

## APLICAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) COMO METODOLOGIA PARA IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS DERMATÓFITOS NA ROTINA LABORATORIAL DE MICOLOGIA MÉDICA.

Marina Cristina Gadêlha (PIBIC/CNPq), Terezinha Inez Estivalet Svidzinski (Orientador), Melyssa Negri (Co-orientador).  
e-mail: mcr.gadilha@gmail.com.

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

### Ciências biológicas, Microbiologia

**Palavras-chave:** Dermatofito, PCR, Sequenciamento

### Resumo

Os dermatófitos pertencem a um grupo de fungos queratinofílicos que podem infectar pele, cabelo e unhas de seres humanos e animais. O diagnóstico laboratorial de dermatófitos consiste em microscopia direta e cultura. Entretanto, essas metodologias podem fornecer um diagnóstico tardio, além de ser necessário um profissional qualificado. Dentro desse contexto, a busca por métodos moleculares vêm sendo uma importante ferramenta para a identificação. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi padronizar uma metodologia para o diagnóstico micológico de dermatofitose que atenda as necessidades do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá, (LEPAC/UEM) Setor Micologia, baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR). Foi realizado primeiramente uma revisão de literatura sobre PCR como ferramenta para diagnóstico fúngico e a utilização de uma metodologia para o diagnóstico de dermatófitos mais adequada à realidade do Laboratório de Micologia Médica, LEPAC/UEM. A extração de DNA realizada apresentou um total de 17,8 ng de DNA. A partir deste, foi realizado os experimentos utilizando a técnica de PCR seguida do sequenciamento, para a construção da árvore filogenética. Após a análise filogenética, foi possível identificar o isolado clínico MGMT48 como *Trichophyton interdigitale* anteriormente identificado como *Trichophyton mentagrophytes*. Os resultados aqui descritos demonstram a importância de se utilizar as ferramentas da biologia molecular para um diagnóstico micológico mais preciso.

### Introdução

Dermatomicoses são doenças ocasionadas por fungos que acometem pele, unhas e pelos. Atualmente, vêm sendo bastante estudadas devido ao fato de serem ponto de entrada para infecções oportunistas, principalmente, em indivíduos imunocomprometidos. (WILLE *et al.*, 2009). De acordo com De Hoog *et al.* (2018), métodos bioquímicos e imunológicos bem como métodos moleculares auxiliam na identificação de fungos, . Ainda que as técnicas de

biologia molecular não sejam amplamente empregadas, a sua utilização é bastante benéfica devido a identificação do agente ser precisa ao nível de espécie. Neste sentido, nos últimos anos vêm se desenvolvendo estratégias de extração de DNA para o diagnóstico de dermatomicoses, sendo a técnica mais utilizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) que, sozinha ou combinada com outras técnicas moleculares, pode chegar a um diagnóstico preciso. (HAY *et al*, 2010). Assim, subsequente, a PCR o sequenciamento, tem sido uma técnica a qual qualifica a sequência de bases nitrogenadas presentes, proporcionando uma investigação do genoma, que pode demonstrar as variações (mutações) ocorrentes nas sequências analisadas, além de fornecer um perfil filogenético do fungo. Dados estes, extremamente importantes para a classificação de novas espécies, diferenciação entre fungos pertencentes ao mesmo complexo e ainda contribuir para um melhor panorama da epidemiologia das micoses (SNUSTAD & SIMMONS, 2013).

## **Materiais e métodos**

### *Revisão de literatura*

A partir da identificação da problemática, foi realizada a busca pelos descritores “*RFLP*”, “*Dermatophytes*”, “*Diagnostic*”, “*Sequencing*” e “*Identification*” na base de dados *National Center for Biotechnology Information - NCBI, U.S. National Library of Medicine (PubMed)*. O critério de inclusão foi o período de publicação ser de 2014 à 2018; o artigo conter técnicas de identificação molecular; e ter o objetivo voltado a diferenciação de espécies. Após a seleção dos artigos, realizou-se a interpretação e discussão dos dados extraídos, contextualizando-os e organizando suas informações mais relevantes.

### *Micro-organismos*

O isolado clínico, identificado como *Trichophyton mentagrophytes* (MGTM48), utilizado neste estudo pertence a Rede Paranaense de Coleções Biológicas (Toxonline), o qual, está depositado na micoteca do Laboratório de Micologia Médica da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Este fungo foi isolado de paciente com onicomicose atendidos no Laboratório de Ensino e Pesquisa de Análises Clínicas (LEPAC), divisão de Micologia Médica da UEM. O isolado clínico foi cultivado em Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a 25 °C e identificado preliminarmente de acordo com suas características macro e micromorfológicas (DE HOOG *et al*, 2018).

### *Diagnóstico molecular.*

A metodologia utilizada foi o sequenciamento subsequente a extração de DNA e PCR das regiões ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3').

Todo este processo foi realizado na Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Laboratório de Microbiologia, Microscopia e Bioinformática, no Campus do Jardim Botânico, em Curitiba-Paraná. As sequências obtidas foram editadas usando o BioEdit e comparadas pelo programa BLAST para

detecção das semelhanças usando sequências de referência disponíveis no banco de dados NCBI. A inspeção visual e o alinhamento foram feitos por sequências MEGA versão 7.0.26 de isolados de *Trichophyton* e foram submetidas à análise filogenética usando a linhagem *Arthroderma eboreum* (KT155723.1) como grupo externo.

## Resultados e Discussão

Os artigos encontrados demonstraram que há uma gama de técnicas de biologia molecular para diferenciação de dermatófitos, e que cada autor, apesar de objetivos diferentes, alcançaram resultados promissores. Foram selecionados autores que trabalharam com PCR- real time; PCR-RFLP; MALD-TOF e Sequenciamento. De acordo com a revisão realizada, a técnica de sequenciamento apresentou-se ser a mais vantajosa, atendendo as necessidades do LEPAC-UEM, setor Micologia Médica. Entretanto, é importante salientar que apesar do sequenciamento ser uma técnica extremamente eficiente e a mais recomendada para a caracterização genética de isolados clínicos de difícil identificação (GARCES *et al.*, 2017) , esta técnica ainda é muito dispendiosa e não está disponível para todos os laboratórios de micologia clínica.

A partir da identificação convencional, foi possível observar que o fungo MGTM48 apresentou colônias similares aos fungos pertencentes ao gênero *Trichophyton*, mais especificamente *Trichophyton mentagrophytes*. A quantificação e análise do DNA foram realizadas por espectrofotometria e por eletroforese em gel de agarose, respectivamente. A quantificação do DNA extraído apresentou um total de 17,8 ng de DNA, relação 260/280 = 1,45 e 260/230 = 0,61. Após a extração do DNA foi realizada a PCR e o sequenciamento. Para a análise filogenética, utilizou-se 8 cepas como referências, que incluíram vários tipos de cepas de espécies de *Trichophyton*, mantendo *Arthroderma eboreum* (KT155723.1) como um grupo externo, sendo o fungo MGTM48 identificado como *T. interdigitale* (Figura 01). Apesar de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* serem bastante semelhantes fenotipicamente, dificultando a identificação clássica por meio das características fenotípicas, estes isolados são distintos geneticamente e em relação ao grupo de hospedeiro os quais estes fungos parasitam. Hoje é sabido que *T. mentagrophytes* tem caráter zoofílico, causando infecção principalmente em macacos, mas pode afetar humanos. *T. interdigitale* é um fungo caracterizado como antropílico, ou seja, são mais comuns afetando o homem (DE HOOG *et al.*, 2018). No entanto, as características da colônia de *T. interdigitale* são muito semelhantes a de *T. mentagrophytes* o que colabora para que os dados filogenéticos não corroboram com os dados morfológicos, mostrando como é de extrema importância associar o diagnóstico molecular ao diagnóstico clássico, em casos como este.

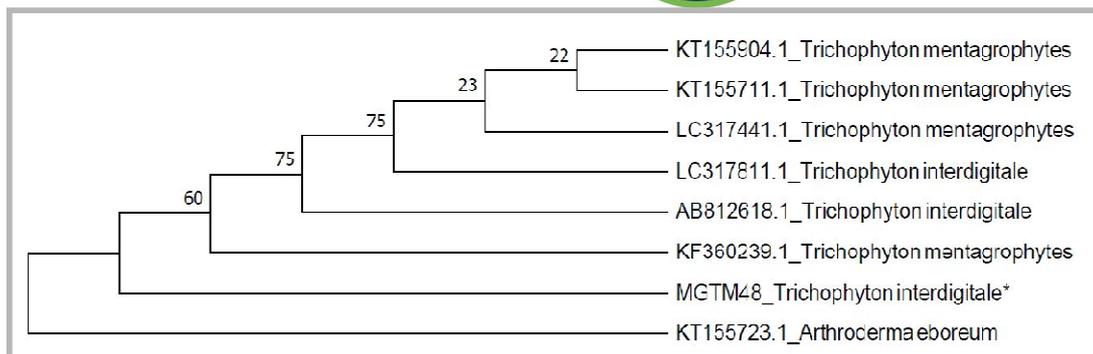


Figura 01 – Árvore filogenética de máxima verossimilhança baseada em ITS.

### Conclusões

Através da técnica de PCR e sequenciamento, foi possível identificar corretamente o fungo MGTM48 como *Trichophyton interdigitale*, anteriormente identificado como *Trichophyton mentagrophytes*. Assim, este resultado mostra a importância da caracterização molecular associada a identificação clássica.

### Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, às professoras Terezinha Estivalet Svidzinski, Melyssa Negri e ao Laboratório de Microbiologia, Microscopia e Bioinformática da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### Referências

DE HOOG, et al. **Atlas of Clinical Fungi: The Ultimate Benchtool for Diagnostics**. 4 ed. (online v. 4.1.4). Ullrecht, NL: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, 2018.

GARCES G., HANS *et al.* Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. **Mycoses**, v. 59, n. 12, p. 787-797, 2016.

HAY, Roderick J.; JONES, Rachael Morris. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. **Clinics in dermatology**, v. 28, n. 2, p. 190-196, 2010.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

WILLE, M. P., et al. Epidemiologia das dermatomicoses em população da periferia de Araraquara-SP, Brasil. **Rev Bras Clin Med**, vol. 7, p. 296-297, 2009.