64,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	1,00	4,00	0,50	1,00	8,00	16,00
LMC 310.01	0,25	0,50	16,00	32,00	32,00	90,51	16,00	32,00	0,50	1,41	0,25	0,50	11,31	22,63
	0,25	0,50	16,00	32,00	32,00	64-128	16,00	32,00	0,50	1,00-2,00	0,25	0,50	8,00-16,00	16,00-32,00
LMC 311.01	0,13	0,25	45,25	>128,00	128,00	>128,00	16,00	22,63	0,50	2,00	0,40	1,00	11,31	22,63
	0,125	0,25	32,00-64,00	>128,00	128,00	>128,00	16,00	16,00-32,00	0,50	2,00	0,25-0,50	1,00	8,00-16,00	16,00-32,00

Resultados

Isolado	Anfotericina B		Cetoconazol		Fluconazol		Voriconazol		Terbinafina		5-Flucitosina		Caspofungina	
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90
	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO
LMC 312.01	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,71	2,83	2,00	4,00	8,00	16,00
	0,125	0,25	32,00	128,00->128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50-1,00	2,00-4,00	2,00	4,00	8,00	16,00
LMC 313.01	0,25	0,50	5,66	16,00	22,63	64,00	4,00	8,00	0,13	0,35	0,50	2,00	8,00	32,00
	0,25	0,50	4,00-8,00	16,00	16,00-32,00	64,00	4,00	8,00	0,13	0,25-0,50	0,50	2,00	8,00	32,00
LMC 314.01	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	2,00	4,00	8,00	22,63
	0,13	0,25	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00-32,00
LMC 315.01	0,25	0,50	32,00	>128,00	128,00	>128,00	11,31	22,63	0,50	2,00	0,31	1,00	11,31	22,63
	0,25	0,50	32,00	128,00->128,00	128,00	>128,00	8,00-16,00	16,00-32,00	0,50	2,00	0,50-1,00	1,00	8,00-16,00	16,00-32,00
LMC 316.01	0,06	0,13	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,71	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00
	0,06	0,13	32,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50-1,00	4,00	2,00	4,00	8,00	16,00
LMC 317.01	0,25	0,25	32,00	64,00	64,00	90,51	16,00	22,63	0,71	2,00	0,31	1,00	8,00	16,00
	0,25	0,25	32,00	64,00	64,00	64,00-128,00	16,00	16,00-32,00	0,50-1,00	2,00	0,50-1,00	1,00	8,00	16,00
LMC 318.01	0,25	0,25	4,00	16,00	16,00	64,00	11,31	22,63	0,06	0,25	0,79	1,00	4,00	32,00
	0,25	0,25	4,00	16,00	16,00	64,00	8,00-16,00	16,00-32,00	0,06	0,25	0,50-1,00	1,00	4,00	32,00
LMC 319.01	0,04	0,05	25,40	>128,00	32,00	>128,00	4,00	10,08	0,63	4,00	0,03	0,13	16,00	50,80
	0,03-0,06	0,03-0,13	16,00-64,00	>128,00	32,00	>128,00	4,00	8,00-16,00	0,50-1,00	4,00	0,03	0,13	16,00	32-64,00
LMC 320.01	0,04	0,05	40,32	>128,00	64,00	>128,00	4,00	10,08	0,50	4,00	0,05	0,20	16,00	45,25
	0,03-0,06	0,03-0,13	32,0-64,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	8,00-16,00	0,50	4,00	0,03-0,06	0,13-0,25	16,00	32,00-64,00
LMC 321.01	0,03	0,03	32,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,25	16,00	64,00
	0,03	0,03	32,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,25	16,00	64,00
LMC 321.02	0,03	0,03	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,25	16,00	64,00
	0,03	0,03	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,25	16,00	64,00
LMC 321.03	0,03	0,06	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	8,00	0,63	2,00	0,03	0,25	16,00	64,00
	0,03	0,06	128,00	>128,00	128,00	>128,00	8,00	8,00	0,50-1,00	2,00	0,03	0,25	16,00	64,00
LMC 321.04	0,04	0,06	40,32	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,79	3,17	0,03	0,13	16,00	45,25
	0,03-0,06	0,06	32,00-64,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,50-1,00	2,00-4,00	0,03	0,13	16,00	32,00-64,00
LMC 321.05	0,04	0,06	40,32	>128,00	64,00	>128,00	4,00	20,16	0,50	2,00	0,04	0,20	22,63	64,00
	0,03-0,06	0,06	32,00-64,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00-32,00	0,50	2,00	0,03-0,06	0,13-0,25	16,0-32,00	64,00

Resultados

Isolado	Anfotericina B		Cetoconazol		Fluconazol		Voriconazol		Terbinafina		5-Flucitosina		Caspofungina	
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90	MG CIM50	MG CIM90
	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO	INTERVALO
LMC 322.01	0,04	0,06	50,80	>128,00	32,00	64,00	4,00	10,08	0,50	4,00	0,03	0,13	16,00	50,80
	0,03-0,06	0,06	32,00-128,00	>128,00	32,00	64,00	4,00	8,00-16,00	0,50	4,00	0,03	0,13	16,00	32,00-64,00
LMC 322.02	0,06	0,05	40,32	>128,00	32,00	64,00	8,00	20,16	0,50	4,00	0,03	0,13	16,00	32,00
	0,06	0,03-0,06	32,00-64,00	>128,00	32,00	64,00	8,00	16,00-32,00	0,50	4,00	0,03	0,13	16,00	32,00
LMC 322.03	0,03	0,03	32,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,18	16,00	32,00
	0,03	0,03	32,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00	0,50	4,00	0,06	0,13-0,25	16,00	32,00
LMC 323.01	0,03	0,16	50,80	>128,00	64,00	>128,00	4,00	20,16	0,25	1,00	0,31	0,35	16,00	20,16
	0,03	0,06-0,13	32,00-128,00	>128,00	64,00	>128,00	4,00	16,00-32,00	0,25	1,00	0,50-1,00	0,125-1,00	16,00	16,00-32,00
LMC 324.01	0,03	0,09	64,00	>128,00	32,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	1,00	0,31	0,35	11,31	32,00
	0,03	0,06-0,13	64,00	>128,00	32,00	>128,00	8,00	16,00	0,50	1,00	0,50-1,00	0,125-1,00	8,00-16,00	32,00
LMC 324.02	0,03	0,03	32,00	>128,00	32,00	>128,00	8,00	16,00	0,79	4,00	0,03	0,13	16,00	64,00
	0,03	0,03	32,00	>128,00	32,00	>128,00	8,00	16,00	0,5-1,00	4,00	0,03	0,13	16,00	64,00
LMC 324.03	0,03	0,03	101,59	>128,00	128	101,59	8,00	16,00	0,25	1,00	0,25	2,00	4,00	16,00
	0,03	0,03	64,00-128,00	>128,00	128	64,00-128	8,00	16,00	0,25	1,00	0,25	2,00	4,00	16,00
LMC 325.01	0,04	0,08	101,59	>128	64,00	101,59	4,00	8,00	0,25	1,00	0,25	2,00	4,00	16,00
	0,03-0,06	0,06-0,13	64,00-128,00	>128	64,00	64,00-128,00	4,00	8,00	0,25	1,00	0,25	2,00	4,00	16,00
LMC 326.01	0,04	0,35	1,00	2,00	64,00	32,00	0,50	2,00	0,06	0,25	0,25	2,00	2,00	16,00
	0,03-0,06	0,25-0,5	1,00	2,00	64,00	32,00	0,50	2,00	0,06	0,25	0,25	2,00	2,00	16,00
LMC 401.01	0,04	0,09	2,00	8,00	4,00	64,00	4,00	8,00	0,13	0,50	0,13	0,50	8,00	32,00
	0,03-0,06	0,06-0,13	2,00	8,00	4,00	64,00	4,00	8,00	0,13	0,50	0,13	0,50	8,00	32,00
LMC 402.01	0,06	0,13	1,00	2,83	32,00	64,00	4,00	8,00	0,13	0,25	0,13	0,50	8,00	32,00
	0,06	0,13	1,00	2,00-4,00	32,00	64,00	4,00	8,00	0,13	0,25	0,13	0,50	8,00	32,00
LMC 403.01	0,06	0,13	0,25	0,50	32,00	8,00	8,00	16,00	0,06	0,13	0,13	1,00	8,00	32,00
	0,06	0,13	0,25	0,50	32,00	8,00	8,00	16,00	0,06	0,13	0,13	1,00	8,00	32,00

Resultados

Tabela 5: Intervalo e média geométrica da CIM90 obtida nos testes de sensibilidade a antifúngicos com os isolados clínicos e linhagens ATCC de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, agrupados de acordo com os tipos de sequência (TSs).

TS (n° de linhagens)	Anfotericina B		Voriconazol		Terbinafina		5-Flucitosina		Cetoconazol		Fluconazol		Caspofungina	
	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG	Intervalo	MG
TS 1 (25)	0,03 - 0,5	0,118	1 - 4	2,60	0,125 - 4	0,83	4 - 32	14,86	32 - >128	124,63	64 - >128	120,53	16 - 64	28,50
TS 2 (2)	0,03 - 0,125	0,077	1 - 4	2,37	0,125 - 2	0,50	8 - 16	12,69	>128	>128	>128	>128	16 - 64	28,50
TS 3 (1)	0,25	0,250	2	2,00	0,5 - 2	1,00	16 - 32	22,63	>128	>128	>128	>128	16 - 32	22,62
TS 4 (5)	0,03 - 0,5	0,135	1 - 4	2,82	0,125 - 4	0,53	16 - 32	20,63	32 - >128	97	64 - >128	103,96	16 - 32	24,25
TS 5 (7)	0,03 - 0,5	0,152	0,125 - 0,5*	0,27*	0,5 - 2	0,74	2 - 32	7,61	0,5-16*	3,62*	8-64*	39,00*	16-32	28,98
TS 6 (1)	0,06	0,06	0,5	0,50	0,5	0,50	1	1,00	1	1,00	32-64	45,25	8	8,00
Total (41)	0,03 - 0,5	0,126	0,125 - 4	1,68	0,125 - 4	0,75	1 - 32	12,95	1 - >128	58,81	32 - >128	95,63	8 - 64	27,02

TS, tipo de sequência; CIM, concentração inibitória mínima; MG, média geométrica; * $p < 0,05$ em relação aos TS 1, TS 2, TS 3 e TS4.

4.5. Tratamento fotodinâmico antimicrobiano

4.5.1. Avaliação da eficácia do tratamento fotodinâmico antimicrobiano nos artroconídios de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* pela concentração inibitória mínima

A escolha dos isolados clínicos para esta padronização foi baseada nos TSs, teste de sensibilidade a antifúngicos e diferença fenotípica (coloração da colônia em meio de cultura PDAY). Assim, foram selecionados onze isolados clínicos, sendo oito *N. dimidiatum* (LMC 302.01, LMC 305.01, LMC 322.03, LMC 303.01, LMC 319.01, LMC 311.01, LMC 316.01 e ATCC®22190™ *N. dimidiatum*) e três *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (LMC 313.01, LMC 318.01 e ATCC®38907™ *N. dimidiatum* var. *hyalinum*).

4.5.1.1. Concentração inibitória mínima dos artroconídios apenas à luz e apenas aos fotossensibilizadores fenotiazínicos

As exposições apenas à luz, utilizando a lâmpada de LED 600, independente da dose utilizada não gerou um efeito inibitório para os isolados clínicos avaliados (dados não mostrados). Na ausência de luz, os FSs MB, TBO e NMBN não apresentaram atividade fungistática ou fungicida nas concentrações testadas de até 200 µM. O S137 foi o único FS que apresentou toxicidade no escuro, apresentando inibição do crescimento na concentração de 50 µM para todos os isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* testados (tabela 6).

Tabela 6: Concentração inibitória mínima (CIM) dos FSs TBO, MB, NMBN e S137, na ausência de luz, para os isolados clínicos estudados.

Isolado clínico	TS	Coloração da Colônia em PDAY	TBO CIM (μM)	MB CIM (μM)	NMBN CIM (μM)	S137 CIM (μM)
LMC 302.01	1	marrom	>200	>200	>200	50
LMC 305.01	1	marrom	>200	>200	>200	50
LMC 322.03	4	cinza	>200	>200	>200	50
LMC 303.01	1	cinza	>200	>200	>200	50
LMC 319.01	2	cinza	>200	>200	>200	50
LMC 311.01	3	cinza	>200	>200	>200	50
LMC 316.01	4	cinza	>200	>200	>200	50
ATCC®22190™ (<i>N. dimidiatum</i>)	6	cinza	>200	>200	>200	50
ATCC®38907™ (<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>)	5	creme	>200	>200	>200	50
LMC318.01	5	creme	>200	>200	>200	50
LMC313.01	5	creme	>200	>200	>200	50

TS, tipo de sequência; TBO, azul de toluidina O; MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137, derivado do azul de metileno; LMC, Laboratório de Micologia Clínica, ATCC, *American Type Culture Collection*.

4.5.1.2. Concentração inibitória mínima dos artroconídios nas exposições simultâneas à luz e aos FSs fenotiazínicos

As melhores concentrações dos FSs a serem testadas no teste de sobrevivência dos artroconídios no TFDA foram determinadas por uma análise inicial da CIM dos FSs fenotiazínicos frente a representantes dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. De acordo com os resultados, os isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (LMC 313.01 e LMC 318.01) assim como a linhagem ATCC®38907™- *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (TS5) mostraram ser mais sensíveis ao uso do TFDA visto que estes isolados apresentaram menores valores de CIM para as três doses de luz testadas para todos os FSs. Já os isolados clínicos de *N. dimidiatum* mostraram ser mais resistentes ao TFDA para os FSs fenotiazínicos, principalmente para NMBN e S137. Além disso, o aumento da dose de luz modificou levemente o perfil de resistência, com exceção do S137, que apresentou semelhante perfil de inativação em todas as doses de luz testadas. A linhagem ATCC®22190™ *N. dimidiatum* (TS6) mostrou maior sensibilidade a todos os FSs testados.

Resultados

Entre os isolados analisados não foi possível associar diferenças entre as CIM e os dois tipos de pigmentação da colônia, marrom e cinza (tabela 7).

Assim, as concentrações selecionadas dos FSs MB, TBO, NMBN e S137 para a análise do TFDA pela fração de sobrevivência foram 200 μ M, 200 μ M, 200 μ M e 25 μ M, respectivamente, para *N. dimidiatum* e 25 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 10 μ M, respectivamente, para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.

Resultados

Tabela 7: Faixa e média das CIMs obtidas no TFDA com os isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.

Isolado	Coloração da colônia em PDAY	TS	FS	TBO			MB			NMBN			S137		
				CIM (µM)			CIM (µM)			CIM (µM)			CIM (µM)		
				Doses de luz (J cm ⁻²)											
				5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
LMC 302.01	Marrom	1		>200,0	>200,0	12,5-50,0	>200,0	200,0- >200,0	75,0-200,0	50,0-100,0	10,0-100,0	100,0- 200,0	12,5	12,5	10,0
LMC 305.01	Marrom	1		>200,0	>200,0	10,0-25,0	>200,0	200,0- >200,0	75,0- >200,0	>200,0	12,5-25,0	12,5- >200,0	10,0-12,5	12,5-25	10-12,5
LMC 322.03	Cinza	4		>200,0	>200,0	75,0-100,0	>200,0	100,0- >200,0	75,0- >200,0	50,0-100,0	10,0-25,0	75,0	10,0-25,0	10,0-25,0	12,5-37,5
LMC 303.01	Cinza	1		>200,0	>200,0	75,0- >200,0	>200,0	200,0- >200,0	200,0- >200,0	50,0-200,0	75,0-100,0	100,0- 200,0	25,0	25,0-37,5	37,5
LMC 319.01	Cinza	2		>200,0	>200,0	75,0- >200,0	>200,0	200->200	200,0- >200,0	75,0-200,0	100,0	100,0- 200,0	25,0	25,0-37,5	37,5
LMC 311.01	Cinza	3		>200,0	>200,0	50,0	>200,0	50,0- >200,0	100,0- >200,0	50,0	50,0	10,0-100,0	10,0-25,0	12,5-25	12,5-37,5
LMC 316.01	Cinza	4		>200,0	>200,0	50- >200	>200,0	>200,0	200,0- >200,0	>200,0	100,0- 200,0	100,0- 200,0	25,0	25,0	10,0-37,5
ATCC®22190™ <i>N. dimidiatum</i>	Cinza	6		200,0- >200,0	25,0-75,0	10,0-12,5	200,0	75,0-100,0	25,0-75,0	25,0->50,0	25,0-50,0	50,0	10,0-12,5	10,0	5,0-10,0
ATCC®38907™ <i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	Creme	5		>200	5,0-10,0	2,5-10,0	>200,0	12,5->50,0	5,0-12,5	50,0	10,0	2,5-10	5,0	5,0	2,5-5,0
LMC 318.01	Creme	5		>200,0	10,0	2,5-10,0	>200,0	25,0->50,0	10,0-25,0	50,0	5,0-10,0	10,0-25,0	10,0	10,0	10,0
LMC313.01	Creme	5		>200,0	10,0-12,5	2,5-12,5	>200,0	50,0->50,0	12,5-25,0	25,0-50,0	12,5	12,5	10,0	10,0	5,0

TBO, azul de toluidina O; MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; S137, derivado do azul de metileno; TS, tipo de sequência; ATCC, *American Type Culture Collection*; LMC, Laboratório de Micologia Clínica.

4.5.2. Inativação fotodinâmica antimicrobiana pela avaliação da fração de sobrevivência

Baseado nas CIMs obtidas no experimento que avaliou o efeito da exposição simultânea à luz e aos FSs fenotiazínicos na sobrevivência dos artroconídios de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, foi possível determinar as concentrações dos FSs para o experimento da fração de sobrevivência. Considerando que não houve grande diferença entre as CIMs dos *N. dimidiatum* estudados, a escolha das linhagens para o experimento de fração de sobrevivência levou em consideração apenas a pigmentação diferencial da colônia, evidenciada na figura 6. As linhagens LMC302.01 e LMC303.01 (*N. dimidiatum*) e LMC313.01 (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*) foram selecionadas para avaliar a fração de sobrevivência frente ao TFDA com os FSs MB, NMBN, TBO e S137. A fração de sobrevivência dos diferentes tratamentos foi calculada em relação aos tratamentos-controle expostos aos FSs na ausência de luz.

Para os FSs MB e TBO, cujas concentrações testadas foram 200 μM para *N. dimidiatum* e 25 e 10 μM para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, respectivamente, as exposições à dose de luz de 5 J cm^{-2} levou a diminuição de aproximadamente 1 log para os dois isolados de *N. dimidiatum* e 4 logs para *N. dimidiatum* var. *hyalinum* ($p < 0,05$). A dose de luz de 10 J cm^{-2} levou a diminuição de aproximadamente 2,5 a 3 e 5 logs, respectivamente, para os dois isolados de *N. dimidiatum* (LMC302.01 e LMC303.01) e o para *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (LMC313.01) para ambos FSs, MB e TBO ($p < 0,05$). Já a dose de luz de 20 J cm^{-2} levou a diminuição de 4,5 a 5 logs da fração de sobrevivência para todos os isolados testados, também para ambos FSs ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa na diminuição da fração de sobrevivência com o aumento da dose de luz de 10 para 20 J cm^{-2} para o isolado de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (figura 9).

Para NMBN, nas concentrações testadas de 200 μM para *N. dimidiatum* e 25 μM para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, as exposições à dose de luz de 5 J cm^{-2} levaram a diminuição de

aproximadamente 3 logs para os isolados de *N. dimidiatum* e 5 logs para *N. dimidiatum* var. *hyalinum* ($p < 0,05$). As doses de luz 10 e 20 J cm⁻² levaram a diminuição de 5 logs, 4 logs e 5 logs, respectivamente, para os isolados LMC 302.01, LMC 303.01 (*N. dimidiatum*) e LMC 313.01 (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*). O aumento da dose de luz de 10 para 20 J cm⁻² não alterou significativamente a fração de sobrevivência para os isolados LMC 302.01 e LMC 303.01, quando testados com NMBN ($p > 0,05$) e o aumento de 5 J cm⁻² para 20 J cm⁻² não alterou significativamente a fração de sobrevivência para os isolados LMC 313.01 frente a NMBN ($p > 0,05$) (figura 9).

Para S137, nas concentrações testadas de 25 µM para *N. dimidiatum* e 10 µM para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, as exposições na dose de luz de 5 J cm⁻² levaram a diminuição de 3,5; 2,5 e 2 logs para os dois isolados de *N. dimidiatum* (LMC 302.01 e LMC 303.01) e para o isolado de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* (LMC 313.01), respectivamente. Exposições à dose de luz de 10 J cm⁻² levaram a diminuição de 5; 2,5 e 2,5 e a 20 J cm⁻² levou à diminuição de 5,5; 5 e 3,5 logs na fração de sobrevivência, para os isolados LMC 302.01, LMC 303.01 e LMC 313.01, respectivamente ($p < 0,05$). Para o isolado LMC 303.01 o aumento da dose de luz de 5 para 10 J cm⁻² não diminuiu significativamente ($p > 0,05$) a fração de sobrevivência (figura 9).

Artroconídios germinados comportaram-se exatamente igual a artroconídios não germinados quando expostos à mesma dose de luz e concentração de FS ($p > 0,05$) (figura 10).

Figura 9: Fração de sobrevivência dos artroconídios não germinados dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* no TFDA com os FSs MB, NMBN, TBO e S137. (A) LMC302.01 (*N. dimidiatum*), (B) LMC303.01 (*N. dimidiatum*) e (C) LMC313.01 (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*). Cada resultado é a média de três experimentos independentes. MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; TBO, azul de toluidina O; S137, derivado do azul de metileno, -FS, sem fotossensibilizador; +FS, com fotossensibilizador.

Figura 10: Fração de sobrevivência dos atroconídios germinados e não germinados dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* no TFDA com os FSs. (A) azul de metileno, (B) novo azul de metileno N, (C) azul de toluidina O (D) S137. Cada resultado é a média de três experimentos independentes. -FS, sem fotossensibilizador; +FS, com fotossensibilizador; LMC, Laboratório de Micologia Clínica.

4.5.3. Análise de permeabilidade de membrana em artroconídios expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano

O PI é um composto fluorescente e intercalante de DNA, impermeável à membrana celular e somente é internalizado por uma célula quando a permeabilidade da membrana está alterada devido a danos. A captação de PI por uma célula é um método bem estabelecido para a determinação da morte celular. Em fungos, as membranas podem se tornar reversivelmente permeáveis ao PI (Davey e Hexley, 2011). Nesse estudo analisamos as alterações na permeabilidade da membrana fúngica após ao TFDA pela análise da internalização do PI por citometria de fluxo.

A marcação dos artroconídios com PI revelou que os FSs MB, NMBN e TBO na concentração de 200 μM foram responsáveis pela permeabilização do PI para os isolados de *N. dimidiatum* (LMC 302.01 e LMC 303.01) no escuro e em todas as doses de luz, sendo gradual o aumento até a dose de luz de 10 J cm^{-2} ($p < 0,05$). Além disso, foi observada a mesma permeabilidade em 10 e 20 J cm^{-2} ($p > 0,05$ - figuras 11, 12 e 13).

Para a concentração 25 μM de MB, 25 μM de NMBN e 10 μM de TBO utilizadas para a linhagem LMC313.01 (*N. dimidiaum* var. *hyalinum*), não houve aumento significativo da permeabilidade da membrana no escuro ($p > 0,05$). O aumento foi gradual entre as doses de luz 5 e 10 J cm^{-2} ($p < 0,05$) e estabilizou com o aumento da dose de luz entre 10 e 20 J cm^{-2} ($p > 0,05$) para MB e TBO. A estabilização da marcação do PI no artroconídio para NMBN ocorreu a partir de 5 J cm^{-2} até 10 J cm^{-2} ($p > 0,05$ - figura 11, 12 e 13).

Já para S137, tanto a concentração utilizada para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, 10 μM , quanto para a utilizada para *N. dimidiatum*, 25 μM , foram suficientes para induzir o aumento da permeabilidade da membrana desde o escuro até 20 J cm^{-2} ($p < 0,05$). Não foi observado aumento na marcação por PI com o aumento da dose de luz utilizada ($p > 0,05$ - figura 14).

Figura 12: Fração de sobrevivência *versus* permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com NMBN. Em A, LMC 302.01; B, LMC 303.01 e C, LMC 313.01. Cada resultado é a média de três experimentos independentes. -FS, sem fotossensibilizador; +FS, com fotossensibilizador; PI, iodeto de propídio; NMBN, novo azul de metileno N.

Figura 13: Fração de sobrevivência *versus* permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com TBO. Em A, LMC 302.01; B, LMC 303.01 e C, LMC 313.01. Cada resultado é a média de três experimentos independentes. -FS, sem fotossensibilizador; +FS, com fotossensibilizador; PI, iodeto de propídio; TBO, azul de toluidina O.

Figura 14: Fração de sobrevivência *versus* permeabilidade de membrana (PI) para artroconídios expostos ao TFDA com S137. Em A, LMC 302.01; B, LMC 303.01 e C, LMC 313.01. Cada resultado é a média de três experimentos independentes. -FS, sem fotossensibilizador; +FS, com fotossensibilizador; PI, iodeto de propídio; S137, novo derivado sintético de azul de metileno.

4.5.4. Avaliação da peroxidação lipídica em artroconídios pela análise da produção de malonaldeído expostos ao tratamento fotodinâmico antimicrobiano

Durante o processo fotoquímico do TFDA são produzidas várias EROs tais como oxigênio singlete, o que resulta em danos oxidativos inespecíficos. Todas as biomoléculas são susceptíveis à ação das EROs, contudo, a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Consequentemente, ocorre a perda da seletividade na troca iônica e a liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos. Nesse estudo, foi feita a avaliação da peroxidação lipídica através da formação do produto majoritário citotóxico, MDA, após experimento de TFDA com todos os FSs nas doses de luz de 10 e 20 J cm⁻² em artroconídios de *Neoscytalidium* spp.

Nas exposições únicas à luz e para todos os FSs no escuro não foi registrada a produção de MDA, isto é, ocorrência de peroxidação lipídica nos artroconídios ($p > 0,05$) (figura 15). Não foi observada a produção de MDA para o TFDA com os FSs MB e TBO em nenhuma das linhagens estudadas para nenhuma das doses de luz testadas ($p > 0,05$). Já para os FSs NMBN e S123, foi observado o aumento da produção de MDA ($p < 0,05$) para os dois isolados de *N. dimidiatum*, LMC 302.01 e LMC 303.01, nas doses de luz 10 e 20 J cm⁻². Foi observada uma tendência de aumento de produção de MDA com o aumento da dose de luz de 10 para 20 J cm⁻², principalmente para S137, porém esse aumento não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$).

Para *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, LMC 313.01, foi observado aumento significativo na produção de MDA apenas na dose de luz 20 J cm⁻² para NMBN e S137 ($p < 0,05$). O aumento na produção de MDA para a dose de luz de 10 J cm⁻², apesar de ser observado, não foi estatisticamente significativo quando comparado ao controle não exposto à luz e ao FS ($p > 0,05$).

Figura 15: Fração de sobrevivência versus quantidade de MDA no TFDA com os FSs MB, TBO, NMBN e S137. Em A, LMC 302.01; B, LMC 303.01 e C, LMC 313.01. Cada resultado é a média de três experimentos independentes. MDA, malonaldeído; MB, azul de metileno; NMBN, novo azul de metileno N; TBO, azul de toluidina O; S137, derivado do azul de metileno, -FS, sem fotossensibilizador.

DISCUSSÃO

“Não deseje que as coisas sejam mais fáceis – deseje ser mais forte.”.

(Jim Rohn)

5. Discussão

A Neoscytalidiose é uma micose superficial causada pelo fungo não dermatófito produtor de melanina *N. dimidiatum* e a variedade hialina *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Suas manifestações clínicas a tornam indistinguível das dermatofitoses e, embora os sintomas sejam os mesmos, os tratamentos tópicos e sistêmicos convencionais antifúngicos (por exemplo, terbinafina, griseofulvina, cetoconazol, itraconazol e fluconazol) são ineficientes para esse tipo de infecção (Machouart *et al.*, 2013).

Apesar do crescente interesse, são escassos os trabalhos que descrevem a epidemiologia dos pacientes portadores de Neoscytalidioses bem como dados do perfil de susceptibilidade a antifúngicos dos agentes etiológicos. Com o objetivo de verificar a epidemiologia e o perfil de sensibilidade de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, neste trabalho foram analisados isolados clínicos de escamas de pele do pé e unha destas duas variedades, isolados de 29 pacientes no SAC da FCFRP-USP entre os anos de 2004 a 2014. Foram analisados 33 isolados de *N. dimidiatum* e 6 isolados de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Nesta amostragem, 56,4% foram isolados de unha e 43,6% de escamas de pele do pé. Além disso, é observado que 58,6% dos casos acometem indivíduos do sexo feminino, resultado semelhante ao encontrado em trabalho realizado na França, onde o sexo feminino também foi o mais acometido (Lacroix *et al.*, 2003).

A genotipagem molecular, realizada pelo método de MLST, foi realizada pelo sequenciamento parcial de sete *loci* (ITS1 e 2 do rDNA e genes CHS, TUB, EF1, HH3, GPD) onde foram encontrados oito sítios polimórficos. O polimorfismo encontrado no EF1 já foi previamente descrito (Inderbitzin *et al.*, 2010; Sakalidis *et al.*, 2011; Marques *et al.*, 2013). A mutação pontual encontrada na região ITS1 e na posição 318 pb da TUB dos isolados clínicos deste trabalho foi exclusiva da variedade *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e estas mutações contribuíram para a separação dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em um

único TS. A mutação encontrada em ITS1 exclusiva para os isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* deste trabalho já foi descrita em *N. dimidiatum* em trabalhos prévios (Chen *et al.*, 2013), e a mutação encontrada no gene TUB do *N. dimidiatum* var. *hyalinum* tem sido relatada como exclusiva para esta mesma variedade (Madrid *et al.*, 2009). O sequenciamento de DNA do gene TUB é uma boa alternativa para a identificação molecular de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e *N. dimidiatum*, mostrando elevada identidade (100%) e *score* com amostras depositadas no banco de dados de sequência de nucleotídeos do NCBI, inclusive permitindo diferenciar entre as duas variedades descritas nesse estudo.

A combinação dos oito sítios polimórficos encontrados nos sete *loci* sequenciados dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* resultou em seis tipos de sequência (TS) em que a análise filogenética realizada acentuou a robustez desta divisão. A maioria dos isolados clínicos (64,1%) de *N. dimidiatum* foram agrupados no TS1 e 5,1%, 2,5%, 12,8% nos TSs 2, 3 e 4, respectivamente. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* representa 15,4% dos isolados clínicos e agrupados no TS5 juntos com ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*). O valor de *bootstrap* obtidos pela análise de UPGMA acentua a robustez da separação de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em um único TS (*bootstrap* de 94). O único membro do TS6 foi *N. dimidiatum* (ATCC®22190™). Em um estudo prévio foram descritos os mesmos sítios polimórficos encontrados em isolados clínicos de origem brasileira e linhagens CBS de outras regiões do mundo (Madrid *et al.*, 2009). No trabalho, os dois isolados clínicos *N. dimidiatum* var. *hyalinum* apresentam A na posição 488 pb e T em 348 pb da região ITS e gene TUB, respectivamente. Assim, a comparação das sequências deste trabalho com as linhagens CBS do estudo que apresenta diferentes isolados de diversas fontes e regiões revelou uma distribuição genotípica similar, o qual sugere um baixo grau de diversidade dos isolados circulates em todo o mundo de acordo com as sequências analisadas.

O hospedeiro mamífero apresenta um ambiente adverso para o fungo, que por sua vez precisa ser capaz de se adaptar rapidamente com o objetivo de sobreviver e proliferar (Davis, 2009). As características de produção de melanina, termotolerância e habilidade de adaptação a diferentes pHs tem sido relacionado com o potencial de virulência dos microrganismos e, portanto, são características em comum entre patógenos bem sucedidos (Nosanchuk; Casadevall, 2006; Davis, 2009; Sales-Campos *et al.*, 2013). Quando comparado com a espécie hialina *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, o maior potencial patogênico de *N. dimidiatum* é possivelmente atribuído a presença de melanina (Morris-Jones *et al.*, 2004), que em outros microrganismos afeta os macrófagos e reduz citocinas pro-inflamatórias (Ruiz-Cendoia *et al.*, 2010; Mohagheghpour *et al.*, 2000). Além disso, as vias de sensoramento de pH, adesão a célula do hospedeiro e a invasão do tecido hospedeiro pelas hifas são fatores adicionais envolvidos na patogenicidade fúngica (Gow *et al.*, 2002; Davis, 2009). Aqui, os isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* e ATCC®38907™ pertencentes ao TS5 mostraram diminuído crescimento das hifas em diferentes temperaturas e pHs, revelado pelo desenvolvimento reduzido da colônia fúngica. Assim, o desenvolvimento reduzido das hifas da variedade hialina possivelmente prejudica a invasão do tecido do hospedeiro pelo fungo, reduzindo a percentagem do estabelecimento de doenças. Portanto, além da ausência do pigmento melanina, a diminuição da curva de crescimento das hifas dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em diferentes temperaturas e pHs pode ser um fator adicional que reduz o estabelecimento da doença e uma explicação para o baixo número de isolados clínicos de *N. dimidiatum* var. *hyalinum* em nosso estudo.

O teste de sensibilidade a antimicrobianos *in vitro* é um ótimo método para avaliar a sensibilidade de microrganismos a antifúngicos. Além disso, é um valioso suporte ao clínico na decisão do tratamento adequando para cada tipo de infecção. Para o fungo filamentoso causador de micose de unha e pele, *Neoscytalidium* spp., baixos valores de CIMs são

descritos para anfotericina B (Lacroix e Chauvin, 2008). Além disso, voriconazol e terbinafina são boas alternativas para uso clínico devido às baixas CIMs encontradas (Dunn *et al.*, 2003). Na análise de sensibilidade aos antifúngicos realizada para os isolados clínicos deste trabalho foi observado que anfotericina B, voriconazol e terbinafina foram as drogas mais eficientes no teste de sensibilidade a antifúngicos tanto por *N. dimidiatum* quanto para *N. dimidiatum* var. *hyalinum* visto que nos testes *in vitro* apresentaram baixos valores de CIMs para ambos, seguida dos antifúngicos flucitosina e caspofungina. Estes resultados são suportados por estudos prévios que relacionam a alta eficácia da terapia com anfotericina B e voriconazol em modelo animal (camundongos neutropênicos) infectados com *N. dimidiatum* (Ruiz-Cendoya *et al.*, 2010). Adicionalmente, a alta atividade da terbinafina e do voriconazol encontradas neste estudo estão de acordo com relatos de sucesso de casos clínicos tratados com voriconazol e terbinafina em onicomicoses e em infecções subcutâneas causadas por *N. dimidiatum* (Sriaroon, 2008; Cursi, 2013). Os antifúngicos cetoconazol e fluconazol apresentaram *in vitro* altos valores de CIM para *N. dimidiatum*, pois, para muitos isolados estudados, em nenhuma das concentrações analisadas encontrou-se valor de CIM90. Entretanto, os mesmos dois azólicos e adicionalmente o voriconazol apresentaram valores de CIM significativamente menores para a variedade hialina *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Os mecanismos de resistência a antifúngicos azólicos já foram descritos para *Candida albicans*, entre eles a mutação na enzima lanosterol demetilase que resulta na redução da atividade da enzima, o aumento da expressão da lanosterol demetilase e produção aumentada de bomba de efluxo. Adicionalmente, Sande *et al.* (2007) descreveram a capacidade de ligação dos antifúngicos itraconazol e cetoconazol, mas não do voriconazol e fluconazol, à melanina. Rogers e Barker (2003) ainda acrescentam a importância da combinação de mecanismos para a verificação da resistência a antifúngicos azólicos. Considerando a existência de inúmeras hipóteses que justificariam

o perfil de sensibilidade encontrado aos azólicos, pode-se considerar a ausência de melanina como um dos fatores responsáveis pelo perfil de sensibilidade aumentada da variedade *N. dimidiatum* var. *hyalinum* aos azólicos. Contudo, mais estudos são necessários para a elucidação das diferenças entre as duas variedades.

O crescente aumento de resistência à terapia antifúngica convencional é em parte atribuído a especificidade da molécula de cada fármaco ao sítio de ação na célula fúngica. Assim, uma terapêutica que possui multiplicidade de alvos tem vantagem em relação a esse problema. O TFDA apresenta um amplo espectro de ação, devido à produção de EROs, principalmente oxigênio singlete, e portanto uma alternativa para inativação de fungos patogênicos. Os FSs fenotiazínicos são amplamente utilizados no TFDA, sendo MB e TBO os mais comumente estudados. Com o objetivo de aumentar a atividade antimicrobiana, novos derivados estão sendo desenvolvidos, como o NMBN e S137 que apresentam aumentado espectro de absorção e lipofilicidade (Wainwright *et al.*, 2005). Neste estudo é mostrada a eficácia do TFDA em *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* com o amplamente conhecido MB e seus derivados TBO, NMBN e S137. Apesar das diferenças no perfil de sensibilidade do TFDA entre *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, nenhuma diferença foi exibida entre os dois isolados clínicos de *N. dimidiatum* testados que apresentaram variação de pigmentação de colônia.

De acordo com os resultados de CIM, os isolados clínicos hialinos mostraram-se mais sensíveis do que os pigmentados ao TFDA com MB, NMBN, TBO e S137. Pela análise da fração de sobrevivência foi possível verificar que baixa concentração de MB, NMBN e TBO são necessárias para inibir o crescimento e matar os artroconídios de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, exceto para o S137 no qual com baixa concentração foi capaz de inibir o crescimento, mas com menor eficácia para levá-los à morte.

O composto S137 mostrou ser altamente eficaz no TFDA, uma vez que baixa concentração é necessária para inibir o crescimento dos isolados clínicos. Igualmente em outro microrganismo, *Propionibacterium acnes*, a baixa concentração deste mesmo FS foi altamente eficaz (Wainwright *et al.*, 2011, Wainwright *et al.*, 2012). Adicionalmente, menores concentrações de S137 e NMBN foram necessários para a inibição do desenvolvimento *in vitro* de microconídios dos fungos dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* (Rodrigues *et al.*, 2012b). Em comparação, concentrações mais elevadas de S137 e NMBN foram necessárias para inibir o desenvolvimento de artroconídios de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*. Existe a observação de que artroconídio de dermatófitos parecem ser mais resistentes quando comparados a microconídios em testes *in vitro* para algumas drogas (Coelho *et al.*, 2008). No entanto, para testes *in vitro* com antifúngicos azólicos os fungos não dermatófitos como *Neoscytalidium* sp. são mais refratários ao tratamento do que os fungos dermatófitos como *Trichophyton* sp. (Oyeka e Gugnani *et al.*, 1990).

As consequências do TFDA estão diretamente relacionadas a efeitos de estresse oxidativo gerados pela produção de EROs, principalmente o oxigênio singlete. Os efeitos do estresse oxidativo causado pelo TFDA no fungo foram avaliados quanto à permeabilidade da membrana celular dos artroconídios e a peroxidação lipídica. A permeabilidade da membrana de artroconídios dos isolados clínicos aumentou de acordo com o aumento da dose de luz no TFDA com os FSs MB, NMBN, TBO. Curiosamente, embora sem efeito fungicida equivalente, o FS S137 causou maior aumento da permeabilidade da membrana celular no escuro para todos os isolados testados, quando comparado aos outros FSs testados.

A peroxidação lipídica é a consequência da agressão dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas da célula fúngica causada pela presença das EROs, o qual permite a entrada destas espécies nas estruturas intracelulares. A peroxidação dos lipídios não foi observada em artroconídios de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* no TFDA

com os FSs MB e TBO. Contudo, a mesma estava presente quando os FSs NMBN e S137 foram utilizados no TFDA. Possivelmente a relação entre o FS e a ocorrência da peroxidação de lipídios se deve principalmente ao perfil lipofílico do FS, visto que o MB e o TBO apresentam baixa lipofilicidade ($\text{Log } P < 0$ - Wainwright *et al.*, 1997), e os FSs NMBN e S137 exibem uma alta lipofilicidade ($\text{Log } P > 0$ - Wainwright *et al.*, 1998, Wainwright *et al.*, 2012). Assim, apesar dos FSs MB, TBO, NMBN e S137 apresentarem similar rendimento quântico (*quantum yields* - ϕ_A) de formação de oxigênio singlete (Wainwright *et al.*, 1998, Bacellar *et al.*, 2014), não seria suficiente apenas este fator na busca de FSs mais eficientes. O alto perfil lipofílico, presente nos FSs NMBN e S137, mostra ser uma importante propriedade a ser considerada, uma vez que aqui foi evidenciada uma melhor efetividade dos mesmos na alta permeabilidade de membrana e principalmente na peroxidação dos lipídios. Como consequência, foi também observado, para os artroconídios dos isolados de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum* deste estudo, maior efeito fungicida e fungistático causado pelo TFDA com os FSs NMBN e S137, respectivamente.

CONCLUSÕES

"Nosso maior adversário está dentro de nós."

(Roberto Shinyashiki)

6. Conclusões

Algumas conclusões foram obtidas ao final dessa pesquisa:

- Pela análise de MLST da região ITS1 do rDNA e do gene TUB foi possível separar genotipicamente os isolados de *N. dimidiatum* dos isolados de *N. dimidiatum* var. *hyalinum*, ambos da região de Ribeirão Preto-SP;
- A variedade não produtora de melanina *N. dimidiatum* var. *hyalinum* apresentou menor curva de crescimento que o *N. dimidiatum* em diferentes temperaturas e pHs, tal característica pode justificar o menor número de isolados clínicos da variedade hialina neste estudo;
- Anfotericina B, voriconazol e terbinafina foram as drogas mais efetivas no teste de sensibilidade aos antifúngicos tanto para *N. dimidiatum* quanto para *N. dimidiatum* var. *hyalinum* visto que no teste *in vitro* apresentaram baixos valores de CIMs para ambos;
- *N. dimidiatum* var. *hyalinum* é mais sensível aos antifúngicos azólicos fluconazol, cetoconazol e voriconazol em comparação com a variedade demácea *N. dimidiatum*.
- *N. dimidiatum* var. *hyalinum* é mais sensível ao TFDA para todos os FSs fenotiazínicos utilizados nesses estudo;
- Os FSs NMBN e S137 mostraram-se mais efetivos ao TFDA e evidenciaram grande dano a estruturas lipídicas presentes na célula fúngica.

BIBLIOGRAFIA

“O maior líder é aquele que reconhece a sua pequenez, extrai força da sua humildade e experiência da fragilidade.”.

(Augusto Cury)

7. Referências bibliográficas

AL RUBEAI, M.; EL HASSI, M. Inactivation of wild type and mutant *Aspergillus nidulans* conidia by far-UV, visible and sun lights. **Environmental and Experimental Botany**, v. 26, p. 243-252, 1986.

ARRIEL, N. H. de C.; COSTA, M. M.; TREVISOLI, S. H. U.; DI MAURO, A. O. Outras aplicações dos Marcadores. **In: Marcadores Moleculares**. 1ª Ed. Viçosa, 2006. p. 145-204.

BACELLAR, I. O.; PAVANI, C.; SALES, E. M.; LTRI, R.; WAINWRIGHT, M.; BAPTISTA, M. S. Membrane damage efficiency of phenothiazinium photosensitizers, **Photochemistry and Photobiology**, v. 90, n. 4, p. 801-813, 2014.

BENSON, D. A.; CAVANAUGH, M.; CLARK, K.; KARSCH-MIZRACHI, I.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J. **Nucleic Acids Research**, v. 41, p. D36-42, 2013.

BRAGA, G. U.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Both solar UVA and UVB radiation impair conidial culturability and delay germination in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, p. 734-739, 2001.

BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82(2), p. 418-422, 2006.

BUENO, J. G.; MARTINEZ, C.; ZAPATA, B.; SANCLEMENTE, G.; GALLEGU, M.; MESA, A. C. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 35, n. 6, p. 658-663, 2010.

CHEN, S. F.; MORGAN, D. P.; MICHAILIDES, T. J. First Report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Death of Graft Union of English Walnut in California. **Journal Plant Disease**, v. 97, n. 7, p. 993, 2013.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F.; PHILIPS, A. J. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. **Studies in Mycology**, v. 55, p. 235-53, 2006.

CURSI, I. B.; DE FREITAS, L. B. DA C. R.; NEVES, M. DE L. P. F.; DA SILVA, I. C.; COSTA, R. O. Onychomycosis due to *Scytalidium* spp.: A clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 689-93, 2011.

CURSI, I. B.; SILVA, R. T.; SUCCI, I. B.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; OROFINO-COSTA, R. Onychomycosis due to *Neoscytalidium* treated with oral terbinafine, ciclopirox nail lacquer and nail abrasion: a pilot study of 25 patients. **Mycopathologia**, v. 175, n. 1-2, p. 75-82, 2013.

DAVEY, H. M.; AND HEXLEY, P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 163-171, 2013.

DAVISON, F. D.; MACKENZIE, D. W.; OWEN, R. J. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 118, n. 2, p. :465-470, 1980.

DAVIS, D. A. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, p. 365-370, 2009.

DOS SANTOS, D. J.; ERIKSSON, L. Permeability of psoralen derivatives in lipid membranes. **Biophysical Journal**, v. 91, p. 2464–2474, 2006.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, p. 895-900, 1993.

DOUGHERTY, T. J. HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J. PENG, Q. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, p. 889-905, 1998.

DUNN, J. J.; WOLFE, M. J.; TRACHTENBERG, J.; KRIESEL, J. D.; ORLANDI, R. R.; CARROLL, K. C. Invasive fungal sinusitis caused by *Scytalidium dimidiatum* in a lung transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p.:5817-5819, 2003.

ELINAV, H.; IZHAR, U.; BENENSON, S.; ADMON, D. GRASS, C. H.; POLACHECK, I.; KOREM, M. Invasive *Scytalidium dimidiatum* Infection in an Immunocompetent Adult. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1259–1263, 2009.

FRANKEL, D. H. AND RIPPON, J. W. Hendersonula toruloidea infection in man. **Mycopathologia**, v. 105, p. 175-186, 1989.

FRIEDBERG, J. S.; SKEMA, C.; BAUM, E. D.; BURDICK, J.; VINOGRADOV, S. A.; WILSON, D. F.; HORAN, A. D.; NACHAMKIN, I. In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, p. 105-107, 2001.

GENTLES JC, EVANS GV. Infection of the feet and nails with *Hendersonula toruloidea*. **Sabouraudia**, v. 8, p. 72-75, 1970.

GODOY, P.; REYES, E.; SILVA, V.; NUNES, F.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; ZAROR, L, ET AL. Dermatomycoses caused by *Natratassia mangiferae* in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 157, p. 273-6, 2004.

GOODMAN & GILMAN, **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 2011, 12ª edição.

GOW, N. A.; BROWN, A. J.; ODDS, F. C. Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p.366-371, 2002.

GUGNANI H. C. AND OYEKA, C. A. Foot infections due to *Hendersonula toruloidea* and *Scytalidium hyalinum* in coal miners. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 27, n. 3, p. 167-179, 1989.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 3, p. 436-450, 2004.

HARRIS, F.; CHATFIELD, L. K.; PHOENIX, D. A. Phenothiazinium based photosensitizers-photodynamic agents with a multiplicity of cellular targets and clinical applications. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 615-627, 2006.

HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does Photodynamic therapy work? **Photochemistry and photobiology**, v. 55, p. 145-157, 1992.

HOCKBERGER, P. E. A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 561-579, 2002

INDERBITZIN, P.; BOSTOCK, R.M.; TROUILLAS, F.P.; MICHAILIDES, T.J. A six locus phylogeny reveals high species diversity in Botryosphaeriaceae from California almond. **Mycologia**, v.102, n.6, p.1350-68, 2010.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, p. 505-520, 2006.

LACAZ, C. DA S.; PEREIRA, A. D.; HEINS-VACCARI, E. M.; CUCÊ, L. C.; BENATTI, C.; NUNES, R. S.; DE MELO, N. T.; DE FREITAS-LEITES, R. S.; HERNÁNDEZ-ARRIAGADA, G. L. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. Report of two cases. Review of the taxonomy of synanamorph and anamorph forms of this Coelomycete. **Revista Instituto Medicina Tropical, São Paulo**, v. 41, n. 5, p. 319-323, 1999.

LACAZ, CARLOS DA SILVA; PORTO, EDWARD; MARTINS, JOSÉ EDUARDO COSTA; HEINS-VACCARI, ELISABETH MARIA; MELO, NATALINA TAKAHASHI DE. **Tratado de Micologia Médica**, 2002

LACROIX, C.; KAC, G.; DUBERTRET, L.; MOREL, P.; DEROUIN, F.; DE CHAUVIN, M. F. Scytalidiosis in Paris, France. **Journal of the American Academic Dermatology**, v. 48, p. 852-856, 2003.

LACROIX, C.; DE CHAUVIN, M. F. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, p. 835-837, 2008.

MACHOUART-DUBACH, M.; LACROIX, C. VAURY, C; FEUILHADE DE CHAUVIN, M.; BELLANNE, C.; DEROUIN, F. ET AL. Nucleotide structure of the *Scytalidium hyalinum* and *Scytalidium dimidiatum* 18S subunit ribosomal RNA gene: evidence for the insertion of a group IE intron in the rDNA gene of *S. dimidiatum*. **FEMS Microbiology Letter**, v. 208, n. 2, p. 187-196, 2002.

- MACHOUART, M.; LACROIX, C.; BUI, H.; FEUILHADE DE CHAUVIN, M.; DEROUIN, F.; LORENZO, F. Polymorphisms and intronic structures in the 18S subunit ribosomal RNA gene of the fungi *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum*. Evidence of an IC1 intron with an His-Cys endonuclease gene. **FEMS Microbiology Letter**, v. 238, n. 2, p. 455-467, 2004.
- MACHOUART, M.; MENIR, P.; HELENON, R.; QUIST, D.; DESBOIS, N. *Scytalidium* and *Scytalidiosis*: whats new in 2012, *Journal Mycology Medical*, v. 23, n. 1, p. 40-46, 2013.
- MACMILLON, J. D.; MAXWELL, W. A.; CHICHESTER, C. O. Lethal photosensitization of microorganisms with light from a continuos-wave gas laser. **Photochemistry and Photobiology**, v. 5, p. 55-65, 1966.
- MADRID, H.; RUÍZ-CENDOYA, M.; CANO, J.; STCHIGEL, A.; OROFINO, R.; GUARRO, J. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p. 351-354, 2009.
- MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E.; MORELLI, G.; RUSSELL, J. E.; URWIN, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, J.; ZURTH, K.; CAUGANT, D. A.; FEAVERS, I. M.; ACHTMAN, M.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing a potable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 95, p. 3140-3145, 1998.
- MARQUES, M. W.; MICHEREFF, S. J.; PHILLIPS, A. J. L.; CAMARA, M. P. S. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. **Fungal Diversity**, v. 61, p. 195-208, 2013.
- MAISCH, T.; SZEIMIES, R. M.; JORI, G.; ABELS, C. Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.907-917, 2004.
- MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. **In: Biologia Molecular e evolução**. 2ª Edição, Ribeirão Preto, 2001.
- MOHAGHEGHPUR, N.; WALEH, N.; GARGER, S. J.; DOUSMAN, L.; GRILL, L. K.; TUSE, D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. **Cell Immunology**, v. 199, n. 1, p. 25-36, 2000.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; HEXTALL, J. M.; GOMEZ, B. L.; MORRIS-JONES, S. D. HAY, R. J.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D.; HAMILTON, A. J. *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produce melanin. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 8, p. 3789-3794, 2004.
- NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. **Antimicrobial agentes chemotherapy**, v. 50, n. 11, p. 3519-3528, 2006.
- OYEKA.C.A.;GUGNANI, H. C. In vitro activity of seven azole compounds against some clinical isolates of non-dermatophytic filamentous fungi and some dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 110, n. 3, p. 157-61, 1990.

PINTO, J. F da C. Epidemiologia molecular do vírus da imunodeficiência humana do tipo I: Métodos de inferência filogenética. Rio de Janeiro, 2004. 24 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA, 2004.

PHILLIPS, A. J.; ALVES, A.; ABDOLLAHZADEH, J.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; GROENEWALD, J. Z. ET AL. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. **Studies in Mycology**, v. 76, n. 1, p. 51-167, 2013.

RODRIGUES, G.B.; FERREIRA, L.K.S.; WAINWRIGHT, M.; AND BRAGA, G.U.L. Susceptibilities of the dermatophytes *Trichophyton mentagrophytes* and *T. rubrum* microconidia to photodynamic antimicrobial chemotherapy with novel phenothiazinium photosensitizers and red light. **Photochemistry and Photobiology**, v. 116, p. 89-94, 2012.

RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. BRAGA, G. U. L. In vitro photodynamic inactivation of *Cryptococcus neoformans* melanized cells with chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 440-447, 2012

ROEIJMANS, H. J.; DE HOOG, G. S.; TAN, C. S.; FIGGE, M. J. Molecular taxonomy and GC/MS of metabolites of *Scytalidium hyalinum* and *Nattrassia mangiferae* (Hendersonula toruloidea). **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 35, n. 3, p. 181-188, 1997.

ROGERS, P.D.; BARKER, K.S. Genome-Wide Expression Profile Analysis Reveals Coordinately Regulated Genes Associated with Stepwise Acquisition of Azole Resistance in *Candida albicans* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1220-1227, 2003.

RUIZ-CENDOYA, M.; MADRID, H.; PASTOR, J.; GUARRO, J. Evaluation of antifungal therapy in a neutropenic murine model of *Neoscytalidium dimidiatum* infection. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 35, n. 2, p. 152-155, 2010.

SAKALIDIS, M. L.; HARDY, G. E.; BURGESS, T. I. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. **Fungal Ecology**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2011.

SALES-CAMPOS, H.; TONANI, L.; CARDOSO, C. R.; KRESS, M. R. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. **BioMed research international**, 2013.

SAMBROOK J AND RUSSELD. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANDE, W. W. J.; DE KAT, J.; COPPENS, J.; AHMED, A. O. A.; FAHAL, A.; VERBRUGH, H.; VAN BELKUM, A. Melanin biosynthesis in *Madurella mycetomatis* and its effect on susceptibility to itraconazole and ketoconazole. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1114-1123, 2007.

SCHIAVE, L. A.; PEDROSO, R. S.; CANDIDO, R. C.; ROBERTS, D. W.; BRAGA, G. U. L. Variability in UVB tolerances of melanized and nonmelanized cells of *Cryptococcus neoformans* and *C. laurentii*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 205-213, 2009.

SHARMA, S. K.; MROZ, P.; DAI, T.; HUANG, Y. Y.; ST DENIS, T. G.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference? **Israel Journal of Photochemistry**, v. 52, n. 8-9, p. 691-705, 2012.

SHIMIZU, M.; EGASHIRA, T.; TAKAHAKA, U. Inactivation of *Neurospora crassa* conidia by singlet molecular oxygen generated by a photosensitized reaction. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 293-296, 1979.

SMIJS, T. G.; VAN DER HASS, R. N.; LUGTENBURG, J.; LIU, H.; DE JONG, R. L.; SCHUITMAKER, H. J. Photodynamic treatment of the dermatophyte *Trichophyton rubrum* and its microconidia with porphyrin photosensitizers. **Photochemistry and Photobiology**, v. 80, p. 197-202, 2004.

SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S.; MILLIGAN, B. G. Infraespecific Chloroplast DNA Variation: Systematic and Phylogenetic Implications. **In: Molecular Systematics of Plants**. New York, v. p. 117-150, 1992.

SOUKOS, N. S.; FYVIE, L. A. X.; HAMBLIN, M. R.; SOCRANSKY, S. S.; HASAN, T. Targeted antimicrobial photochemotherapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2595-2601, 1998.

SRIAROON, C.; VINCENT, A. L.; SILAPUNT, S.; CHANDLER, A.; HOUSTON, S. H.; GREENE, J. N. Successful treatment of subcutaneous *Scytalidium hyalinum* infection with voriconazole and topical terbinafine in a cardiac transplant patient. **Transplantation**, v. 85, n. 5, p. 780-782, 2008.

SUTTON, B.C. AND B.J. DYKO. Revision of *Hendersonula*. **Mycology Research**, v. 93, p. 466-488, 1989.

TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v. 30, n.12, p.2725-2729, 2013.

XAVIER, A. P. M.; DE OLIVEIRA, J. C.; RIBEIRO, V. L. DA S.; SOUZA, M. A. J. Epidemiological aspects of patients with ungual and cutaneous lesions caused by *Scytalidium* spp. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 85, n. 6, p.805-810, 2010.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, p. 351-359, 1996.

WAINWRIGHT, M.; PHOENIX, D. A.; RICE, L.; BURROW, S. M.; WARING, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 40, v. 3, p. 233-239, 1997.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 13-28, 1998.

WAINWRIGHT, M. Methylene blue derivatives-suitable photoantimicrobials for blood product disinfection? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.16, p. 381-394, 2000.

WAINWRIGHT, M. The development of phenothiazinium photosensitisers. **Photodiagnosis an photodynamic therapy**, v. 2, n. 4, p. 263-272, 2005.

WAINWRIGHT, M.; MEEGAN, K.; LOUGHRAN, C. Phenothiazine photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents, **Dyes and Pigments**, v. 91, p. 1-5, 2011.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic medicine and infection control. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 787-788, 2012.

WAYNE. CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; 346 approved standard-third edition, CLSI document M27-A3.: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICES

APÊNDICE I: Tabela de identificação molecular dos isolados clínicos de *N. dimidiatum* e *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.

Isolado clínico	Linhagem Cód. de acesso	BLAST Isolado	Identidade (%)	E-value	Max. score	Número de base	Query cover (%)
LMC 301.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 302.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 303.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 304.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 305.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 305.02	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 305.03	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 306.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 307.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 308.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 309.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 310.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 311.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 312.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 313.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i> *	100	0,0	688	372	100
LMC 314.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 315.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 316.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 317.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 318.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 319.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 320.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 321.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 321.02	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 321.03	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 321.04	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 321.05	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 322.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 322.02	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 322.03	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 323.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 324.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 324.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 324.02	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 325.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 325.01	FM211164.1	<i>N. dimidiatum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 326.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 401.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 402.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	100	0,0	688	372	100
LMC 403.01	FM211162.1	<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hyalinum</i>	100	0,0	688	372	100

APÊNDICE II – Identificação das sequências depositadas no *GenBank*.

Isolado clínico	Número de acesso no <i>GenBank</i>						
	ITS1	ITS2	EF1	TUB	HH3	CHS	GPD
LMC 301.01	KM585817	KM585854	KM586002	KM585965	KM585780	KM585891	KM585928
LMC 302.01	KM585818	KM585855	KM586003	KM585966	KM585781	KM585892	KM585929
LMC 303.01	KM585819	KM585856	KM586004	KM585967	KM585782	KM585893	KM585930
LMC 304.01	KM585820	KM585857	KM586005	KM585968	KM585783	KM585894	KM585931
LMC 305.01	KM585821	KM585858	KM586006	KM585969	KM585784	KM585895	KM585932
LMC 305.02	KM585822	KM585859	KM586007	KM585970	KM585785	KM585896	KM585933
LMC 305.03	KM585823	KM585860	KM586008	KM585971	KM585786	KM585897	KM585934
LMC 306.01	KM585824	KM585861	KM586009	KM585972	KM585787	KM585898	KM585935
LMC 307.01	KM585825	KM585862	KM586010	KM585973	KM585788	KM585899	KM585936
LMC 308.01	KM585826	KM585863	KM586011	KM585974	KM585789	KM585900	KM585937
LMC 309.01	KM585827	KM585864	KM586012	KM585975	KM585790	KM585901	KM585938
LMC 310.01	KM585828	KM585865	KM586013	KM585976	KM585791	KM585902	KM585939
LMC 311.01	KM585829	KM585866	KM586014	KM585977	KM585792	KM585903	KM585940
LMC 312.01	KM585830	KM585867	KM586015	KM585978	KM585793	KM585904	KM585941
LMC 313.01*	KM585831	KM585868	KM586016	KM585979	KM585794	KM585905	KM585942
LMC 314.01	KM585832	KM585869	KM586017	KM585980	KM585795	KM585906	KM585943
LMC 315.01	KM585833	KM585870	KM586018	KM585981	KM585796	KM585907	KM585944
LMC 316.01	KM585834	KM585871	KM586019	KM585982	KM585797	KM585908	KM585945
LMC 317.01	KM585835	KM585872	KM586020	KM585983	KM585798	KM585909	KM585946
LMC 318.01*	KM585836	KM585873	KM586021	KM585984	KM585799	KM585910	KM585947
LMC 319.01	KM585837	KM585874	KM586022	KM585985	KM585800	KM585911	KM585948
LMC 320.01	KM585838	KM585875	KM586023	KM585986	KM585801	KM585912	KM585949
LMC 321.01	KM585839	KM585876	KM586024	KM585987	KM585802	KM585913	KM585950
LMC 321.02	KM585840	KM585877	KM586025	KM585988	KM585803	KM585914	KM585951
LMC 321.03	KM585841	KM585878	KM586026	KM585989	KM585804	KM585915	KM585952
LMC 321.04	KM585842	KM585879	KM586027	KM585990	KM585805	KM585916	KM585953
LMC 321.05	KM585843	KM585880	KM586028	KM585991	KM585806	KM585917	KM585954
LMC 322.01	KM585844	KM585881	KM586029	KM585992	KM585807	KM585918	KM585955
LMC 322.02	KM585845	KM585882	KM586030	KM585993	KM585808	KM585919	KM585956
LMC 322.03	KM585846	KM585883	KM586031	KM585994	KM585809	KM585920	KM585957
LMC 323.01	KM585847	KM585884	KM586032	KM585995	KM585810	KM585921	KM585958
LMC 324.01	KM585848	KM585885	KM586033	KM585996	KM585811	KM585922	KM585959
LMC 324.01	KM585849	KM585886	KM586034	KM585997	KM585812	KM585923	KM585960
LMC 324.02	KM585850	KM585887	KM586035	KM585998	KM585813	KM585924	KM585961
LMC 325.01	KM585851	KM585888	KM586036	KM585999	KM585814	KM585925	KM585962
LMC 326.01*	KP698694	KP698698	KP698682	KP698702	KP698690	KP698678	KP698686
LMC 401.01*	KP698695	KP698699	KP698683	KP698703	KP698691	KP698679	KP698687
LMC 402.01*	KP698696	KP698700	KP698684	KP698704	KP698692	KP698678	KP698688
LMC 403.01*	KP698697	KP698701	KP698685	KP698705	KP698693	KP698681	KP698689

ITS1 e ITS2, *internal transcribed spacer region* 1 e 2; EF-1, fator de alongamento de cadeia 1 α ; TUB, β -tubulina; HH3, histona H3; CHS, quitina sintase; GPD, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

>Seq11T [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC309.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC309.01, beta-tubulin gene, partial cds.

[illegible]

CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTACCGTTCCCGAGCTACCCAGCAGATGTTCGACCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTGCGAG

GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCCATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq33T [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC324.02] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC324.02, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCCATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq34T [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC324.03] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC324.03, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCCATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq35T [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC325.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC325.01, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCCATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq36T [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=ATCC22190] Neoscytalidium dimidiatum, strain ATCC22190, beta-
tubulin gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTC
TGCTCCATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq37T [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=ATCC38907] Neoscytalidium hyalinum, strain ATCC38907, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCTATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq38T [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC326.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC326.01, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCTATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq39T [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC401.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC401.01, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCTATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq40T [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC402.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC402.01, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCTATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq41T [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC403.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC403.01, beta-tubulin
gene, partial cds.
CCTGCGCAAGCTTGCCGTCAACATGGTTCCCTTTCCCTCGTCTCCACTTCTTCATGGTGGGCTTCGCTCCTCTGACCAGC
CGTGGCGCCCACTCTTTCCGCGCCGTCACCGTTCCCGAGCTCACCAGCAGATGTTTCGACCCCCAAGAACATGATGGCT
GCTTCTGACTTCCGCAACGGCCGCTACCTCACCTGCTCCGCCATCTTCCGCGGTAAGGTCTCGATGAAGGAGGTCGAG
GACCAGATGCGCAACGTCCAGAACAAGAACTCGTCCTACTTCGTTGAGTGGATCCCCAACAAACGTCCAGACCGCCCTT
TGCTCTATTCTCCTCGTGGCCTCAAGATGTCGTCGACTTTCGTCGGCAACTCGACCTC
>Seq1C [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC301.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC301.01, chitin
synthase 1 gene, partial cds.
GAGCCGTTCTGGCTGGTCTGGGTGTCTACCAGGACGGCATCGCCAAGCAGCAGGTCAACGGCAAGGAGGTACGGCG
CACGTTTACGAGGTTGGTATCTTGAATACGCTCTACTCCGCAAACGCTAATAAACAGCAGTACACCACTCAGATGAG
CTTGAAATCAAGAAAGGTATCGTCAACGTCAAGAAAGGCAATACTCCAATTCAGATGCTTTTCTGTTTGAAGGA
>Seq2C [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC302.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC302.01, chitin
synthase 1 gene, partial cds.
GAGCCGTTCTGGCTGGTCTGGGTGTCTACCAGGACGGCATCGCCAAGCAGCAGGTCAACGGCAAGGAGGTACGGCG
CACGTTTACGAGGTTGGTATCTTGAATACGCTCTACTCCGCAAACGCTAATAAACAGCAGTACACCACTCAGATGAG
CTTGAAATCAAGAAAGGTATCGTCAACGTCAAGAAAGGCAATACTCCAATTCAGATGCTTTTCTGTTTGAAGGA

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq32E [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC324.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC324.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq33E [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC324.02] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC324.02, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq34E [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC324.03] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC324.03, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq35E [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC325.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC325.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCAATCAGATGCTAACCGACACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq36E [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=ATCC22190] Neoscytalidium dimidiatum, strain ATCC22190, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq37E [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=ATCC38907] Neoscytalidium hyalinum, strain ATCC38907, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq38E [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC326.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC326.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq39E [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC401.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC401.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq40E [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC402.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC402.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq41E [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC403.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC403.01, elongation factor 1 alpha gene, partial cds.

CACCACTGCACGTGTGCTGGGTTTCCTGCGCCGAATTTGCCTTATCGCTTGGGTGAGGGGCATTTTGGTGGTGGGGTTG
GCCCCGCGTAGGCCTCGTTTCGGTCTTCGGCAAAATCTCCGCATCAGGATTTTTTTCGACCGGCGTGCACCGACACGC
GCCTCTAGCGTCGCTTGCAGCCACTCACGTCCGCCCGCGCATCAGATGCTAACCGCCACCATAACAGGAAGCCGCT
GAACTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGT

>Seq1G [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC301.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC301.01, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds.

CGACCCCTTCATCGAGCCCAAGTATGCTGTATGTGCACCACAACCATGAAACACGGGCTAGAGCGGCGCCTAGCAGC
CTGCTCGGGAAGGTGGAGGCGGATGGCTAATCGCTGCACCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCACGGT
CAGTTCAAGGGTGAGGTCAAGGTTGACGGTCAGGACCTGACCGTCAACGGCAAGAGGGTCCGCTTCTACCAGGAGCG
CGACCCCGCAACATCCCCCTGGGC

>Seq2G [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC302.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC302.01, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds.

CGACCCCTTCATCGAGCCCAAGTATGCTGTATGTGCACCACAACCATGAAACACGGGCTAGAGCGGCGCCTAGCAGC
CTGCTCGGGAAGGTGGAGGCGGATGGCTAATCGCTGCACCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCACGGT
CAGTTCAAGGGTGAGGTCAAGGTTGACGGTCAGGACCTGACCGTCAACGGCAAGAGGGTCCGCTTCTACCAGGAGCG

>Seq15G [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC313.01] Neoscytalidium hyalinumstrain LMC313.01, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds.

[illegible]

[illegible]

CAGTTCAAGGGTGAGGTCAAGGTTGACGGTCAGGACCTGACCGTCAACGGCAAGAGGGTCCGCTTCTACCAGGAGCG
CGACCCCGCCAACATCCCCCTGGGC

>Seq41G [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC403.01] Neoscytalidium hyalinum, strain LMC403.01, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, partial cds.

CGACCCCTTCATCGAGCCCAAGTATGCTGTATGTGCACCACAACCATGAAACACGGGCTAGAGCGGCGCCTAGCAGC
CTGCTCGGGAAGGTGGAGGCGGATGGCTAATCGCTGCACCACAGGCCTACATGCTCAAGTACGACTCCACCCACGGT
CAGTTCAAGGGTGAGGTCAAGGTTGACGGTCAGGACCTGACCGTCAACGGCAAGAGGGTCCGCTTCTACCAGGAGCG
CGACCCCGCCAACATCCCCCTGGGC

>Seq1h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC301.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC301.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq2h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC302.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC302.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq3h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC303.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC303.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq4h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC304.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC304.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq5h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC305.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq6h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.02] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC305.02, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq7h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.03] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC305.03, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq8h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC306.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC306.01, Histone H3 gene, partial CDs.

GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAGATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGCTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGCTCTGCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTCAACATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq9h [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC307.01] Neoscytalidium dimidiatum, strain LMC307.01, Histone H3 gene, partial CDs.

[illegible]

[illegible]

[illegible]

TCGGTGTCTGTCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTACCATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTCGCATTACTAACGGTATTGTAG
>Seq38h [organism=Neosectyaldium hyalinum] [strain=LMC326.01] Neosectyaldium hyalinum, strain LMC326.01, Histone H3 gene,
partial CDs.
GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAAATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGTCTGTCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTACCATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTCGCATTACTAACGGTATTGTAG
>Seq39h [organism=Neosectyaldium hyalinum] [strain=LMC401.01] Neosectyaldium hyalinum, strain LMC401.01, Histone H3 gene,
partial CDs.
GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAAATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGTCTGTCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTACCATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTCGCATTACTAACGGTATTGTAG
>Seq40h [organism=Neosectyaldium hyalinum] [strain=LMC402.01] Neosectyaldium hyalinum, strain LMC402.01, Histone H3 gene,
partial CDs.
GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAAATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGTCTGTCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTACCATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTCGCATTACTAACGGTATTGTAG
>Seq41h [organism=Neosectyaldium hyalinum] [strain=LMC403.01] Neosectyaldium hyalinum, strain LMC403.01, Histone H3 gene,
partial CDs.
GCGCGCTGTTGCAACACCGCCACCTCACCTCACGTTTACCTCCGCAACCCGCTGACTCAGCATCACAGGCAAGTCCAC
TGGTGGCAAGGCCCCCTCGTAAGGCCCTCGCCTCTAAGGCCGCTCGCAAGTCGGCTCCCTCTACCGGTGGTGTCAAGA
AGCCCCACCGCTACAAGCCTGGCACCGTCGCCCTCCGTGAGATCCGTCGCTACCAGAAGTCCACCGAGCTTCTCATCC
GCAAGTTGCCCTTCCAGCGTCTTGTTCGTGAAATTGCCAGGACTTCAAGTCGGACCTCCGTTCCAGTCTTCTGCCA
TCGGTGTCTGTCAGGAGTCCGTTGAGGCTTACCTCGTCTCGCTGTTTCGAGGACACCAACCTTTGCGCCATCCACGCCA
AGCGTGTACCATCCGTAAGCCACCTGAACCATGCCATCAGATATTCGCATTACTAACGGTATTGTAG

>Seq1I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC301.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq2I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC302.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq3I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC303.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq4I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC304.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq5I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC305.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq6I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC305.02] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq7I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC305.03] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC
>Seq8I1 [organism=Neosectyaldium dimidiatum] [strain=LMC306.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA
gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCCGCCAGAGGACCATCGAACTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC

[illegible]

[illegible]

>Seq391I [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC401.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATCAAACCTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC

>Seq401I [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC402.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATCAAACCTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC

>Seq411I [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC403.01] [region=internal transcribed spacer 1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence]
ATCCTCCCACCCCTTTGTGTACCCACCTCTGTTGCTTTGGCGGGCCGCGGTCCTCCGCGGCCGCCCTCCGTCCGGGGGG
TGGCCAGCGCCCGCCAGAGGACCATCAAACCTCCGGTCAGTGAACGTTGCCGTCTGAAAAACAATCAATAAACTAAAAAC
TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGC

>Seq1I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC301.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq2I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC302.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq3I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=3] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq4I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC304.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq5I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq6I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.02] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq7I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC305.03] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq8I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC306.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq9I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC307.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq10I2 [organism=Neoscytalidium dimidiatum] [strain=LMC308.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGGACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

[illegible]

[illegible]

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq37I2 [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=ATCC38907] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq38I2 [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC326.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq39I2 [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC401.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq40I2 [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC402.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

>Seq41I2 [organism=Neoscytalidium hyalinum] [strain=LMC403.01] [map=Internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence].

AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTCGGTATTCCGAGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCAT
TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGGTGTTGGGCACCGCCCTTCCGCGGGCGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCGTCTT
GCCTCGAGCGTAGTAGAAAAACACCTCGCTTTGGAGCGCACGGCGCCGCCCGCCGACGAACCTTTTGAACCTTTCTCAA
GGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA

APÊNDICE IV: Diâmetros das colônias dos isolados clínicos (cm) de acordo com o tempo de crescimento. Crescimento acompanhado a 28 e 37 °C sob leitura de 12 em 12 h.

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo de desenvolvimento (h)						
		0	12	24	36	48	60	72
LMC 301.01	28	0±0	0,50±0	0,96±0,09	2,80±0,2	5,27±0,12	8,15±0,35	10,52±0,32
	37	0±0	0,50±0	1,93±0,12	5,07±0,06	8,47±0,15	12±0,26	14,07±0,14
LMC 302.01	28	0±0	0,50±0	0,9±0,1	2,47±0,06	4,4±0,1	6,4±0,36	8,9±0,53
	37	0±0	0,50±0	1,75±0,07	4,70±0	7,3±0,14	10,2±0,28	12,95±0,07
LMC 303.01	28	0±0	0,50±0	0,90±0	2,67±0,12	4,93±0,06	7,43±0,23	9,6±0,31
	37	0±0	0,50±0	2,13±0,06	5,02±0,08	8,1±0,44	11,1±0,21	13,53±0,21
LMC 304.01	28	0±0	0,50±0	0,90±0	2,67±0,16	5,37±0,15	8,00±0,38	10,47±0,25
	37	0±0	0,50±0	1,82±0,03	4,87±0,12	8,30±0,28	11,65±0,35	14,10±0
LMC 305.01	28	0±0	0,5±0	1,6±0	4,6±0,14	7,6±0,28	10,7±0,42	13,8±0,7
	37	0±0	0,5±0	2,2±0	5,25±0,35	8,7±0	11,5±0,7	13,9±0,28
LMC 305.02	28	0±0	0,5±0	1,9±0	4,98±0,1	7,8±0,14	11±0	13,85±0,21
	37	0±0	0,5±0	2,22±0,21	5,3±0	7,9±0	10,65±0,5	13±0,28
LMC 305.03	28	0±0	0,50±0	1,25±0,09	3,30±0	5,73±0,06	8,37±0,15	11,47±0,45
	37	0±0	0,50±0	2,37±0,08	5,30±0	8,33±0,06	11,30±0	14,03±0,06
LMC 306.01	28	0±0	0,50±0	0,80±0	2,38±0,03	4,67±0,15	6,77±0,12	9,30±0,2
	37	0±0	0,50±0	2,07±0,06	5,25±0,15	8,03±0,35	10,87±0,51	13,62±0,66
LMC 307.01	28	0±0	0,50±0	0,9±0,04	2,75±0,15	4,97±0,21	7,72±0,39	10,00±0,3
	37	0±0	0,50±0	1,87±0,06	4,90±0,15	8,20±0,44	11,40±0,36	13,70±0,25
LMC 308.01	28	0±0	0,50±0	0,90±0,1	2,63±0,32	4,67±0,4	6,70±0,26	8,90±0,17
	37	0±0	0,50±0	2,23±0,1	5,3±0	8,4±0	11,23±0,25	13,82±0,2
LMC 309.01	28	0±0	0,5±0	1,58±0,03	4,48±0,04	7,2±0,14	10,05±0,07	12,65±0,21
	37	0±0	0,5±0	2,15±0,07	5,45±0,07	8,4±0,42	11,5±0,14	14,1±0,28
LMC 310.01	28	0±0	0,50±0	0,90±0,1	3,01±0,16	5,11±0,18	7,91±0,14	10,33±0,29
	37	0±0	0,50±0	2,21±0,08	5,33±0,31	7,78±0,14	10,71±0,63	13,73±0,15
LMC 311.01	28	0±0	0,5±0	1,6±0,14	4,73±0,15	7,87±0,12	10,87±0,41	13,7±0,46
	37	0±0	0,5±0	2,11±0,05	5,53±0,06	8,6±0,25	10,87±0,41	14,06±0,06
LMC 312.01	28	0±0	0,50±0	0,86±0,06	2,33±0,06	4,38±0,08	6,88±0,1	9,23±0,12
	37	0±0	0,50±0	1,78±0,10	4,76±0,38	7,23±0,58	10,66±0,76	13,26±0,46
LMC 313.01	28	0±0	0,50±0	0,53±0,03	1,07±0,06	1,80±0,1	3,02±0,08	4,25±0,15
	37	0±0	0,50±0	0,53±0,03	0,73±0,06	0,80±0,10	1,28±0,41	1,85±0,69
LMC 314.01	28	0±0	0,50±0	1,05±0,09	2,93±0,33	5,37±0,46	7,53±0,4	10,13±0,23
	37	0±0	0,50±0	2,13±0,03	5,50±0	8,23±0,12	10,90±0,1	13,73±0,21
LMC 315.01	28	0±0	0,5±0	1,8±0	5,05±0,32	7,85±0,21	11,05±0,21	13,45±0,07
	37	0±0	0,5±0	2,2±0,07	5,5±0	8,65±0,07	11,6±0,14	14,3±0
LMC 316.01	28	0±0	0,50±0	0,78±0,02	2,5±0	4,55±0,05	7,03±0,06	9,18±0,29
	37	0±0	0,50±0	1,96±0,06	5,31±0,08	7,88±0,08	11,2±0,26	13,9±0
LMC 317.01	28	0±0	0,5±0	1,45±0,07	4,45±0,07	7,05±0,25	9,95±0,07	12,45±0,21
	37	0±0	0,5±0	2,03±0,04	5,3±0	8,3±0,14	11,2±0,14	13,8±0,42
LMC 318.01	28	0±0	0,50±0	0,55±0	1,03±0,06	1,8±0	2,76±0,06	3,76±0,06
	37	0±0	0,50±0	0,53±0,03	0,93±0,12	1,56±0,12	2,66±0,12	3,6±0,14
LMC 319.01	28	0±0	0,5±0	1,25±0	3,9±0,1	5,9±0,14	11,7±0	12,2±0,21
	37	0±0	0,5±0	1,8±0,08	4,85±0,31	7,5±0,14	11,4±0,63	13,5±0,15

Amostra	Temperatura (°C)	Tempo de desenvolvimento (h)						
		0	12	24	36	48	60	72
LMC 320.01	28	0±0	0,5±0	1,25±0	4,4±0,32	7,1±0,21	11,9±0,21	13,3±0,07
	37	0±0	0,5±0	1,8±0,04	5,2±0	8,4±0,14	10,8±0,14	13,9±0,42
LMC 321.01	28	0±0	0,5±0	1,2±0	4±0	6,5±0	10,6±0	13,2±0
	37	0±0	0,5±0	1±0	3,5±0	5,9±0	10,8±0	11,6±0
LMC 321.02	28	0±0	0,5±0	1,3±0	4,3±0	6,8±0	10,9±0	12,4±0
	37	0±0	0,5±0	1,9±0	5,1±0,32	7,8±0,21	11±0,21	13,5±0,07
LMC 321.03	28	0±0	0,5±0	1,25±0	4±0,32	6,7±0,21	11,2±0,21	13,1±0,07
	37	0±0	0,5±0	1,7±0	5,1±0	8,1±0	12±0	13,2±0
LMC 321.04	28	0±0	0,5±0	1,3±0	3,9±0	6,3±0	9,5±0	12,3±0
	37	0±0	0,5±0	2,2±0	5,5±0	8,3±0	11,5±0	14±0
LMC 321.05	28	0±0	0,5±0	1,25±0	3,9±0	6,3±0	9,3±0	12,2±0
	37	0±0	0,5±0	2,2±0	5,5±0	8,7±0	11,8±0	14,3±0
LMC 322.01	28	0±0	0,5±0	1,25±0	3,9±0,1	6,3±0,14	9,3±0	12,2±0,21
	37	0±0	0,5±0	2,2±0	5,5±0	8,7±0	11,8±0	14,3±0
LMC 322.02	28	0±0	0,5±0	1,3±0	4,1±0	6,4±0	9,2±0	12,2±0
	37	0±0	0,5±0	2±0,5	5,2±0,6	8,2±0,25	11,5±0,41	14,1±0,06
LMC 322.03	28	0±0	0,5±0	1,25±0	3,9±0,1	6,6±0,14	9,5±0	12,4±0,21
	37	0±0	0,5±0	2,1±0	4,2±0	8,3±0	11,7±0	14,3±0
LMC 323.01	28	0±0	0,5±0	1,2±0	3,4±0	6,5±0	9,3±0	12,5±0
	37	0±0	0,5±0	2,3±0	4,6±0	8,2±0	11,2±0	14,2±0
LMC 324.01	28	0±0	0,5±0	1,45±0	4,4±0	6,8±0	9,5±0	12,3±0
	37	0±0	0,5±0	2,1±0	5,2±0	8,1±0	11,5±0	14±0
LMC 324.02	28	0±0	0,5±0	1,3±0,04	4,1±0	6,8±0,13	10,7±0,14	13,5±0,4
	37	0±0	0,5±0	2±0	5,5±0	8,5±0	11,2±0	14±0
LMC 324.03	28	0±0	0,5±0	1,2±0	4,3±0	6,8±0	11,6±0	12,7±0
	37	0±0	0,5±0	1,4±0,03	4,1±0	7,4±0,12	11,7±0,1	13,1±0,21
LMC 325.02	28	0±0	0,5±0	1,25±0	3,6±0	6,2±0	11,1±0	13±0
	37	0±0	0,5±0	1,9±0,05	5,2±0	8±0,25	11,2±0,41	13,7±0,06
LMC 326.01	28	0±0	0,5±0	0,55±0	1,03±0,06	1,8±0	2,77±0,06	3,77±0,06
	37	0±0	0,5±0	0,53±0,03	0,93±0,12	1,57±0,12	2,67±0,12	5,4±0,14
LMC 401.01	28	0±0	0,5±0	0,55±0	0,85±0,06	1,05±0	1,75±0,05	2,15±0,06
	37	0±0	0,5±0	0,5±0	0,80±0,12	1,05±0,12	1,8±0	2,10±0,14
LMC 402.01	28	0±0	0,5±0	0,5±0	1,03±0,2	1,95±0	2,77±0,2	4,3±0
	37	0±0	0,5±0	0,5±0	0,93±0,15	1,6±0	2,67±0,2	3,5±0
LMC 403.01	28	0±0	0,5±0	0,55±0	0,75±0	1,25±0,1	2,3±0,1	3,10±0
	37	0±0	0,5±0	0,5±0	0,93±0,15	1,75±0,1	2±0	3,0±0
<i>N. dimidiatum</i>	28	0±0	0,5±0	0,5±0	0,8±0	1±0	1,2±0	1,6±0
ATCC®22190™	37	0±0	0,5±0	0,5±0	0,5±0	0,7±0	0,9±0	1,2±0
<i>N. dimidiatum</i> var. <i>hialinum</i>	28	0±0	0,5±0	0,65±0	1,3±0	2,3±0	3,3±0	4,5±0
ATCC®38907™	37	0±0	0,5±0	0,55±0	0,7±0	1,2±0	1,85±0	2,6±0

°C, graus Célsius; ATCC, *American Type Collection Culture*; cm, centímetros; LMC, Laboratório de Micologia Clínica; h, hora

APÊNDICE V: Manuscrito submetido à *Mycoses*, intitulado: “Antifungal susceptibility and molecular features of *Neoscytalidium dimidiatum* isolated from skin and nail infections”

Antifungal susceptibility and molecular features of *Neoscytalidium dimidiatum* isolated from skin and nail infections

Ludmilla Tonani^{1,2}, Natália Silva Morosini¹, Maria Emília Nadaletto Bonifácio da Silva¹, Marcia Regina von Zeska Kress^{1,*}

¹*Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil,* ²*Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP Brazil.*

*Corresponding author: *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/n, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, 14040-903. Tel. (+55) 16 3315 0240, E-mail address: kress@fcfrp.usp.br*

Keywords: Multilocus sequence typing, Antifungal Susceptibility Testing, *Neoscytalidium dimidiatum*, *Neoscytalidium dimidiatum* var. *hyalinum*, phylogeny.

ABSTRACT

Neoscytalidium dimidiatum and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates from confirmed cases of onychomycosis and superficial infection mimicking dermatophytosis were analyzed with respect to multilocus phylogeny and *in vitro* antifungal susceptibility to seven different antifungal agents. Additionally, this work shows *in vitro* that *N. dimidiatum* var. *hyalinum* has a reduced capacity to develop in different temperatures and pHs in comparison with the dematiaceous isolates of *N. dimidiatum*, features which possibly reduce the establishment of disease. The combination of the eight polymorphic sites found in the multilocus phylogeny (sequencing of internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2 regions of ribosomal DNA and partial sequence of five housekeeping genes) revealed six different sequence types (ST1 to ST6). *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates which produce hyaline arthroconidia and hyphae were clustered together in the same ST and *N. dimidiatum* clinical isolates were distributed in the other five STs. Amphotericin B, voriconazole and terbinafine were the most effective drugs against all clinical isolates. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates have shown lower minimum inhibitory concentration for voriconazole, fluconazole and ketoconazole in comparison with *N. dimidiatum*.

1. Introduction

Neoscytalidium dimidiatum is a dematiaceous keratinophilic non-dermatophyte mould known as a plant pathogen which is also able to cause chronic superficial skin lesions and onychomycosis [1]. Additionally, cases of subcutaneous and invasive infections have been reported in immunocompromised patients [2]. Since the first description of this fungus by Nattrass (1933), the nomenclature status has been changing. In a taxonomic revision of the *Botryosphaeriaceae*, Crous *et al.* [3] proposed *Neoscytalidium dimidiatum*, which produces a dark-brown (pigmented) arthroconidia and hyphae, with the homotypic synonyms *Scytalidium dimidiatum* and *Fusicoccum dimidiatum* and the heterotypic synonym *Hendersonula toruloidea* Nattrass. *N. dimidiatum* is phylogenetically indistinguishable from the hyaline fungus *Scytalidium hyalinum* that was suggested as a variety of *N. dimidiatum* [4]. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* has not so far been isolated from the environment and is directly related to human superficial infections [5-7]. Only two cases of subcutaneous infection attributed to the hyaline variant have been described [8, 9].

Genetic relationship studies between *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* have described different restriction patterns of rDNA among *N. dimidiatum* isolates, and additionally, an identical pattern among *N. dimidiatum* var. *hyalinum* and two isolates of *N. dimidiatum* [10]. The sequencing of the 18S subunit of rRNA identified a single nucleotide polymorphism, with guanine in the *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates and adenine or guanine among *N. dimidiatum* isolates [11]. Madrid *et al.* [4] detected seven polymorphic sites by partially sequencing four loci (the β -tubulin (TUB) and the chitin synthase genes and the ITS regions and D1/D2 domain of the 28S rRNA gene) of *N. dimidiatum* isolates from different geographical origins. Five sequence types (ST) were determined by the combined analysis of the polymorphic

sites, in which two STs were found in isolates from plants, another two were detected in clinical isolates and one from both a human source and a mango tree [4]. For the purpose of early clinical diagnosis, the multicopy rDNA is the main target adopted in panfungal PCR assay due the high sequence conservation of 5.8S, 18S and 28S rDNA regions and high variability of ITS regions [12].

Due to increased resistance of *N. dimidiatum* to some drugs compared to dermatophytes, it is necessary to determine the fungal agents and their prevalence for successful treatment. Currently, few are described in the literature on the *in vitro* sensitivity of different isolates of *N. dimidiatum* to antifungal drugs. It is known that the minimum inhibitory concentration (MIC) values for azoles are greater for non-dermatophyte fungi such as *N. dimidiatum*, than for dermatophytic fungi [13]. Low MICs for amphotericin B and voriconazole are described for *N. dimidiatum*, which justifies their extensive clinical indication to intravenous administration for systemic infections or topical application for onychomycosis [14]. Anidulafungin, an echinocandin, also showed lower MICs against this species [4]. Furthermore, the activity of other antifungal drugs such as posaconazole, caspofungin, micafungin and terbinafine varies with the clinical isolate [14]. Additionally, *Neoscytalidium* spp. are *in vivo* refractory to the most topical and systemic antifungal used in dermato-mycology [7, 15, 16].

The aim of this study was to obtain additional information about *N. dimidiatum* and the differences among *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates. For this, a collection of clinical isolates of *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* from confirmed cases of onychomycosis and superficial skin infection mimicking dermatophytosis were studied regarding genotyping, phylogeny, fungal growth under different pHs and temperatures, and *in vitro* antifungal susceptibility.

2. Material and methods

2.1. Fungal clinical isolates and media cultures

N. dimidiatum and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* were analyzed in this study among a total of 39 clinical isolates from skin and toenail scrapings. The clinical isolates were obtained from 29 patients, in which four patients have had multiple positive samples (Table 1). All clinical isolates were obtained from the 'Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP' from 2004 to 2014 and isolated from patients residing in Ribeirão Preto (Brazil) and neighboring cities. The microorganisms were isolated by culturing scrapes of the foot and/or toenail on both Sabouraud Dextrose Agar (SDA) with chloramphenicol and SDA with chloramphenicol and cycloheximide media cultures. Cultures were incubated at 28 °C and examined twice a week. The macroscopical and microscopical morphology identification was performed by culturing on SDA. The American Type Culture Collection (ATCC) strains, ATCC®22190™ (*N. dimidiatum*) and ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*) [17] were included in this study (Table 2). The pH tests were performed with Minimal Culture Media - MM (1% Dextrose, 1X Salt Solution, 0.1% (v/v) Trace Elements, 2% (p/v) agar). 20X Salt Solution (3.2 M NaCl, 0.14 M KCl, 0.2 M KH₂PO₄, 40 mM MgSO₄·7H₂O). Trace Elements (75 mM ZnSO₄·7H₂O, 180 mM H₃BO₃, 25 mM Cl₂Mn·4H₂O, 18 mM FeO₄S·7H₂O, 6 mM Cl₂Co·6H₂O, 6 mM CuSO₄·5H₂O, 1 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 140 mM EDTA). The colony development at different temperatures was assessed by inoculation on Potato Dextrose Agar (Acumedia Manufactures, Inc. Lansing, MI, USA) plus 0.5% Yeast Extract (PDAY). This project was approved by the Research Ethics Committee of the 'Faculdade de Ciências Farmaceuticas de Ribeirao Preto, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil'.

2.2. DNA extraction, PCR, DNA sequencing and nucleotide analysis

The DNA extraction was performed directly from fungal mycelia by grinding it into a fine powder under the use of liquid nitrogen with a mortar and pestle. The extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5 % w/v SDS) and phenol-chlorophorm (1:1) were added. After centrifugation the DNA was precipitated with isopropanol and re-suspended with RNase free water. The following loci were chosen for multilocus sequence typing: the internal transcribed spacer region 1 (ITS1) and 2 (ITS2); the chitin synthase (CHS); the histone H3 (HH3); the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD); the β -tubulin gene (TUB); and the elongation factor 1 α gene (EF-1). All PCR reactions were performed using Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher scientific Inc, Waltham, MA, USA). The primers for ITS1 and ITS2 amplification were designed according to White *et al.* [18], and for CHS, EF-1, HH3, GPD and TUB the primers were designed based on published sequences in GenBank [19] (Table 3). Each PCR product was purified with Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) and stored at -20 °C until sequencing. The PCR purified products were sequenced using the same primers with the ABI3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Each result was analyzed using ChromasPro® Software (ChromasPro 1.7.6, Technelysium Pty Ltd, Tewantin QLD, Australia), and the DNA sequences were compared with the DNA sequences database of the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [20]. The multilocus sequence typing analysis was performed by the multiple DNA alignment method using the 'Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA' 6.0 software [21]. The PCR sequencing of each clinical isolate and ATCC strains were performed with two biological replicates. The nucleotide difference sites were determined in

accordance with the genomic sequences deposited in the GenBank [19] database. The GenBank accession numbers are listed in Table 1 and 2.

2.3. Phylogenetic analyses

The evolutionary history was inferred using the unweighted-pair group method with arithmetic averages (UPGMA) [22]. The robustness of the most parsimonious trees was evaluated from 1000 bootstrap replications. The evolutionary distances were computed using the *p*-distance method [23, 24]. A concatenated sequence of 2075 base pairs (bp) was constructed with the partial DNA sequence of ITS1, ITS2, EF1, TUB, HH3, CHS and GPD per clinical isolate and ATCC strains. Thus, the analysis involved 41 nucleotide sequences and all positions containing gaps and missing data were eliminated. Phylogenetic analyses were performed using MEGA 6.0 software [21].

2.4. Fungal colony development at different temperatures and pHs

The colony development at different temperatures was assessed by the inoculation of 5 μ l of 5×10^6 arthroconidia/ml suspension on PDAY media culture and incubation at 28 and 37 °C. The pH tests were performed by the inoculation of 5 μ l of 5×10^6 arthroconidia/ml suspension on MM media culture adjusted with different pHs and incubation at 37 °C. The pHs 5.5 and 6.5 were buffered with 50 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) and the pHs 7.5 and 8.5 were buffered with 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). The diameters of the colonies were measured every 24 hours until 72 hours of incubation. The experiments were performed with three biological replicates.

2.5. Antifungal drug susceptibility test

The total of 39 clinical isolates and two ATCC strains of *N. dimidiatum* were tested for *in vitro* antifungal susceptibility. Amphotericin B (0.03 - 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma), ketoconazole (0.25 - 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma), fluconazole (0.25 - 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma), voriconazole (0.03 - 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma), 5-flucytosine (0.25 - 128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma), terbinafine (0.03 - 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Sigma) and caspofungin (0.125 – 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - Cancidas - Merck Sharp & Dohme Limited) susceptibility tests were conducted in accordance with the guidelines M38 and M38A published in 2008 by the Clinical Laboratory Standards Institute [25]. The control strains of the experiment were *Aspergillus flavus* (ATCC®204304™) and *Candida krusei* (ATCC®6258™) (data not shown). The MIC was defined as the minimal concentration of drug capable of inhibiting at least 90 % of fungal growth. The experiments were performed with three biological replicates. The geometric mean (GM) results were calculated for each clinical isolate and antifungal drug. The analysis was performed using the MIC range and the GM.

2.6– Statistical analysis

Data were submitted to one-way analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Tukey's post-test to compare the effects of the different treatments. No data transformations were required in any experiment. *P* values of < 0.05 were considered significant. All computations were performed using Graphpad Prism Software (v 5.0 Graph pad Software, La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1- Multilocus sequence typing of *N. dimidiatum* clinical isolates and phylogenetic analysis

The multilocus sequence typing was performed by the sequencing of ITS1 and ITS2 regions from rDNA and the partial sequence of the conserved genes CHS, HH3, GPD, TUB and EF-1 of 33 *N. dimidiatum* and 6 *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates from skin and toenail scrapings, and two ATCC strains. The analysis has shown that the 288 bp of the nucleotide sequence of ITS2 region and the partial sequence of conserved genes CHS (230 bp) and GPD (255 bp) have no polymorphic sites among all clinical isolates and ATCC strains. The sequencing of ITS1 region (203 bp) and the partial sequence of genes EF-1 (269 bp), TUB (372 bp) and HH3 (458 bp) have shown eight polymorphic sites in which ITS1 has a transition from guanine to adenine at 105 bp of the sequenced region (Table 4). The nucleotide sequence of EF-1 has shown four polymorphic sites throughout the intron sequence. The transitions from thymine to cytosine, cytosine to thymine, adenine to guanine and the transversion from adenine to cytosine were found at sites 103, 188, 198 and 214 bp, respectively. Two polymorphic sites were found in the TUB gene. The first site is the transition from thymine to cytosine at position 312 bp in which the codon CTT encodes the amino acid leucine, and CCT encodes the amino acid proline, respectively. The second polymorphic site is the transition from cytosine to thymine at position 319 bp which is a silent mutation in which both codons encode serine. The nucleotide sequence of HH3 has shown a polymorphic site at 265 bp with a transition from adenine to guanine which represents a silent mutation in which both codons encode glutamate. The combination of the eight polymorphic sites found by the evaluation of the ITS1 and ITS2 regions of rDNA and the partial sequence of EF1, TUB, HH3, CHS and GPD, determined six STs (Table 4). Most of the *N. dimidiatum* clinical isolates (71 %) were clustered in ST1 and 5.7 %, 2.8 % and 14.3 % in ST2, ST3 and ST4, respectively. The *N. dimidiatum* var. *hyalinum* represents 15.4 % of the

clinical isolates and were clustered in ST5 together with ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*). The only member of ST6 is ATCC®22190™ (*N. dimidiatum*). The CHS partial gene sequencing has shown no polymorphic sites among the clinical isolates from our study. However, in a public search in the GenBank database among DNA sequences of *N. dimidiatum* strains, polymorphic sites in CHS DNA sequence were observed among the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) strains (CBS661.77, CBS499.66, CBS280.66, CBS251.49 and CBS204.33 [4]) and the clinical isolates from this study. A transition from cytosine to thymine and a transversion from thymine to guanine were found at positions 38 and 174 bp, respectively (Table 4). Both are silent mutations in which the four codons encode glycine.

The evolutionary history of *N. dimidiatum* isolates using 2075 bp originated from the concatenation of the seven loci dataset (ITS1, ITS2 EF1, TUB, HH3, CHS and GPD), generated the UPGMA dendrogram presented in Fig. 1, based on *p*-distance. The bootstrap values were registered in the nodes of the UPGMA phylogenetic tree. The main set of the isolates could be differentiated into two subgroups, with strong bootstrap support. Significant association was found between the subgroups A and B (Fig. 1) and the production of dark-brown (melanin pigment) or hyaline arthroconidia and hyphae by the isolates.

3.2- Colony development at different temperatures and pHs

The colony development of *N. dimidiatum* clinical isolates and ATCC strains were evaluated for 28 °C and 37 °C at 72 hours of incubation. It was observed that at both temperatures the clinical isolates belonging to STs 1 to 4 have shown the colony diameter between 8 and 14 cm. Additionally, the colony diameters of 1 to 5 cm were

observed for the clinical isolates and ATCC strains clustered in STs 5 and 6. The colony diameter of ST5 and 6 is smaller at both temperatures in comparison with ST1 to 4 ($p < 0.05$). The variation of pH in the culture medium showed that the colony diameters of the clinical isolates clustered in STs 1 to 4 are between 2 and 8 cm, and 0.5 to 0.8 cm for STs 5 and 6 (Fig. 2). For pH 5.5, 6.5, 7.5 and 8.5, ST5 and 6 showed a smaller colony diameter in comparison with ST1 to 4 ($p < 0.05$).

3.3 – In vitro antifungal drug susceptibility test

In vitro antifungal sensitivity of the *N. dimidiatum* clinical isolates and ATCC strains was determined by the evaluation of the MIC of seven antifungal agents. The results were clustered according to the ST (Table 4). Amphotericin B (MIC range 0.03 - 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 0.126 $\mu\text{g ml}^{-1}$), terbinafine (MIC range 0.125 - 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 0.75 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and voriconazole (MIC range 0.125 - 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 1.68 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were the most active antifungals against the *N. dimidiatum* isolates, followed by 5-flucytosine (MIC range 1 - 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 12.95 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and caspofungine (MIC range 8 - 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 27.02 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Ketoconazole (MIC range 0.5 - >128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 58.81 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and fluconazole (MIC range 8 - >128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 95.63 $\mu\text{g ml}^{-1}$) were inactive against the clinical isolates (Table 5). Based upon a comparison of MIC range and MIC GM, amphotericin B and terbinafine have shown no significant differences among the clinical isolates ($p > 5$ – Table 5). *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates (ST5) were more sensitive to voriconazole (MIC range 0.125 - 0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 0.27 $\mu\text{g ml}^{-1}$), ketoconazole (MIC range 0.5 - 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 3.62 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and fluconazole (MIC range 8 - 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM MIC 39 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in comparison with *N. dimidiatum* isolates (STs 1 to 4, $p < 0.05$ – Table 5). ST 6 has shown lower MIC than

STs 1 to 4 for fluconazole (MIC range 32 - 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM 45.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and ketoconazole (MIC range 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and GM 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ – $p < 0.05$).

4. Discussion

The ascomycetous fungi *N. dimidiatum* which is involved in onychomycosis and superficial skin infection mimicking dermatophytosis is mostly isolated from patients residing in endemic regions such as Central Africa, Asia and the Indian Ocean region [7]. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* has been described as a hyaline variety of *N. dimidiatum* [4, 10] and is more frequently found in patients from South America, West Africa and the West Indies [7]. Here, 33 clinical isolates from *N. dimidiatum* and 6 *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolated from 29 patient's lesions (skin and toenail) were evaluated with regard to multilocus phylogeny, development at different temperatures and pHs and antifungal sensitivity. Seven loci of *N. dimidiatum* were partially sequenced. Eight polymorphic sites have been registered and the combination revealed six STs in which the phylogenetic analysis accentuates the robustness of this division. Interestingly, *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates and the ATCC®38907™ isolate are clustered in the same ST which differs from the other STs because of the presence of the polymorphic site in the partial sequences of ITS1 and TUB at position 105 bp and 318 bp, respectively. A previous study describes the same polymorphic sites in Brazilian clinical isolates and CBS strains from different sources and regions, in which the only two *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates studied showed an adenine at position 488 bp and a thymine at 348 bp in the ITS region and TUB gene, respectively [4]. Additionally, the comparison of the sequences from this study with different isolates from different sources and regions revealed similar genotype distribution, suggesting a low degree of diversity of circulating isolates worldwide.

The mammalian host presents a diverse environment in which the fungal pathogen must be able to rapidly adapt in order to survive and proliferate [26]. The presence of melanin, thermotolerance, and the ability to grow at different pHs is shared by successful human pathogens and is a feature that has been shown to correlate with virulence potential [26-28]. The greater pathogenic potential of *N. dimidiatum* is possibly attributed to the presence of the melanin pigment [5], which in other microorganisms is known to affect the macrophages and reduces pro-inflammatory cytokines [29, 30]. Moreover, the pH sensing pathways, adhesion to host cells, and host tissue invasion by the hyphae are additional factors involved in the fungal pathogenicity [26, 31]. Here, *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates and ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum*) belonging to ST5 have shown a decreased rate of hyphae growth, revealed by the reduced development of the fungal colony at different temperatures and pHs. Therefore, the reduced hyphae development possibly impairs the invasion of the host tissue by the fungi, so reducing the percentage of the establishment of infectious disease. Thus, beyond the absence of the melanin pigment, the decreased rate of hyphae growth among the *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates in different temperatures and pHs could be an additional factor which reduces the establishment of disease and an explanation for the low number of clinical isolates of *N. dimidiatum* var. *hyalinum* in our study.

Little is known about the correlation between the MIC of antifungal drugs against *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* and the clinical findings for neoscytalidiosis [14, 16]. Additionally, the treatment outcome with the commonly used antifungal for the treatment of nail and skin infections caused by dermatophytes and yeasts, has the feature of low frequency eradication of the infection caused by *N. dimidiatum* [32, 33]. Among the few reports describing the *in vitro* activity of

antifungal drugs against *N. dimidiatum*, amphotericin B, voriconazole and terbinafine were ranked as the drugs with high antifungal activity against this species [4, 14, 16, 34, 35]. In agreement with these data, we found that *N. dimidiatum* clinical isolates from our study were more sensitive to amphotericin B, voriconazole and terbinafine. These results corroborate the high efficacy of amphotericin B and voriconazole antifungal therapy in a neutropenic murine model of the *N. dimidiatum* infection [36]. Additionally, the high *in vitro* activity of terbinafine found in our study agrees with the successful combined treatment of subcutaneous *N. dimidiatum* infection with voriconazole and topical terbinafine [9], and successful combined treatment with oral terbinafine, ciclopirox nail lacquer and nail abrasion for onychomycosis due to *Neoscytalidium* sp. [37]. *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates have shown lower MIC for voriconazole, ketoconazole and fluconazole than *N. dimidiatum* clinical isolates. This result shows that the hyaline variant of *N. dimidiatum* presents a different profile of sensitivity to azoles than the *N. dimidiatum* clinical isolates.

In the present work, differences among *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates have been shown. All *N. dimidiatum* var. *hyalinum* isolates were clustered in a single ST and this grouping was evidenced by phylogenetic analysis. Additionally, the melanin pigment non-producer *N. dimidiatum* var. *hyalinum* has shown a lower capacity to develop, *in vitro*, at different temperatures and pHs which possibly reduces the establishment of disease. Moreover, the hyaline variant clinical isolates have shown lower MIC for voriconazole, ketoconazole and fluconazole than the dematiaceous *N. dimidiatum* clinical isolates. Considering the difficulties in the treatment of *N. dimidiatum* and few reports regarding this topic, further studies are needed to characterize the differences between *N. dimidiatum* and *N. dimidiatum* var.

hyalinum and the establishment of an adequate antifungal therapy for *N. dimidiatum* infection.

Acknowledgment

The authors are thankful for the 'Serviço de Análises Clínicas da Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - Universidade de Sao Paulo' which has provided the clinical isolates studied in this work. We also thank John Carpenter, Ribeirão Preto, Brazil, for the English revision.

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP [2012/17028-2 and 2012/23920-5].

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interests. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Ethical approval: This project was approved by the Research Ethics Committee of the 'Faculdade de Ciencias Farmaceuticas de Ribeirao Preto, Universidade de Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, Brazil'.

References

- 1 Cursi IB, Freitas LB, Neves Mde L, Silva IC. Onychomycosis due to *Scytalidium* spp.: a clinical and epidemiologic study at a University Hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *An Bras Dermatol*; **86**: 689-93.
- 2 Elinav H, Izhar U, Benenson S, et al. Invasive *Scytalidium dimidiatum* infection in an immunocompetent adult. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1259-63.
- 3 Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, et al. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Stud Mycol* 2006; **55**: 235-53.
- 4 Madrid H, Ruiz-Cendoya M, Cano J, Stchigel A, Orofino R, Guarro J. Genotyping and in vitro antifungal susceptibility of *Neoscytalidium dimidiatum* isolates from different origins. *Int J Antimicrob Agents* 2009; **34**: 351-4.
- 5 Morris-Jones R, Youngchim S, Hextall JM, et al. *Scytalidium dimidiatum* causing recalcitrant subcutaneous lesions produces melanin. *J Clin Microbiol* 2004; **42**: 3789-94.

- 6 Machouart-Dubach M, Lacroix C, Vaury C, et al. Nucleotide structure of the *Scytalidium hyalinum* and *Scytalidium dimidiatum* 18S subunit ribosomal RNA gene: evidence for the insertion of a group IE intron in the rDNA gene of *S. dimidiatum*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **208**: 187-96.
- 7 Machouart M, Menir P, Helenon R, Quist D, Desbois N. *Scytalidium* and scytalidiosis: what's new in 2012? *J Mycol Med*; **23**: 40-6.
- 8 Zaatari GS, Reed R, Morewessel R. Subcutaneous hyphomycosis caused by *Scytalidium hyalinum*. *Am J Clin Pathol* 1984; **82**: 252-6.
- 9 Sriaroon C, Vincent AL, Silapunt S, Chandler A, Houston SH, Greene JN. Successful treatment of subcutaneous *Scytalidium hyalinum* infection with voriconazole and topical terbinafine in a cardiac transplant patient. *Transplantation* 2008; **85**: 780-2.
- 10 Roeijmans HJ, De Hoog GS, Tan CS, Figge MJ. Molecular taxonomy and GC/MS of metabolites of *Scytalidium hyalinum* and *Nattrassia mangiferae* (*Hendersonula toruloidea*). *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 181-8.
- 11 Machouart M, Lacroix C, Bui H, Feuilhade de Chauvin M, Derouin F, Lorenzo F. Polymorphisms and intronic structures in the 18S subunit ribosomal RNA gene of the fungi *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum*. Evidence of an IC1 intron with an His-Cys endonuclease gene. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **238**: 455-67.
- 12 Lorenza Putignani SDA, Maria Grazia Paglia and Paolo Visca. DNA-Based Detection of Human Pathogenic Fungi: Dermatophytes, Opportunists, and Causative Agents of Deep Mycoses. In: Voigt YGaK (ed) *Molecular Identification of Fungi*. Heidelberg, Germany, 2010.
- 13 Oyeka CA, Gugnani HC. In vitro activity of seven azole compounds against some clinical isolates of non-dermatophytic filamentous fungi and some dermatophytes. *Mycopathologia* 1990; **110**: 157-61.
- 14 Lacroix C, de Chauvin MF. In vitro activity of amphotericin B, itraconazole, voriconazole, posaconazole, caspofungin and terbinafine against *Scytalidium dimidiatum* and *Scytalidium hyalinum* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 835-7.
- 15 Elewski BE. Onychomycosis caused by *Scytalidium dimidiatum*. *J Am Acad Dermatol* 1996; **35**: 336-8.
- 16 Dunand J, Paugam A. In vitro efficacy of voriconazole against clinical isolates of *Scytalidium* spp. from clinical lesions. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31**: 176-7.
- 17 Campbell CK, Mulder JL. Skin and nail infection by *Scytalidium hyalinum* sp. nov. *Sabouraudia* 1977; **15**: 161-6.
- 18 White TJB, T.D.; Lee, S.; Taylor, T.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. . In: Michael A. Innis DHG, John J. Sninsky, Thomas J. White (ed) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, N.Y.: Academic Press, INC Harcourt Brace Jovanovich, 1990: 482.
- 19 Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D36-42.
- 20 Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990; **215**: 403-10.

- 21 Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 2013; **30**: 2725-9.
- 22 Sneath PHA. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.*, 1973.
- 23 Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, et al. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1469-77.
- 24 Masatoshi Nei SK. *Molecular Evolution and Phylogenetics*: Oxford University Press, 2000.
- 25 CLSI. Reference Methods for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard M38-A. 3rd edition: Clinical Laboratory Standard Institute; Wayne, PA, 2008.
- 26 Davis DA. How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence. *Curr Opin Microbiol* 2009; **12**: 365-70.
- 27 Sales-Campos H, Tonani L, Cardoso CR, Kress MR. The immune interplay between the host and the pathogen in *Aspergillus fumigatus* lung infection. *Biomed Res Int*; **2013**: 693023.
- 28 Nosanchuk JD, Casadevall A. Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3519-28.
- 29 Ruiz-Cendoya M, Madrid H, Pastor FJ, Mayayo E, Marine M, Guarro J. Development of murine models of disseminated infection by *Neoscytalidium dimidiatum*. *Med Mycol* 2010; **48**: 681-6.
- 30 Mohagheghpour N, Waleh N, Garger SJ, Dousman L, Grill LK, Tuse D. Synthetic melanin suppresses production of proinflammatory cytokines. *Cell Immunol* 2000; **199**: 25-36.
- 31 Gow NA, Brown AJ, Odds FC. Fungal morphogenesis and host invasion. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 366-71.
- 32 Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J Am Acad Dermatol* 2000; **42**: 217-24.
- 33 Elewski BE, Greer DL. *Hendersonula toruloidea* and *Scytalidium hyalinum*. Review and update. *Arch Dermatol* 1991; **127**: 1041-4.
- 34 Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Guarro J, et al. In vitro activity of voriconazole against dermatophytes, *Scopulariopsis brevicaulis* and other opportunistic fungi as agents of onychomycosis. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 157-61.
- 35 Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin Exp Dermatol* 2010; **35**: 658-63.
- 36 Ruiz-Cendoya M, Madrid H, Pastor J, Guarro J. Evaluation of antifungal therapy in a neutropenic murine model of *Neoscytalidium dimidiatum* infection. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 152-5.
- 37 Cursi IB, Silva RT, Succi IB, Bernardes-Engemann AR, Orofino-Costa R. Onychomycosis due to *Neoscytalidium* treated with oral terbinafine, ciclopirox nail lacquer and nail abrasion: a pilot study of 25 patients. *Mycopathologia* 2013; **175**: 75-82.

Figure legends:

Figure 1: UPGMA dendrogram showing the genetic relationship among 41 *N. dimidiatum* isolates. The percentages of replicate dendrograms in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

Figure 2: *N. dimidiatum* var. *hyalinum* have shown reduced hyphae development at different temperatures and pHs. **A.** and **B.** The clinical Isolates and ATCC strains were inoculated on PDAY and incubated at 28 and 37 °C; **C.** to **F.** The clinical Isolates and ATCC strains were inoculated on MM with different pHs (5.5, 6.5, 7.5 and 8.5) and incubated at 37 °C. The diameters of the colonies were measured every 24 hours until 72 hours of incubation. *, *N. dimiditaum* clinical isolates (ST1 to 4); ■, ∞, π, Θ, ə and ●, *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates (ST5); †, ATCC®38907™ (*N. dimidiatum* var. *hyalinum* - ST5); ♦, ATCC®22190™ (*N. dimidiatum* - ST6); ψ, *N. dimidiatum* var. *hyalinum* clinical isolates (ST5) and ATCC®22190™ (*N. dimidiatum* - ST6).

Table 1: *N. dimidiatum* clinical isolates from confirmed cases of onychomycosis and superficial skin infection mimicking dermatophytosis studied in this work and GenBank accession numbers.

Patient ID /Gender	Clinical Isolate	Source/Country	GenBank accession numbers						
			ITS1	ITS2	EF1	TUB	HH3	CHS	GPD
1/F	LMC 301.01	foot / Brazil	KM585817	KM585854	KM586002	KM585965	KM585780	KM585891	KM585928
2/M	LMC 302.01	foot / Brazil	KM585818	KM585855	KM586003	KM585966	KM585781	KM585892	KM585929
3/M	LMC 303.01	foot / Brazil	KM585819	KM585856	KM586004	KM585967	KM585782	KM585893	KM585930
4/F	LMC 304.01	foot / Brazil	KM585820	KM585857	KM586005	KM585968	KM585783	KM585894	KM585931
5/F	LMC 305.01	foot / Brazil	KM585821	KM585858	KM586006	KM585969	KM585784	KM585895	KM585932
	LMC 305.02	foot / Brazil	KM585822	KM585859	KM586007	KM585970	KM585785	KM585896	KM585933
	LMC 305.03	toenail / Brazil	KM585823	KM585860	KM586008	KM585971	KM585786	KM585897	KM585934
6/M	LMC 306.01	toenail / Brazil	KM585824	KM585861	KM586009	KM585972	KM585787	KM585898	KM585935
7/F	LMC 307.01	toenail / Brazil	KM585825	KM585862	KM586010	KM585973	KM585788	KM585899	KM585936
8/F	LMC 308.01	foot / Brazil	KM585826	KM585863	KM586011	KM585974	KM585789	KM585900	KM585937
9/F	LMC 309.01	toenail / Brazil	KM585827	KM585864	KM586012	KM585975	KM585790	KM585901	KM585938
10/M	LMC 310.01	foot / Brazil	KM585828	KM585865	KM586013	KM585976	KM585791	KM585902	KM585939
11/F	LMC 311.01	toenail / Brazil	KM585829	KM585866	KM586014	KM585977	KM585792	KM585903	KM585940
12/F	LMC 312.01	toenail / Brazil	KM585830	KM585867	KM586015	KM585978	KM585793	KM585904	KM585941
13/M	LMC 313.01*	toenail / Brazil	KM585831	KM585868	KM586016	KM585979	KM585794	KM585905	KM585942
14/F	LMC 314.01	toenail / Brazil	KM585832	KM585869	KM586017	KM585980	KM585795	KM585906	KM585943
15/F	LMC 315.01	toenail / Brazil	KM585833	KM585870	KM586018	KM585981	KM585796	KM585907	KM585944
16/F	LMC 316.01	toenail / Brazil	KM585834	KM585871	KM586019	KM585982	KM585797	KM585908	KM585945
17/M	LMC 317.01	foot / Brazil	KM585835	KM585872	KM586020	KM585983	KM585798	KM585909	KM585946
18/F	LMC 318.01*	foot / Brazil	KM585836	KM585873	KM586021	KM585984	KM585799	KM585910	KM585947
19/M	LMC 319.01	toenail / Brazil	KM585837	KM585874	KM586022	KM585985	KM585800	KM585911	KM585948
20/M	LMC 320.01	toenail / Brazil	KM585838	KM585875	KM586023	KM585986	KM585801	KM585912	KM585949
21/M	LMC 321.01	toenail / Brazil	KM585839	KM585876	KM586024	KM585987	KM585802	KM585913	KM585950
	LMC 321.02	toenail / Brazil	KM585840	KM585877	KM586025	KM585988	KM585803	KM585914	KM585951
	LMC 321.03	foot / Brazil	KM585841	KM585878	KM586026	KM585989	KM585804	KM585915	KM585952
	LMC 321.04	toenail / Brazil	KM585842	KM585879	KM586027	KM585990	KM585805	KM585916	KM585953
	LMC 321.05	foot / Brazil	KM585843	KM585880	KM586028	KM585991	KM585806	KM585917	KM585954
22/M	LMC 322.01	toenail / Brazil	KM585844	KM585881	KM586029	KM585992	KM585807	KM585918	KM585955
	LMC 322.02	foot / Brazil	KM585845	KM585882	KM586030	KM585993	KM585808	KM585919	KM585956
	LMC 322.03	foot / Brazil	KM585846	KM585883	KM586031	KM585994	KM585809	KM585920	KM585957
23/F	LMC 323.01	toenail / Brazil	KM585847	KM585884	KM586032	KM585995	KM585810	KM585921	KM585958
24/M	LMC 324.01	foot / Brazil	KM585848	KM585885	KM586033	KM585996	KM585811	KM585922	KM585959
	LMC 324.01	foot / Brazil	KM585849	KM585886	KM586034	KM585997	KM585812	KM585923	KM585960
	LMC 324.02	toenail / Brazil	KM585850	KM585887	KM586035	KM585998	KM585813	KM585924	KM585961
25/F	LMC 325.01	toenail / Brazil	KM585851	KM585888	KM586036	KM585999	KM585814	KM585925	KM585962
26/F	LMC 326.01*	toenail / Brazil	KP698694	KP698698	KP698682	KP698702	KP698690	KP698678	KP698686
27/M	LMC 401.01*	foot / Brazil	KP698695	KP698699	KP698683	KP698703	KP698691	KP698679	KP698687
28/F	LMC 402.01*	toenail / Brazil	KP698696	KP698700	KP698684	KP698704	KP698692	KP698678	KP698688
29/F	LMC 403.01*	toenail / Brazil	KP698697	KP698701	KP698685	KP698705	KP698693	KP698681	KP698689

ID, identification; F, Female; M, Male; LMC, Laboratório de Micologia Clínica FCFRP-USP Ribeirão Preto Brazil; ITS1 and ITS2, internal transcribed spacer region 1 and 2; EF-1, elongation factor 1 α ; TUB, β -tubulin; HH3, histone H3; CHS, chitin synthase; GPD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

*, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.

Table 2: *N. dimidiatum* isolates included in this study and GenBank accession numbers.

Strains	Source/Country	GenBank accession numbers					
		ITS 1 and 2	EF1	TUB	HH3	CHS	GPD
ATCC® 38907™ [9]*	toenail / England	KM585853 / KM585890	KM586038	KM586001	KM585816	KM585927	KM585964
ATCC® 22190™	foot / Scotland	KM585852 / KM585889	KM586037	KM586000	KM585815	KM585926	KM585963
CBS 661.77	human / United Kingdom	FM211433**	-	FM211168*	-	FM211199*	-
CBS 499.66	<i>Magnifera indica</i> / Mali	FM211432**	-	FM211167*	-	FM211198*	-
CBS 380.36	<i>Citrus aurantium</i> / Unknown	FM211431**	-	FM211165*	-	FM211196*	-
CBS 251.49	<i>Juglans regia</i> / USA	FM211430**	-	FM211166*	-	FM211197*	-
CBS 204.33	branch of <i>Prunus</i> sp. / Egypt	FM211429**	-	FM211164*	-	FM211195*	-
CBS 145.78*	foot / United Kingdom	KF531816**	KF531795**	-	-	-	-

ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraal Bureau voor Schimmelcultures Utrecht - The Netherlands; ITS, internal transcribed spacer region; EF-1, elongation factor 1 α ; TUB, β -tubulin; HH3, histone H3; CHS, chitin synthase; GPD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; "-", not available; *, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*; **, sequence obtained from GenBank.

Table 3: Primer sequence employed to the multilocus sequence typing.

Gene Name/Region	Primer Name	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Reference
Internal Transcribed Spacer 1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	203	(11)
	ITS2	GCTGCGTTCTTCATCGATGC		
Internal Transcribed Spacer 2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	288	(11)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
Chitin Synthase	CHS_f	GTGTGCGTTGTCAGCGAC	230	This work
	CHS_r	TCCTTCAAACAGAAAAGCATC		
β-Tubulin	bTUB_f	CAGCTGAACTCTGAC CTGC	372	This work
	bTUB_r	AGCAGTGAACCTGGTCACC		
Histone H3	HH3_f	CGCTGCGTCGCTGTTGC	458	This work
	HH3_r	CTACAATACCGTTAGTAATGC		
Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	GPD_f	AGCTGACCCACGCCACCA	255	This work
	GPD_r	ACCGTCGACGGTCTTCTG		
Elongation Factor 1α	EF1_f	TCGACAAGCGTACCATCGAG	269	This work
	EF1_r	AGCCTTGAGCTTGTCAAGGA		

Table 4: Multilocus sequence typing of *N. dimidiatum* clinical isolates and ATCC strains.

Strains	ST	Gene									
		ITS1	EF-1					TUB	HH3	CHS	
		105	103	188	198	214	312	319	265	38	174
LMC 301.01	1	G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 302.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 303.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 305.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 306.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 307.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 308.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 309.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 312.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 314.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 317.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 320.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.04		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 321.05		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 322.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 323.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.02		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 324.03		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 325.01		G	T	C	A	A	T	C	G	C	T
LMC 304.01	2	G	T	C	A	A	C	C	G	C	T
LMC 319.01		G	T	C	A	A	C	C	G	C	T
LMC 311.01	3	G	T	C	G	C	C	C	G	C	T
LMC 310.01	4	G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 315.01		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 316.01		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 322.02		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 322.03		G	T	C	G	C	T	C	G	C	T
LMC 313.01*	5	A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 318.01*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 326.01*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 401.01*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 402.01*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
LMC 403.01*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
ATCC®38907™*		A	T	C	G	C	T	T	A	C	T
ATCC®22190™	6	A	C	T	G	C	C	C	G	C	T
CBS 661.77		G	-	-	-	-	T	C	-	T	T
CBS 499.66		G	-	-	-	-	T	C	-	T	T
CBS 380.36		A	-	-	-	-	T	C	-	T	A
CBS 251.49		A	-	-	-	-	T	C	-	T	A
CBS 204.33		A	-	-	-	-	T	C	-	C	T
CBS 145.78*		A	-	-	G	C	-	-	-	-	-

ST, sequence type; ATCC, American Type Culture Collection; CBS, Centraal Bureau voor Schimmelcultures Utrecht - The Netherlands; ATCC®38907™, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*; ATCC®22190™, *N. dimidiatum*; ITS1, Internal Transcribed Spacer 1; EF1, Elongation Factor 1 α ; TUB, β -tubulin; HH3, histone H3; CHS, chitin; bp, base pairs; G, guanine; C, cytosine; A, adenine; T, thymine; "-", not available; LMC, Laboratório de Micologia Clínica FCFRP-USP Ribeirão Preto Brazil; *, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.

Table 5: *In vitro* susceptibility test of antifungal drugs against *N. dimidiatum* clinical isolates and ATCC strains

ST (n° of strains)	Amphotericin B		Voriconazole		Terbinafine		5-Flucytosine		Ketoconazole		Fluconazole		Caspofungine	
	MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)		MIC (µg ml ⁻¹)	
	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM	Range	GM
ST 1 (25)	0.03 - 0.5	0.118	1 - 4	2.6	0.125 - 4	0.83	4 - 32	14.86	32 - >128	124.63	64 - >128	120.53	16 - 64	28.50
ST 2 (2)	0.03 - 0.125	0.077	1 - 4	2.37	0.125 - 2	0.5	8 - 16	12.69	>128	>128	>128	>128	16 - 64	28.50
ST 3 (1)	0.25	0.25	2	2.00	0.5 - 2	1	16 - 32	22.63	>128	>128	>128	>128	16 - 32	22.62
ST 4 (5)	0.03 - 0.5	0.135	1 - 4	2.82	0.125 - 4	0.53	16 - 32	20.63	32 - >128	97	64 - >128	103.96	16 - 32	24.25
ST 5 (7)*	0.03 - 0.5	0.152	0.125 - 0.5	0.27	0.5 - 2	0.74	2 - 32	7.61	0.5-16	3.62	8-64	39	16-32	28.98
ST 6 (1)	0.06	0.06	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	1	1	32-64	45.25	8	8
Total (41)	0.03 - 0.5	0.126	0.125 - 4	1.68	0.125 - 4	0.75	1 - 32	12.95	0.5 - >128	58.81	8 - >128	95.63	8 - 64	27.02

ST, sequence type; MIC, minimal inhibitory concentration; GM, geometric mean; *, *N. dimidiatum* var. *hyalinum*.