

AMPLIFICAÇÃO POR PCR E SEQUENCIAMENTO DA REGIÃO ITS PARA A CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS DE FUNGOS DERMATÓFITOS PERTENCENTES A COLEÇÃO MICROBIOLÓGICA DO LABORATÓRIO DE MICOLOGIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

Alana Fernanda Luzia Salvador^a (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Marina Cristina Gadêlha^b, Flavia Franco Veiga^b, Isabele Carrilho Jarros^b, Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi^{a,b} (Co-orientador) Terezinha Inez Estivalet Svidzinski^{a,b} (Orientador), e-mail: terezinha.svidzinski@gmail.com

^aDepartamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

Ciências Biológicas/ Microbiologia/ Micologia

Palavras-chave: dermatófitos, identificações, sequenciamento.

Resumo:

As dermatomicoses são doenças ocasionadas por fungos que acometem pele, unhas e pelos. Os principais agentes etiológicos são os fungos dermatófitos. Apesar da metodologia clássica de detecção fúngica ser considerada o padrão ouro no diagnóstico, algumas espécies pertencentes a estes gêneros são indistinguíveis morfológicamente. Neste contexto, o uso do sequenciamento, vem apresentando vantagens no diagnóstico laboratorial, como aumento da sensibilidade, especificidade e velocidade. Assim, este projeto teve como objetivo realizar o sequenciamento e análise das relações filogenéticas de fungos causadores de dermatomicose. Foram utilizados no estudo um total de 10 isolados clínicos e 2 cepas de referências, identificados inicialmente apenas pela metodologia clássica. Após a extração e purificação do DNA desses isolados, foi realizada a amplificação por PCR e sequenciamento da região ITS1 e ITS2 e análise filogenética. Dos seis dermatófitos incluídos no estudo, quatro isolados identificados fenotipicamente como *T. mentagrophytes*, dois deles foram identificados genotipicamente como *T. interdigitale*. Em relação às leveduras e o fungo filamentosos não dermatófito, confirmaram com a identificação clássica. Assim, concluímos que não se exclui a eficiência da metodologia clássica, mas alerta-se sobre a necessidade de mais investigações acerca de espécies muito semelhantes, que podem estar sendo diagnosticadas erroneamente nos laboratórios de rotina.

Introdução

As dermatomicoses são doenças ocasionadas por fungos que acometem pele, unhas e pelos. Os principais agentes etiológicos das dermatomicoses são os fungos dermatófitos que compreende três gêneros: *Epidermophyton*, *Trichophyton* e

Microsporium. Com menos frequência, os fungos filamentosos não dermatófitos, como o gênero *Fusarium* e as leveduras.

Apesar da metodologia clássica de detecção fúngica ser considerada o padrão ouro no diagnóstico micológico, devido a benefícios como o baixo custo, seu uso possui limitações, pois requer um profissional com grande experiência micológica, além disso, algumas espécies pertencentes a estes gêneros são indistinguíveis morfológicamente (DE HOOG et al., 2017). O procedimento de diagnóstico perfeito deve fornecer identificação ao nível de espécie, a fim de orientar o tratamento adequado, fornecer conhecimento da provável fonte de infecção e risco de transmissão e, finalmente, os dados para estudos epidemiológicos. Assim, testes adicionais foram desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico. Entre eles, as técnicas de biologia molecular que oferecem ferramentas modernas e rápidas para melhorar o diagnóstico microbiológico tradicional (PETINATAUD et al., 2014).

Entretanto, ainda não são aceitos como critério de diagnóstico para definir doenças fúngicas, devido principalmente a uma falta de padronização dos métodos. Já existem estudos demonstrando a eficácia de metodologias moleculares na identificação de fungos dermatófitos, tais como PCR-RFLP, MALDI-TOF e sequenciamento (AHMADI et al., 2015). Esta última em particular, possui como vantagem a oportunidade de avaliar de forma mais precisa as análises filogenéticas, definindo melhor a interação do gênero *Trichophyton*, especialmente das espécies *T. interdigitale* e *T. rubrum*. Sendo assim, a técnica de sequenciamento pode ser utilizada como uma poderosa ferramenta adicional para identificar e sistematizar dermatófitos, além de ser eficiente para determinar as relações filogenéticas entre os mesmos. Então o presente estudo complementa a identificação clássica com sequenciamento, a fim de aprimorar a identificação.

Materiais e métodos

Micro-organismos

Para a realização dos experimentos, foram utilizados sete isolados clínicos de dermatófitos (CMRP2912; CMRP2916; CMRP2921; CMRP2922; CMRP2923; CMRP3004; CMRP3583) e uma cepa padrão de *T. mentagrophytes* INCQ 40004. Também foram incluídos três fungos não dermatófitos, sendo duas leveduras *Rhodotorula mucilaginosa* CMRP3462 e CMRP3463, um fungo filamentoso *Fusarium oxysporum* CMRP2925, e uma cepa padrão *R. mucilaginosa* ATCC 64684. Todos estes fungos foram identificados pelo método clássico e estão mantidos na coleção microbiológica do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Maringá e na Taxonline – Rede Paranaense de Coleções Biológicas, na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Sequenciamento e análise filogenética

A partir do crescimento fúngico em SDA, as colônias foram raspadas e recolhidas em tubos. A amplificação por PCR e o sequenciamento foram realizados das regiões ITS1-5.8S rDNA-ITS2, utilizando os primers universais ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), em um sequenciador automatizado ABI3730 (Applied Biosystems). As comparações das

regiões ITS foram realizadas por meio do GenBank e o banco de dados CBS1. Para a análise filogenética utilizou-se os *Softwares* Bioedit e Mega 7.

Resultados e Discussão

A identificação dos fungos é realizada através da metodologia clássica, que considera aspectos morfológicos e bioquímicos. Essa é a metodologia mais utilizada em laboratórios clínicos e indicada para o diagnóstico micológico, por ser confiável, de baixo custo. Entretanto, é dependente de profissionais bem treinados, além de não ser capaz de diferenciar espécies crípticas que compõem um complexo, ou seja, um grupo de espécies que são morfológicamente idênticas, porém geneticamente distintas. Neste sentido, há grande apelo para que novas metodologias sejam disponibilizadas, a fim de que o diagnóstico micológico acompanhe avanços nas áreas correlatas. Entre outras, a técnica de sequenciamento vem sendo recomendada devido a sua precisão e sensibilidade, características essenciais para identificar espécies fúngicas extremamente semelhantes morfológicamente (GARCIA GARCES; CORDEIRO; BAGAGLI, 2018). A Tabela 01 mostra os dermatófitos identificados fenotipicamente e os não dermatófitos, juntos aos isolados de referência (INCQ 40004; ATCC 64684). É importante salientar que dos quatro isolados identificados fenotipicamente como *T. mentagrophytes* (CMRP2916; CMRP2921; CMRP2922; CMRP3583), dois deles (CMRP2916 e CMRP2921) foram identificados genotipicamente como *T. interdigitale*, sendo os demais corroborando com a identificação fenotípica.

Algumas espécies identificadas fenotipicamente, porém distintas genotipicamente, foram agrupadas em complexos, como o caso das espécies *T. mentagrophytes sensu stricto* e *T. interdigitale*, as quais pertencem ao mesmo complexo, conhecido como complexo *T. mentagrophytes*. Entretanto, apesar de *T. interdigitale* pertencer ao complexo *T. mentagrophytes*, identificar a exata espécie é relevante devido às diferenças em relação a via de infecção, hospedeiro, manifestações clínicas, prevenção, tratamento e epidemiologia (GARCIA GARCES; CORDEIRO; BAGAGLI, 2018).

Tabela 01: Comparação entre a identificação fenotípica* e genotípica* de dez fungos isolados de dermatomicose em pacientes encaminhados para o setor de Micologia Médica LEPAC-UEM em um período de 2015 a 2016 e duas cepas de referência (INCQ 40004 e ATCC 64684).

Referência do isolado	Sítio de isolamento	Método de identificação		Nº GenBank
		Fenotípica	Genotípica	
INCQ 40004	pele	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	não consta
ATCC 64684	não informado	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	não consta
CMRP2912	unha	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	MG976820
CMRP2916	unha	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	não consta

CMRP2921	unha	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. interdigitale</i>	MG976819
CMRP2922	unha	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	não consta
CMRP2923	unha	<i>T. rubrum</i>	<i>T. rubrum</i>	não consta
CMRP3004	pele	<i>M. canis</i>	<i>M. canis</i>	não consta
CMRP3583	unha	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	não consta
CMRP3462	boca	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	MK453051
CMRP3463	boca	<i>R. mucilaginosa</i>	<i>R. mucilaginosa</i>	MK453052
CMRP2925	unha	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. oxysporum</i>	MG692504.1

fenotípica: macro e micromorfológica; genotípica: sequenciamento ITS

Conclusões

Dessa forma, concluímos que o diagnóstico laboratorial convencional continua sendo importante para um correto diagnóstico das dermatomicoses. Entretanto, o sequenciamento, principalmente para estudo epidemiológicos, pode ser uma importante ferramenta para distinção entre as espécies pertencentes ao mesmo complexo, pois são idênticas morfologicamente, mas distintas genotipicamente.

Agradecimentos

Agradeço à Universidade Estadual de Maringá, ao CNPq pelo fomento, ao laboratório de Micologia Médica por todo o suporte para o projeto.

Referências

AHMADI, B. et al. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. **Journal de mycologie medicale**, v. 25, n. 1, p. 29–35, mar. 2015.

DE HOOG, G. S. et al. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 5–31, fev. 2017.

GARCIA GARCES, H.; CORDEIRO, R. T.; BAGAGLI, E. PRP8 intein in dermatophytes: Evolution and species identification. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 56, n. 6, p. 746–758, 1 ago. 2018.

PETINATAUD, D. et al. Molecular diagnosis of onychomycosis. **Journal de mycologie medicale**, v. 24, n. 4, p. 287–295, dez. 2014.