IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS CLÍNICOS DO COMPLEXO *Trichophyton mentagrophytes* E O SEUS PERFIS DE SUSCETIBILIDADE A UM NOVO COMPOSTO SELECIONADO POR VARREDURA VIRTUAL

Thiago Henrique Fermiano (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Lenisa Vieira Vilegas (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Patrícia de Souza Bonfim de Mendonça, Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (co-orientadora), Érika Seki Kioshima (Orientador),e-mail: th.fermiano@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/ Maringá,PR.

Área: Microbiologia/ Subárea: Micologia.

Palavras-chave: Complexo *Trichophyton mentagrophytes,* identificação molecular e antifúngicos

Resumo

Os dermatófitos são fungos patogênicos que causam infecções com potencial altamente contagioso e em sua maioria de difícil tratamento. O diagnóstico baseado apenas na identificação fenotípica do microorganismo pode acarretar em resultados inconclusivos. Por outro lado, identificação molecular das subespécies apresenta maior sensibilidade e especificidade, permitindo assim uma terapêutica mais adequada. Desse modo, o presente estudo utilizou a técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em duas regiões conservadas do rDNA ITS1 e ITS4 por multi enzimas (*EcoR*I, *Mva*I,*Hha*I,*Hinf*I), para diferenciar subespécies de isolados clínicos identificados fenotipicamente como pertencente ao complexo *T. mentagrophytes*. A análise por PCR-RFLP apresentou um padrão característico para cada enzima e dois genótipos gerais, sugerindo a classificação da maioria dos isolados como *Arthroderma benhamiae*. A determinação do perfil de susceptibilidade a antifúngicos convencionais demonstrou que apenas um isolado (MGTM47) apresentou valores de MIC maiores que os demais isolados. No entanto, este perfil não pode ser atribuído a uma diferença de espécie, detectada no PCR-RFLP. Assim, novos estudos deverão ser realizados com intuito de aumentar o número de amostras analisadas e permitir conclusão de modo mais acurado desta relação.

Introdução

O complexo *Trichophyton mentagrophytes* corresponde ao segundo agente etiológico mais frequente nas dermatomicoses precedido apenas por *T. rubrum*. Este fungo é responsável por processos inflamatórios em *Tinea corporis* e *Tinea capitis*, onicomicose e agente de *Tinea pedis.* Uma

característica proeminente desse complexo é a grande variabilidade fenotípica exibida, sendo epidemiologicamente classificado nas formas antropofílicas e zoofílicas. Essa distinção é essencial quando se considera os aspectos clínicos, relacionados a fonte de infecção e terapêutica adequada. Por meio de técnicas moleculares determinou-se três espécies zoofílicas para este complexo: *T. mentagrophytes* sensu stricto, *T. erinacei*, *T.* anamórfico de *A. behamiae*, e uma espécie zoofílica e antropofílica: *T. interdigitale* (Cafarchia et al., 2013).

Rotineiramente, *T.mentagrophytes* é identificado por características macroscópicas e microscópicas, raramente utilizando-se de identificação por métodos bioquímicos como perfuração de cabelo e teste de urease (Heidemann *et al*., 2010). Devido a sua grande variabilidade fenotípica, os exames de rotina apresentam limitações na identificação das espécies do complexo (Robert & Pihet, 2008). Desse modo, o objetivo do presente estudo foi realizar a diferenciação molecular dos isolados clínicos do complexo *T. mentagrophytes* identificados micromorfologicamente e avaliar a susceptibilidade destes isolados frente aos antifúngicos convencionais.

Materiais e métodos

Micro-organismos

Cinco isolados clínicos identificados fenotipicamente como *T. mentagrophytes* foram utilizados. Estes isolados são oriundos de pacientes com suspeita de dermatomicoses atendidos no LEPAC/UEM (COPEP nº 615.643), e pertencem micoteca do laboratório de Micologia médica, UEM.

Identificação das espécies do complexo Trichophyton mentagrophytes

O DNA genômico foi extraído segundo descrito por Bonfim-Mendonça et al, 2013, com modificações. As amplificações da região *Internal Transcribed Spacer* (ITS1 e ITS4) foram realizadas utilizando: 30 ng de DNA genômico e 0,4 mM dos primers ITS1/4 (ITS1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'), sendo utilizado 40 ciclos. A análise de *Polymerase Chain Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)* a partir do produto de PCR da região ITS1/4 foi realizada com quatro enzimas *Mva*I, *Hinf*I, *Hha*I and *EcoR*I (Thermo Scientific, Waltham, USA). Os produtos da digestão foram visualizados em gel de agarose 2%. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com dados contidos na literatura (Heidemann et al., 2010 e Ziółkowska et al, 2015).

Teste in vitro de susceptibilidade aos compostos selecionados

A concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos foi determinada pelo método de microdiluição em caldo, documento M38-A2 (CLSI, 2010). O tempo de incubação foi de 96h, a 35ºC.

Resultados e Discussão

A análise de restrição multi-enzimática da região ITS rDNA de dermatófitos

permite a diferenciação intraespecífica. Estudos que realizaram a técnica de RFLP com apenas uma enzima de restrição, não obtiverem resultados satisfatórios. O alto grau de conservação dessa região seria uma explicação para tal insucesso (Ziółkowska et al, 2015). No presente trabalho, todos os isolados clínicos apresentaram um padrão de banda individual para digestão com *Mva*I e *Hinf*I, com detecção de dois fragmentos de restrição. Já o isolado MGTM 57 não apresentou tais padrões para *EcoR*I, sendo percebido um perfil de banda para demais amostras e a presença de dois fragmentos de restrição. A digestão com *Hha*I, por sua vez, apresentou um padrão de banda eletroforético e diferentemente das demais enzimas utilizadas, apenas um fragmento de restrição nos isolados. O perfil obtido por análise de restrição da região espaçadora interna transcrita com as endonucleases pode ser observado em gel de agarose 2% ilustrado na Figura 1.

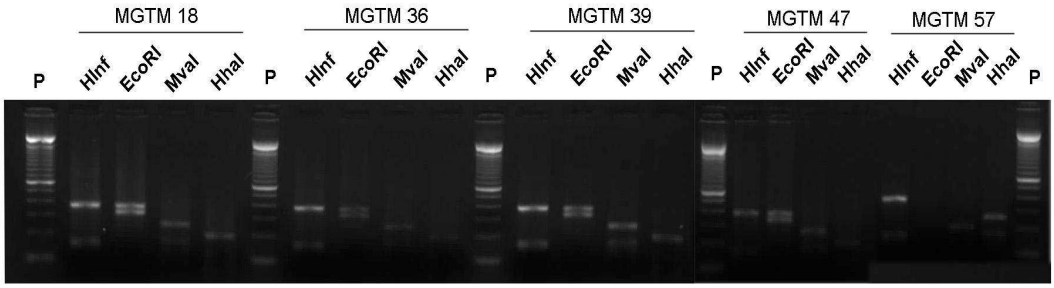

Figura 1 – Perfil da análise de restrição da região espaçadora interna do rDNA de isolados clínicos do complexo *Trichophyton mentagrophytes*.

Os fragmentos obtidos com a RFLP demonstram um perfil parecido para amostras MGTM 18, 36, 39, 47 e um perfil único para MGTM 57. A diferenciação gerada aponta apenas dois genótipos diferentes, dos quais o genótipo I pertenciam a espécie *A. benhamieae* enquanto que para o segundo perfil o genótipo II, não apresentando classificação quanto a espécie, baseado em resultados com estudo similar de Ziółkowska et al, 2015.

Tabela 1 - Resultados da Concentração Inibitória Mínima (MIC) para os três antifúngicos comerciais testado nos cinco isolados clínicos do complexo *Trichophyton mentagrophytes*.

		MIC µg/ml		
Espécie	Código	Fluconazol	Itraconazol	Terbinafina
T. mentagrophytes	MGTM18	0,25	0,50	0,015
T. mentagrophytes	MGTM36	0,5	0,25	0,031
T. mentagrophytes	MGTM39	1	0,125	0,015
T. mentagrophytes	MGTM47	16	1	0,031
T. mentagrophytes	MGTM57	1	0,25	0,015

A análise do perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (MIC), demonstrou que os isolados de maneira geral apresentaram valores de MIC elevados para fluconazol e boa susceptibilidade a terbinafina. O isolado MGTM47 apresentou um perfil de susceptibilidade com valores de MIC maiores do que para os demais isolados (Tabela 1). No entanto, este perfil de menor sensibilidade não pode ser correlacionado a uma subespécie diferente dentro do complexo *T. mentagrophytes*.

Conclusões

As técnicas moleculares demonstraram serem eficazes, sobretudo a técnica de PCR-RFLP na diferenciação entre as subespécies, auxiliando no diagnóstico mais preciso e determinação correta da fonte de infecção e direcionamento dos tratamentos.

Agradecimentos

Agradecemos a todos do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, por todo apoio prestado. Ao CNPQ, como instituto fomentador da pesquisa científica. Ademais, mas não menos importante, aos ensinamentos das professoras orientadoras Érika Seki Kioshima e Patrícia Bonfim, sempre demonstrando paciência e dedicação aos orientandos.

Referências

Cafarchia C, Iatta R, Latrofa MS, Gräser Y, Otranto D. **Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes.** Infect Genet Evol. 2013. 20:336-51.

Heidemann S, Monod M, Gräser Y. **Signature polymorphisms in the internal transcribed spacer region relevant for the differentiation of zoophilic and anthropophilic strains of Trichophyton interdigitale and other species of T. mentagrophytes sensu lato**. Br J Dermatol. 2010. 162(2):282-95

Lamb FM, OttonelliStopiglia CD, Vetoratto G, Goldani JC, Scroferneker ML. **Frequency of onychomycoses in chronic renal failure patients undergoing hemodialysis in Porto Alegre, Brazil**. Acta Dermatovenerol Croat. 2013. 21:19-23.

Robert, Raymond, and Marc Pihet. **Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis**. *Mycopathologia* 166.5-6 (2008): 295-306.

Ziółkowska G1, Nowakiewicz A, Gnat S, Trościańczyk A, Zięba P, Dziedzic BM. **Molecular identification and classification of Trichophyton mentagrophytes complex strains isolated from humans and selected animal species. Mycoses.** 2015. 58(3):119-26.