

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Sirlei Garcia Marques

CROMOBLASTOMICOSE NO MARANHÃO:
UMA ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA, AMBIENTAL E MOLECULAR

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2010

Sirlei Garcia Marques

CROMOBLASTOMICOSE NO MARANHÃO:
UMA ABORDAGEM MICROBIOLÓGICA, AMBIENTAL E
MOLECULAR

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Resende Stoianoff

Co-orientadoras: Prof.^a Dra. Cleide Viviane Buzanello Martins

Prof.^a. Dra. Azizedite Guedes Gonçalves

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

Tese intitulada “*Cromoblastomicose no Maranhão: Uma abordagem Microbiológica, Ambiental e Molecular*”, de autoria da doutoranda Sirlei Garcia Marques, aprovada pela banca examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof^a Dra. Maria Aparecida de Resende Stoianoff – ICB/UFMG - Orientadora

Prof. Dr. Jackson Maurício Lopes Costa – Fiocruz/BAHIA

Prof^a Dra. Betânia Maria Soares – UFF/MG

Prof^a. Dra. Patrícia Silva Cisalpino – ICB/UFMG

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos – ICB/UFMG

Prof. Dr. CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
ICB/UFMG

Belo Horizonte, 20 de dezembro de 2010

Marques, Sirlei Garcia
Cromoblastomicose no Maranhão: uma abordagem microbiológica,
ambiental e molecular.
[manuscrito] / Sirlei Garcia Marques. – 2010 202 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida de Resende Stoianoff . Co-orientadores:
Cleide Viviane Buzanello Martins; Azizedite Guedes Gonçalves.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto
de Ciências Biológicas.

1. Cromoblastomicose – Teses. 2. Antimicóticos – Teses. 3. Fungos –
Genética – Teses. 4. Fungos – Teses. 5. Micoses – Teses. 6.
Microbiologia – Teses. 7. Técnica de amplificação ao acaso de DNA
polimórfico. I. Resende, Maria Aparecida. II. Martins, Cleide Viviane
Buzanello. III. Gonçalves, Azizedite Guedes. IV. Universidade
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 582.28

“Aos meus pais,
Vitorino e Dalva que me deram o
dom da vida e ensinamentos com
grande sabedoria. Todo o meu
carinho, gratidão e admiração”

“Ao meu esposo Tarcizo e meus filhos Tiago, Ana Claudia e Vanessa, amores da minha vida. Agradeço pela enorme ajuda, paciência e compreensão, sem a qual não teria concluído este trabalho”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pela presença constante na minha vida. A eles toda a minha devoção.

À Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Resende pela orientação, competência e ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e principalmente pela amizade de tantos anos. Agradeço pelo carinho e confiança durante a execução deste trabalho.

À Prof^a Dra^a Azizedite Guedes Gonçalves pela co-orientação, que teve importância substancial na realização deste trabalho. Agradeço especialmente a minha grande e querida amiga-irmã de todas as horas e que não mede esforços para me ouvir em todos os momentos da minha vida. A você todo o meu carinho e admiração.

À Prof^a Dr^a Cleide Viviane Buzanello Martins pela co-orientação, amizade, dedicação, bom humor e pelo respeito com que trata o aluno. A você todo o meu carinho e gratidão por todos os momentos em que me ajudou desde o começo do doutorado. Jamais esquecerei o que fez por mim.

Agradeço especialmente à Dra. Conceição Pedrozo, amiga maravilhosa, companheira de todas as horas e de grande competência profissional. A sua presença sempre foi indispensável para realização deste trabalho. Sei que ainda vamos percorrer este caminho por muitos e muitos anos em busca de um bem comum, o êxito no tratamento dos nossos pacientes com cromoblastomicose. A você todo o meu carinho, gratidão e admiração.

À Prof^a. Dra. Vânia Vicente (UFPR), minha querida amiga, pelos ensinamentos práticos sobre “extração de DNA” e “isolamento de fungos da natureza”. Agradeço também a disponibilização de materiais importantes para a conclusão desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Oscar Bruña-Romero, pela grande ajuda, ensinamentos e disponibilização do seu laboratório na realização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Maria Rosa Quaresma, amiga e sempre disposta a ajudar. Agradeço de todo coração pelas dicas e pela ajuda na realização do trabalho na parte da biomol.

Ao Prof. Dr. Cláudio Antonio Bonjardim, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia/ICB/UFMG.

Ao Prof. Dr. Ary Correa Júnior, Chefe do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG.

À Prof.Dr. Jackson Maurício Lopes Costa pelos ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e principalmente pela amizade de tantos anos.

Agradeço ao Dr. Valério Monteiro Neto e Dra. Cristina, por autorizarem a realização da extração do DNA dos fungos no laboratório do Uniceuma.

À Dra. Olga Fishman Gompertz, sempre inesquecível, pois foi responsável por minha formação na micologia médica, meu eterno agradecimento e admiração.

À minha família maravilhosa, que me apóia em todas as circunstâncias, Sirlene, Paulo, Renato, Michele, Rafael, Delsio, Flávia, Guilherme e Leonardo.

Aos meus sogros, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, pessoas especiais na minha vida.

Ao Turido, Vera, Giuliano, Tamara, Yuri e dona Maria, pela acolhida carinhosa em sua casa, todas as vezes que fui a Belo Horizonte para tratar de assuntos relacionados a este estudo. A vocês todo meu carinho, gratidão e admiração.

À família Hachem, proprietários do Laboratório Cedro, local onde foi realizada grande parte desta pesquisa. A eles todo meu agradecimento pela confiança, compreensão pela minha ausência do laboratório e por participarem diretamente do meu crescimento profissional.

Agradeço à Dra. Zeni Lamy, diretora do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão, por permitir a minha liberação do trabalho para a realização deste trabalho. A ela todo o meu carinho, gratidão e admiração por suas virtudes únicas como pessoa e profissional.

Aos meus grandes e queridos amigos Newton e Claudia, por estarem sempre presentes nos momentos alegres e tristes da vida da minha família. À Cláudia, por fazer parte da minha história como microbiologista, pois tudo começou no Hospital Universitário, durante a sua

chefia. Agradeço ao Newton pelas fotos, parte importante deste trabalho. Eu os considero como irmãos. A vocês todo o meu carinho e gratidão.

Um agradecimento especial para minha amiga “Rosália”, a pessoa mais integrada com o meu trabalho; participou do começo ao fim com todo zelo, dedicação e competência. Sem a sua ajuda tudo teria sido mais difícil. Não sei como agradecer. O que posso dizer é muito obrigada por tudo e que Deus ilumine sempre a sua vida.

À minha equipe do Setor de Microbiologia do Laboratório Cedro, Patrícia, Yankee e Gilzeane, amigas que sempre ajudaram durante todo o período que tinha que estar ausente por conta da tese. Gostaria de evidenciar a participação do Hudson que, sempre com o seu alto astral, preparou todos os meios de cultura e materiais para a execução deste trabalho. À Luciane, Roseli, Hulda, Rosilene, Adilton, Maxwell e Talita, pessoas maravilhosas sempre dispostas a ajudar, todo o meu carinho e gratidão. Agradeço pelo companheirismo e espírito de equipe. Espero um dia poder retribuir tanto carinho e dedicação de vocês para comigo.

Aos meus queridos amigos do setor de Microbiologia do HU (Alícia, Patrícia, Tânia, Wanda, Jossilene, José Ferreira), pela amizade, carinho e companheirismo.

À Dra. Ana Luíza Bezelga e Dr. Paulo Cruz, pela confiança, incentivo, compreensão e ajuda na minha liberação para realização deste trabalho. A vocês o meu eterno agradecimento.

Às queridas amigas do Núcleo de Gestão da Qualidade (Glauce, Jacione, Vânia, Alessandra, Rejane e Suzana) todo o meu carinho e gratidão.

Ao Douglas e Cristina, secretários do Curso de Pós-Graduação, pela paciência na resolução dos problemas burocráticos relativos ao curso.

Aos colegas e amigos de Laboratório, Marcilene, Milena, Giselle, Susana, Danielle, Fábio, Wigres, Rodolfo, Betânia, Lidiane e Rosana, pelo carinho e companheirismo.

À Haleta, super importante no decorrer deste trabalho, contribuindo com idéias, ensinamentos e apoio na análise da parte molecular deste trabalho. A ela toda a minha gratidão.

À Thais, pelos ensinamentos na realização do antifungigrama. Além de ser uma pessoa incrível é uma profissional altamente competente. Não me cansarei de agradecer pela amizade, colaboração e pela companhia na hora do almoço, juntamente com Carol.

À Carol, pela ajuda no preparo dos materiais e a super organização das lâminas de microcultivo. Agradeço pela forma com que me recepcionava quando chegava em BH e pela companhia constante na hora do almoço, juntamente com Thaís. Isto me fazia muito bem.

À Ana Paula Oliveira, funcionária da biblioteca, minha amiga virtual, “um anjo que caiu do céu na minha vida”, que me ajudou a resgatar todas as referências bibliográficas deste trabalho e que sempre me incentivava. A ela todo o meu carinho, admiração e gratidão.

À Walquíria pelo apoio no preparo de materiais, sempre disposta a me ajudar no período que ainda estava no setor de micologia.

À Andréa do Laboratório de Apoio ao Programa de Pós-Graduação, pelo grande apoio, incentivo e ter sido sempre tão gentil comigo em todos os momentos que precisei.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e colegas, alunos do mestrado e doutorado.

À dona Filó, Alfredinho e Isabela, por sempre nos recepcionar em sua casa com alegria e dedicação.

À Leuza, pela amizade e dedicação ao longo de tantos anos prestando serviço na minha casa e sempre presente em todos os momentos importantes da minha vida. A ela todo o meu carinho e gratidão.

Finalizando, gostaria de fazer um agradecimento especial aos pacientes que fizeram parte deste estudo, pessoas tão sofridas, mas com uma dignidade invejável e esperança de um amanhã melhor. A eles todo o meu carinho e desejo de que um dia eles possam ficar curados.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos..... A gente pode até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro. A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos... Tudo bem! O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum... é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos. Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”

Francisco Cândido Xavier

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Mapa político do Estado do Maranhão situando os municípios de procedência dos pacientes portadores de cromoblastomicose	66
FIGURA 2.	Aspectos clínicos das lesões dos pacientes com CBM.....	86
FIGURA 3.	Exame micológico direto e cultura	87
FIGURA 4.	Características micromorfológicas dos isolados de amostras clínicas dos pacientes com CBM	88
FIGURA 5.	Substratos ambientais coletados no povoado de Salgado-Município de Icatu-Maranhão, Brasil	103
FIGURA 6.	Características micromorfológicas dos isolados ambientais	105
FIGURA 7.	Perfil de amplificação de RAPD para os fungos isolados de amostras clínicas de pacientes com CBM e linhagens isoladas de substratos ambientais no Povoado de Salgado, Município de Icatú, MA	114
FIGURA 8.	Dendrograma obtido com os dados de similaridade genética obtida por marcadores RAPD entre as linhagens de <i>F. pedrosoi</i> , <i>R. aquaspersa</i> e <i>P. verrucosa</i> , isoladas de amostras clínicas de CBM e isolados sapróbios ambientais.....	115
FIGURA 9.	Produtos de PCR em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídio, utilizando iniciador específico de <i>Fonsecaea</i>	123
FIGURA 10.	Produtos da PCR obtidos com o DNA das amostras de biópsias de pacientes com CBM, linhagens ambientais e linhagens clínicas de <i>F. pedrosoi</i>	124
FIGURA 11.	Sequência ITS da linhagem referência <i>F. pedrosoi</i> – ATCC 46428	128

LISTA DE TABELAS

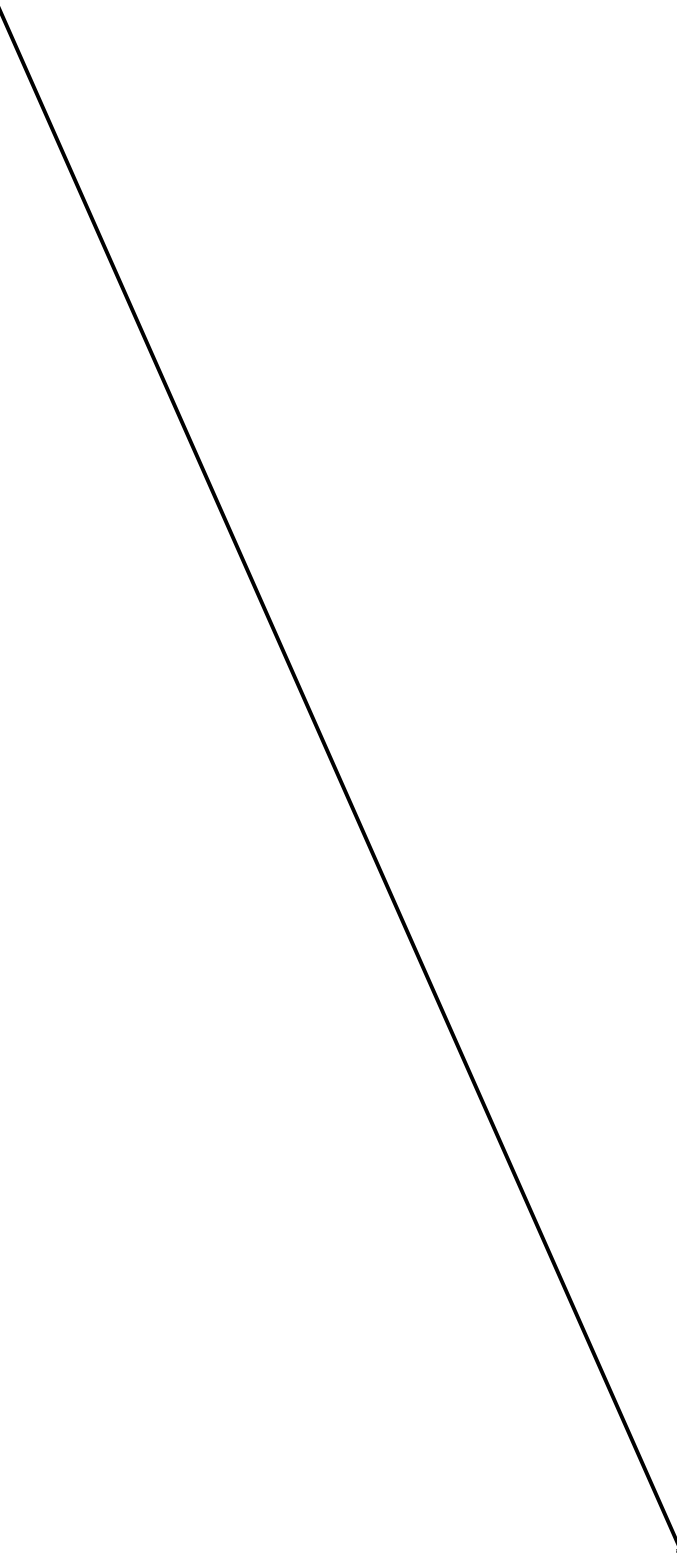
TABELA 1.	Lista das sequências dos iniciadores utilizados nas reações de RAPD.....	79
TABELA 2.	Aspectos clínico-epidemiológicos e micológicos dos pacientes portadores de cromoblastomicose - Maranhão-Brasil.....	85
TABELA 3.	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos antifúngicos AMB, FCZ, ITZ, VCZ, TBF e CPF contra 41 linhagens de fungos isolados de pacientes com CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil	89
TABELA 4.	Média Geométrica, ($\text{CIM}_{\text{máx}}$)e ($\text{CIM}_{\text{mín}}$), (CIM_{50}) e (CIM_{90}) de 39 linhagens de <i>F. pedrosoi</i> isoladas de pacientes com CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil	91
TABELA 5.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos cocos gram-positivos isolados das lesões de pacientes portadores de cromoblastomicose no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil	94
TABELA 6.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos bacilos gram-negativos isolados das lesões de pacientes portadores de CBM no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil.....	96
TABELA 7.	Microorganismos isolados de infecções secundárias dos diversos sítios anatômicos de pacientes portadores de CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil.....	98
TABELA 8.	Associação entre a gravidade da lesão e os microorganismos isolados das lesões de pacientes portadores de CBM no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil	99
TABELA 9.	Associação entre microbiota bacteriana única e mista com a gravidade da lesão de pacientes portadores de CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil.....	99
TABELA10.	Percentual de amostras dos diferentes substratos ambientais coletados no Povoado de Salgado-Município Icatú, Maranhão, Brasil, no mês de maio de 2007.....	100

TABELA11. Frequência de fungos dematiáceos isolados de diferentes substratos ambientais no Povoado de Salgado, Município de Icatu, Maranhão, Brasil, no mês de maio de 2007	102
TABELA12. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/ml}$) dos antifúngicos AMB, FCZ, ITZ, VCZ, TBF, CPF contra 38 fungos dematiáceos isolados de substratos ambientais do povoado de Salgado – Município de Icatu, Maranhão, Brasil.....	108
TABELA13. Média Geométrica, $\text{CIM}_{\text{Máx}}$ e $\text{CIM}_{\text{Mín}}$, CIM_{50} e CIM_{90} de 38 linhagens isoladas de substratos ambientais do Povoado de Salgado-Município de Icatu, Maranhão, Brasil.....	109
TABELA14. Comparação entre os resultados obtidos da (MedGeo), (CIM_{max}), ($\text{CIM}_{\text{Mín}}$), CIM_{50} e CIM_{90} de 38 linhagens de <i>F. pedrosoi</i> isoladas de amostras clínicas e 4 linhagens de amostras ambientais, Maranhão, Brasil.	111
TABELA15. Associação entre os grupos genéticos obtidos por meio do dendograma, com os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes portadores de CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil.	118
TABELA16. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos em relação aos grupos genéticos I, I IA, IIB, III obtidos a partir do dendograma e o uso de antifúngicos pelos pacientes portadores da CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009, Maranhão, Brasil.....	120
TABELA17. Dados clínico epidemiológicos e moleculares das amostras de DNAs submetidas a PCR utilizando iniciador específico para <i>Fonsecaea</i> sp., proveniente de pacientes Maranhenses, portadores de CBM.....	125

LISTA DE SIGLAS

AMB	Anfotericina B
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	<i>Basic Alignment Search Tool</i>
CBM	Cromoblastomicose
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CPF	Caspofungina
CPS	Meio cromogênico
CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
dATP	Dinucleotídeo adenosina trifosfato
dCTP	Dinucleotídeo citosina trifosfato
dGTP	Dinucleotídeo guanina trifosfato
DMSO	Dimetilhossulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	Dinucleotídeo Trifosfato
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FCZ	Fluconazol
HCl	Ácido Clorídrico
HLRA	Alto nível de resistência aos aminoglicosídeos
HUUFMA	Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IMESC	Instituto Maranhense de Estudos Sócio Econômicos e cartográficos
ITZ	Itraconazol

KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
MedGeo	Média Geométrica
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL.	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido (3-[N-morpholino]propanesulphónico)
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	<i>National Committe for Clinical Laboratory Standards</i>
NTSYS	<i>Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	Ágar batata dextrose
pH.	Potencial Hidrogeniônico
PSF	Programa de Saúde da Família
R	Resistente
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute-1640</i>
S	Susceptível
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
TBF	Terbinafina
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UNICEUMA	Centro Universitário do Maranhão
UPGMA	<i>Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average</i>
VCZ	Voriconazol



RESUMO

RESUMO

A cromoblastomicose (CBM) é uma infecção fúngica crônica da pele e tecido celular subcutâneo, causada por vários fungos melaninogênicos da ordem *Chaetothyales*. *Fonsecaea pedrosoi* é o principal agente etiológico da doença. Este trabalho teve como objetivos avaliar os aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes com CBM e caracterizar fenotípica e genotípicamente os agentes isolados de amostras clínicas e ambientais provenientes de uma região da Amazônia do Maranhão-Brasil. Foram avaliados 41 pacientes procedentes do estado do Maranhão com diagnóstico clínico de CBM, no período de setembro de 2006 a outubro de 2009. Entre as amostras ambientais (236), foram isolados 64 fungos dematiáceos. *Fonsecaea pedrosoi* foi o agente predominante das amostras clínicas (95,2%), seguido de *Phialophora verrucosa* (2,4%) e *Rhinocladiella aquaspersa* (2,4%). Entre os isolados ambientais, *Exophiala* sp. foi a mais prevalente (45,3%). Nesta pesquisa predominaram os pacientes do sexo masculino, analfabetos, lavradores, com média de idade de $58 \pm 10,6$ anos e tempo de evolução de doença que variou de $8,8 \pm 7,8$ anos. Os membros inferiores foram os mais acometidos, sendo as lesões moderadas e de placa vegetante as mais prevalentes. O polimorfismo lesional foi verificado na maioria dos indivíduos. A presença de infecção secundária bacteriana foi verificada em 92,7% dos indivíduos, sendo *Staphylococcus aureus* a bactéria mais prevalente, enquanto a infecção bacteriana mista foi associada com a gravidade da lesão $p=0,01$. O teste de susceptibilidade aos antifúngicos foi realizado pela técnica da microdiluição do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e o perfil de susceptibilidade aos antibacterianos pelo método de difusão em ágar. Itraconazol e terbinafina foram as drogas mais ativas contra os fungos avaliados. Os valores das CIMs de itraconazol e voriconazol obtidos frente às amostras ambientais foram as menores dentre os antifúngicos testados. Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos, 27 (100%) dos cocos Gram-positivos aeróbios mostraram-se sensíveis a vancomicina e linezolida. Os isolados de *S. aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN) apresentaram elevado nível de sensibilidade para ampicilina/sulbactam, cefazolina, clindamicina, gentamicina, oxacilina e rifampicina. Esses agentes demonstraram maior índice de resistência para eritromicina, penicilina e sulfametoxazol+trimetoprim. A caracterização genética dos fungos isolados de 40 amostras clínicas e de 16 ambientais foi realizada pela técnica do RAPD utilizando iniciadores específicos para *F. pedrosoi*. A análise do dendograma e da similaridade genética entre os perfis gerados, demonstrou a formação de quatro grupos distintos, sendo que a maioria das amostras de origem clínica se agruparam no grupo II e as de origem ambiental no grupo IV. O sequenciamento de cinco amostras de biópsias de pacientes com CBM, cinco amostras ambientais e nove linhagens de fungos isolados das lesões de pacientes com CBM identificadas como *F. pedrosoi* apresentaram índices de similaridades nucleotídicas que variaram de 92 a 100% para *F. pedrosoi*. A determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias causadoras de infecção secundária poderá vir a ser de grande importância para a realização de uma terapia mais eficaz. A extração do DNA dos fungos causadores da CBM diretamente da biópsia de tecido poderá tornar mais ágil o diagnóstico e melhorar o controle da doença.

Palavras Chave: Cromoblastomicose, antifúngicos, perfil genético, RAPD, sequenciamento

ABSTRACT

The chromoblastomycosis (CBM) is a chronic fungal infection of skin and subcutaneous tissue caused by several melanized fungi of *Chaetothyales* order. *Fonsecaea pedrosoi* is the major causative agent of the disease. This study aimed to evaluate the clinical and epidemiological aspects of patients with CBM and phenotypic and genotypic characterization of the agents isolated from clinical and environmental samples from an Amazon region of Maranhão state, Brazil. We evaluated 41 patients from the state of Maranhão with a clinical diagnosis of CBM, from September 2006 to October 2009. Among the environmental samples (236), were isolated 64 dematiaceous fungi. *F. pedrosoi* was the predominant agent of clinical specimens (95.2%), followed by *Phialophora verrucosa* (2.4%) and *Rhinocladiella aquaspersa* (2.4%). Among the environmental isolates, *Exophiala* sp. was the most prevalent (45.3%). In this study the patients are mainly male rural workers, illiterate, with an average age of 58 ± 10.6 years and time course of disease ranged from 8.8 ± 7.8 years. The lower limbs were most affected; the moderate and vegetating plaque-type lesions are the most prevalent. The lesional polymorphism was observed in most individuals. The presence of secondary bacterial infection was found in 92.7% of individuals, and *Staphylococcus aureus* was the most prevalent bacteria, while the mixed bacterial infection was associated with severity injury ($p = 0.01$). The antifungal susceptibility testing was performed by the microdilution technique of CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) and the profile of susceptibility to antibacterial agents by agar diffusion method. Itraconazole and terbinafine were the most active drugs against the fungi evaluated. The MIC values of itraconazole and voriconazole obtained against the environmental samples were the lowest among the tested antifungals. Twenty seven (100%) of Gram-positive aerobes were sensitive to vancomycin and linezolid. The isolates of *S. aureus* and *S. aureus* negative coagulase (SCN) showed a high sensitivity to ampicillin/sulbactam, cefazolin, clindamycin, gentamicin, oxacillin and rifampin. These agents showed a higher rate of resistance to erythromycin, penicillin and trimethoprim + trimetoprim. Genetic characterization of the isolates from 40 clinical samples and 16 of environmental source was carried out by RAPD using primers specific to *F. pedrosoi*. Analysis of the dendrogram obtained and the similarity between the genetic profiles generated showed the formation of four distinct groups, where the most samples of clinical origin were grouped in group II and those of environmental origin in group IV. Sequencing of five biopsies of patients with CBM, five environmental samples and nine strains of fungi isolated from lesions of patients with CBM identified as *F. pedrosoi* showed high nucleotide similarities ranging from 92 to 100% for *F. pedrosoi*. The determination of antimicrobial susceptibility of bacteria causing secondary infection in the lesions of CBM could be of great importance for the implementation of more effective therapy for the disease. Direct DNA extraction of fungi that cause the CBM from tissue biopsy could be important for improving and speeding the diagnosis and control of the disease.

Key words: Chromoblastomycosis, antifungals, genetic profiles, RAPD, sequencing

