



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MULTIPLEX PCR PARA
IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS
QUE ACOMETEM CÃES E GATOS**

Carlos Adriano de Santana Leal

RECIFE

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**DESENVOLVIMENTO DE UMA MULTIPLEX PCR PARA
IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS
QUE ACOMETEM CÃES E GATOS**

Carlos Adriano de Santana Leal

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Ph.D. Rinaldo Aparecido Mota

Co-Orientador: Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

RECIFE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L435d Leal, Carlos Adriano de Santana
Desenvolvimento de uma multiplex PCR para identificação das
principais espécies de dermatófitos que acometem cães e gatos /
Carlos Adriano de Santana Leal. – 2017.
48 f. : il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Coorientador: José Wilton Pinheiro Júnior.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical, Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.

1. Fungos 2. Diagnóstico 3. Animais 4. Zoonose I. Mota, Rinaldo
Aparecido, orient. II. Pinheiro Júnior, José Wilton, coorient. III. Título

CDD 636.089

FOLHA DE ASSINATURAS DA BANCA EXAMINADORA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal Tropical, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

M.Sc. Carlos Adriano de Santana Leal - Doutorando

Data de aprovação: ____/____/____

Dr. Rinaldo Aparecido Mota - Professor Titular /UFRPE

Dr^a. Débora Rochelly Alves Ferreira – Médica Veterinária Autônoma

Dr^a. Edna Michelly de Sá Santos – Professora Adjunta I /UFRPE

Dr^a Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti – Professora Substituta /UFRPE

Dr^a. Rita de Cássia Carvalho Maia - Professora Associada /UFRPE

Dedico este trabalho a minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por mais esta vitória, sem Sua presença nada disto seria possível;

Ao professor Rinaldo, mais uma vez, por abrir as portas do seu laboratório, confiando e incentivando nosso trabalho, dedicando-se do início ao fim, permitindo um crescimento imensurável não só profissional, como também pessoal;

Ao professor Leonildo (Léo) que tanto contribuiu enquanto presente;

Ao professor José Wilton (Júnior) que agregou muito conhecimento ao trabalho;

Aos meus amigos do laboratório: Pomy, Jonatas, Gabriela, André Mota, André Santos, Atzel, Débora Viegas, Débora Rochelly, Ingrid, Gláucia, Érika Samico, Érica Moraes, Givanildo, Flaviana, Sandra Santos, Renatinha (a chefe), Pedro Paulo, Paulo César (PC), Fernando Kim, que acompanharam de perto toda a jornada. Muito obrigado a todos e perdão aos que por ventura tenha esquecido de citar o nome;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Viroses, Parasitárias, Inspeção de Leite e Carne e todos que fazem parte da Área de Medicina Veterinária Preventiva do DMV/UFRPE;

A Todos os amigos que fiz e reencontrei durante este período;

À FACEPE pela concessão da bolsa que foi a única fonte de renda durante este período, sem a qual seria muito mais difícil desenvolver e concluir este trabalho.

À Micoteca URM do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco por gentilmente ceder as cepas de fungos utilizadas como controles positivos no presente trabalho.

FONTES FINANCIADORAS

FACEPE – Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco – Bolsa de Doutorado.

SUMÁRIO

1	QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	DERMATÓFITOS.....	16
2.1.1	<i>Microsporum</i>	16
2.1.1.1	<i>M. canis</i>	16
2.1.1.2	<i>M. gypseum</i>	17
2.1.2	<i>Trichophyton</i>	18
2.1.2.1	<i>T. mentagrophytes</i>	18
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.3	DERMATOFITOSE.....	20
2.4	DIAGNÓSTICO.....	21
2.5	MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS	22
3	OBJETIVOS	24
3.1	GERAL.....	24
3.2	ESPECÍFICOS.....	24
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	25
4.1	PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICROSPORUM CANIS EM AMOSTRAS DE PELOS E CROSTAS DE CÃES E GATOS.....	26
4.2	PADRONIZAÇÃO DE UMA MULTIPLEX PCR PARA DETECÇÃO DE DERMATÓFITOS EM PELOS E CROSTAS DE CÃES E GATOS	37
5	DISCUSSÃO	42
6	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Macroconídios de <i>M. canis</i>	17
Figura 2. Macroconídios de <i>M. gypseum</i>	18
Figura 3. Macroconídios em forma de charuto e hifas em espiral.....	19

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

Artigo 1

Figura1. PCR utilizando DNA de amostras clínicas positivas para dermatófitos em cultura.....	31
---	-----------

Artigo 2

Figura 1. Multiplex PCR em gel de agarose 3%.....	42
--	-----------

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Artigo 1

- Tabela 1.** Análise de concordância, sensibilidade e especificidade entre resultados da cultura e da PCR para *Microsporium canis* isolados de amostras clínicas de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE..... 30

Artigo 2

- Quadro 1.** Sequências nucleotídicas dos *primers* desenhados a partir das regiões gênicas ITS 1 e 2 e do gene 5.8S rRNA, utilizados neste estudo..... 42
- Quadro 2.** Análise de concordância, sensibilidade e especificidade obtidos entre resultados da cultura e da mPCR para *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* isolados de pelos de cães e gatos..... 42

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AFLP: Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CCB: Centro de Ciências Biológicas

DMV/UFRPE: Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

Espec.: Especificidade

Fig.: Figura

F.A: Frequência absoluta

F.R.: Frequência relativa

ITS: Espaçadores Transcritos Internos

KOH: Hidróxido de Potássio

M. canis: *Microsporium canis*

M. gypseum: *Microsporium gypseum*

mPCR: Multilex PCR

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA: DNA ribossomal

RAPD: Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RFLP: Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição

Sens.: Sensibilidade

Tab.: Tabela

T. mentagrophytes: *Trichophyton mentagrophytes*

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

RESUMO

Objetivou-se neste estudo padronizar uma reação do tipo multiplex PCR (mPCR) para detectar *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e o complexo *Trichophyton mentagrophytes* em amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos. Foram analisadas 250 amostras por meio de exame direto e cultura; o DNA destas mesmas amostras foi extraído utilizando-se o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®, Hilden - Germany). Para a PCR foram desenhados *primers* para as espécies *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* e como controle positivo da reação utilizou-se o DNA extraído de colônias de *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM 6921) e *T. mentagrophytes* (URM 6211), provenientes da Coleção de Culturas da Micoteca do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco. Padronizou-se uma PCR para detecção de *M. canis* e uma mPCR para detecção de *M. canis*, *M. gypseum* e o complexo *T. mentagrophytes*. Os protocolos padronizados neste estudo, a partir de *primers* desenhados, apresentaram boa sensibilidade e alta especificidade na detecção de *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* diretamente de amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos, viabilizando um diagnóstico mais rápido e específico, podendo ser empregados na rotina laboratorial como métodos para agilizar a detecção dos agentes estudados.

Palavras-chave: Fungos, Diagnóstico, Animais, Zoonose

ABSTRACT

The aim of this study was to standardize a multiplex PCR (mPCR) reaction to detect *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and the *Trichophyton mentagrophytes* complex in fur and/or crusts samples of dogs and cats. 250 samples were analyzed by direct examination and culture; The DNA from these samples was extracted using the DNeasy Blood & Tissue extraction kit (QIAGEN®, Hilden-Germany). For the PCR, primers were designed for the *M. canis*, *M. gypseum* and *T. mentagrophytes* species and the DNA extracted from colonies of *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM 6921) and *T. mentagrophytes* (URM 6211) from the Collection of Cultures of the Micoteca of the Mycology Department of the Biological Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, were utilized as positive controls. A PCR for the detection of *M. canis* and an mPCR for the detection of *M. canis*, *M. gypseum* and the *T. mentagrophytes* complex was standardized. The protocols standardized in this study, from drawn primers, showed good sensitivity and high specificity in the detection of *M. canis*, *M. gypseum* and *T. mentagrophytes* directly from samples of fur and/or crusts of dogs and cats, making possible a faster and specificity in the results, can be used in the laboratory routine as methods capable of speeding the detection of the agents in question.

Key words: Fungi, Diagnosis, Animals, Zoonosis

1 QUALIFICAÇÃO DO PROBLEMA

Na clínica de pequenos animais, as dermatopatias representam a maioria dos casos atendidos, podendo-se destacar as micoses, causadas principalmente por dermatófitos que são fungos capazes de invadir e se desenvolver em estruturas queratinizadas, causando dermatofitose em animais e homens (CHAVES, 2007).

A dermatofitose acomete várias espécies animais além de ser uma zoonose, onde a maioria dos casos ocorridos em humanos tem como agente etiológico *Microsporum canis*, devido ao contato direto com cães e principalmente gatos infectados que estão envolvidos em aproximadamente 50% destes casos (MULLER e KIRK, 1996; QUINN et al., 2005). Estima-se que aproximadamente 15% das dermatofitoses humanas são causadas por fungos zoofílicos (BORBA, 2010).

Fatores compreendidos desde a coleta do material biológico a ser analisado até o ambiente onde são armazenadas as placas para o cultivo e isolamento, podem interferir no desenvolvimento do agente, contribuindo para o estímulo ou inibição da expressão de determinadas características ou estruturas peculiares que identificam um fungo. Na rotina laboratorial, o diagnóstico de fungos é laborioso e em se tratando de patogênicos, o isolamento é mais difícil. Assim, técnicas que viabilizem o processo de confirmação são de grande valia (SHEHATA et al., 2008; COSTA, 2010).

A biologia molecular surge neste contexto para contribuir com a Micologia Veterinária, possibilitando a identificação mais rápida e precisa dos fungos por meio de técnicas que avaliam informações genéticas capazes de fornecer novas classificações, conceitos e contribuir com conhecimento sobre determinada área e/ou tema nunca estudado (BORMAN et al., 2008).

Desta forma, métodos moleculares vêm contribuindo de maneira significativa na identificação desses agentes e suas espécies, sobretudo a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (FAGGI et al., 2001; VERGARA et al., 2006; SHEHATA et al., 2008; BRILLOWSKA-DABROWSKA et al., 2013).

Variações da técnica da PCR, como por exemplo, o Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP), têm sido usadas para auxiliar na identificação e diferenciação de isolados que não são facilmente identificáveis pelas técnicas moleculares convencionais (GRÄSER et al., 1998; JACKSON et al., 1999; LIU et al., 2001;

SHEHATA et al., 2008; MIRZAHOSEINI et al., 2009; COSTA, 2010; BRILLOWSKA-DABROWSKA et al., 2013).

A Multiplex PCR (mPCR) é outra variação da PCR convencional utilizada no diagnóstico de microrganismos e se baseia no uso de dois ou mais pares de *primers* na mesma reação, permitindo a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA-alvo presente na amostra analisada, de maneira específica, com redução de custos e economia de tempo (SILVA, 2008).

Identificar a espécie fúngica que parasita um animal, especialmente quando se trata de um agente zoonótico, pode contribuir diretamente com a saúde humana, pois estratégias de controle e prevenção só podem ser traçadas quando se conhece o agente e a região onde ocorre com mais frequência (GUIMARÃES et al., 2010).

Com base no supracitado, o desenvolvimento ou padronização de um protocolo molecular que viabilize a detecção mais rápida e específica de fungos na micologia veterinária, onde ainda há carência de profissionais qualificados e de técnicas específicas para o diagnóstico e identificação fúngica, é de grande importância e pode contribuir muito para o avanço dos métodos de diagnóstico na clínica médica de pequenos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são um grupo de fungos hialinos, septados, pertencentes ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, subclasse Eurotiomycetidae e ordem Onygenales, que invadem e colonizam estruturas queratinizadas e semi-queratinizadas, como estrato córneo da epiderme, folículo piloso, haste do pelo e penas, causando lesões de distintas configurações caracterizadas por alopecia e descamação. Animais jovens, velhos, debilitados e imunossuprimidos são os mais suscetíveis a infecções (CAVALCANTI et al., 2002; HIBBETT et al., 2007; QUINN et al., 2005; PALUMBO et al., 2010).

Os esporos dermatofíticos chegam a suportar temperaturas de até 50°C e em se tratando de *M. canis*, hastes de pelos contendo artrosporos infectantes podem permanecer viáveis por até 18 meses no ambiente (RIBEIRO, 2005; BORBA, 2010).

Os gêneros que mais comumente causam infecção em animais são *Microsporum* e *Trichophyton*, e dentre as espécies, *M. canis*, *M. gypseum* e o complexo *T. mentagrophytes* são responsáveis pela maioria dos casos clínicos de dermatofitose em cães e gatos, podendo ser transmitidos por contato direto ou indireto (MULLER e KIRK, 1996; CAVALCANTI et al., 2002; PALUMBO et al., 2010). A sua presença indica contaminação ou infecção, haja vista que não são reconhecidamente pertencentes à microbiota normal da pele, em especial *M. canis* (RIBEIRO, 2005).

As lesões geralmente acometem a face, as orelhas, as patas e a cauda, podendo evoluir para uma cura espontânea ou para lesões generalizadas crônicas que afetam todo o corpo do animal (CAVALCANTE, 2006).

2.1.1 *Microsporum*

2.1.1.1 *M. canis*

M. canis desenvolve-se bem em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida, incubado à temperatura ambiente ou a 37°C, produzindo em uma semana, colônia cotonosa branca ou amarelada, com reverso amarelo alaranjado. Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios em formato fusiforme e equinulados, com parede celular espessa, apresentando de 6 a 15 células e apêndice de fixação (Fig. 1) (QUINN et al., 2005;

CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010). Os microconídios são piriformes e em pequeno número (CRUZ, 2010).

É um dermatófito zoofílico que, geralmente, apresenta uma fluorescência verde clara quando observado sob a lâmpada de Wood em lesões cutâneas (COPETO, 2010).



Figura 1. Macroconídios de *M. canis*.

Fonte: Arquivo pessoal

2.1.1.2 *M. gypseum*

M. gypseum cresce bem em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida, incubado à temperatura ambiente ou a 37°C, produzindo, inicialmente uma colônia filamentosa e branca, tornando-se pulverulenta com tonalidade parda ou canela, por causa da grande produção de macroconídios em superfície. O verso da colônia apresenta coloração amarelada-acastanhada a marrom-avermelhado. Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios simétricos, fusiformes com três a nove células, com parede celular fina, e septos, microconídios são escassos (Fig. 2) (QUINN et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; GIUDICE, 2008).



Figura 2. Macroconídios de *M. gypseum*.
Fonte: Arquivo pessoal

2.1.2 Trichophyton

2.1.2.1 *T. mentagrophytes*

T. mentagrophytes apresenta uma textura furfurácea ou pulverulenta em ágar Sabouraud, podendo se tornar algodonosa quando mantida em laboratório, sem relevo acentuado, formando às vezes círculos concêntricos de coloração variando de branco-amarelado a castanho-avermelhado. O reverso geralmente apresenta pigmento castanho podendo tender para o vinho. Apresenta um crescimento rápido com maturação por volta de seis a onze dias da sementeira primária (QUINN et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010).

Microscopicamente, nota-se uma exuberância de estruturas de frutificação, sendo observada geralmente grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, o que lhe confere aspecto de cacho. Quando presentes, os macroconídios mostram o aspecto semelhante a um charuto de parede fina e lisa com um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas e septadas. Observa-se, com muita frequência, grande quantidade de hifas em espiral, órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (Fig. 3) (CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010).

T. mentagrophytes é um complexo de espécies, atualmente conhecido como espécies *Trichophyton interdigitale*. *Arthroderma benhamiae* e *A. vanbreuseghemii* são duas espécies teleomórficas pertencentes a este complexo. Variedades antropofílicas como *interdigitale*,

nodulare (sinônimo *T. krajdinii*) e *goetzii*, assim como as variedades zoofílicas *granulosum* (roedores), *erinacei* (ouriço) e *quinckeanum* (camundongo) pertenciam ao complexo, no entanto, pesquisas moleculares demonstraram que as variedades antropofílicas e a var. *granulosum*, não diferiam geneticamente de *T. interdigitale*, passando a formar um conjunto de espécies *T. interdigitale*. A partir de então, o termo *T. mentagrophytes* sp. se refere a variedade *quinckeanum* e a variedade *erinacei* passou a ser considerada uma espécie distinta (NENOFF et al., 2007; MAGAGNIN, 2013).

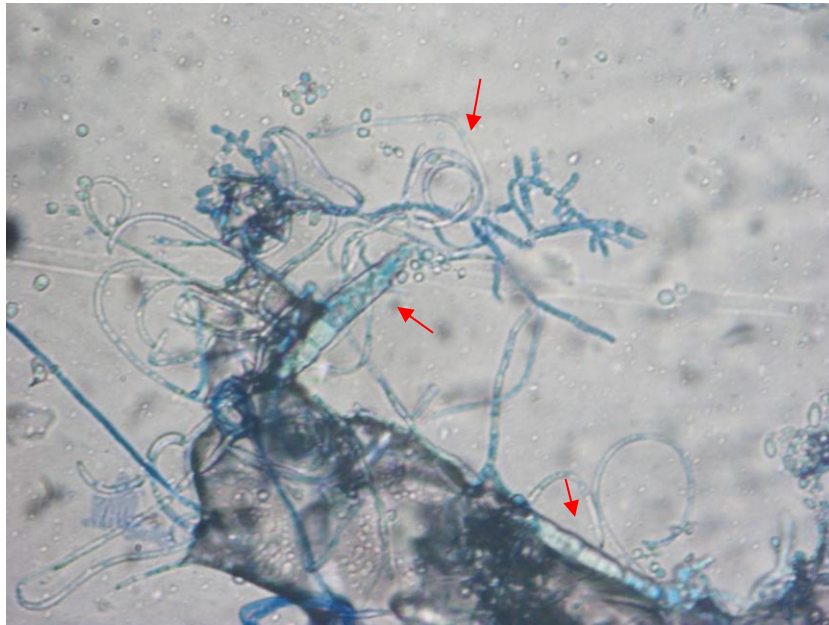


Figura 3. Macroconídios em forma de charuto e hifas em espiral.
Fonte: Arquivo pessoal

2.2. EPIDEMIOLOGIA

A dermatofitose é uma doença infecciosa com elevada prevalência na América Latina e está entre as zoonoses mais comuns do mundo, sendo considerado o terceiro distúrbio de pele mais frequente em crianças menores de 12 anos e o segundo da população adulta (PINHEIRO et al., 1997). Fato que pode estar relacionado ao estreito contato entre a espécie humana e os animais domésticos (COSTA et al., 1994).

Apesar de sua prevalência ser baixa em diversos países da Europa e Estados Unidos, no Brasil cerca de 13% dos casos atendidos no Hospital Veterinário da UFRRJ correspondem a dermatofitoses; em São Paulo a prevalência chega a 30% das dermatopatias em gatos (OLIVEIRA et al., 2011). Dados de incidência e prevalência variam em função do clima e dos reservatórios naturais (CAVALCANTE, 2006).

Microsporum canis é referido como o principal agente causador de dermatofitose, sendo o de maior ocorrência em cães e gatos, bem como o principal responsável pelas infecções dermatofíticas zoofílicas em seres humanos (CHAVES, 2007).

É um dos agentes que mais acometem pessoas e cães nas dermatofitoses e é o responsável por 50 a 75% dos casos em cães e 85 a 98% em gatos (BORBA, 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Em algumas cidades e países a casuística de *M. canis* é muito elevada e atualmente em certas regiões do mundo a predominância deste agente nos casos de dermatofitose em humanos, demonstra a importância desta zoonose (FERREIRO et al., 2007).

2.3. DERMATOFITOSE

É caracterizada por lesões que podem ser localizadas, multifocais ou generalizadas, podendo haver prurido, de mínimo a discreto e ocasionalmente intenso e se manifestam como áreas circulares de alopecia, irregular a difusa, com diferentes graus de descamação, eritema, pápulas, crostas, seborreia e paroníquia ou onicodistrofia (MULLER e KIRK, 1996; PALUMBO et al., 2010; HNILICA, 2012).

As lesões em gatos geralmente ocorrem nas extremidades e na cabeça, com descamação e crostas com e sem alopecia, podendo evoluir para uma cura espontânea ou para lesões generalizadas crônicas que afetam todo o corpo do animal, estas últimas podem ocorrer principalmente em cães imunossuprimidos (CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010). Em cães, as lesões consistem de combinações de pápulas, pústulas, com alopecia focal ou dispersa, descamação e crostas, reações em Kérion celsi geralmente são encontradas na face e podem mimetizar piodermites e furunculoses (CAVALCANTE, 2006; PRADO, 2007).

Em cães e gatos é uma doença folicular e os sinais clínicos são essencialmente um reflexo da foliculite do pelo e posterior inflamação, sendo o prurido variável em intensidade e muitas vezes indistinguível quando comparada com quadros de demodicose ou ainda com a piodermite bacteriana (CAVALCANTE, 2006). O período de incubação pode variar entre sete e 28 dias (CRUZ, 2010).

As infecções por *M. gypseum* ocorrem ocasionalmente em cães e raramente em gatos. A fluorescência à lâmpada de Wood não é observada para essa espécie de dermatófito (CAVALCANTE, 2006). Produz lesões na maioria das vezes crostosas e quase sempre isoladas (CRUZ, 2010).

As infecções por *T. mentagrophytes* ocorrem regularmente em cães e ocasionalmente em gatos (CAVALCANTE, 2006). Esta espécie já foi isolada praticamente de todos os animais e apresenta lesões que não fluorescem à lâmpada de Wood (CRUZ, 2010).

2.4. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da dermatofitose inicia-se com o histórico do paciente, avaliação das lesões, colheita de material para microscopia direta, com ou sem o auxílio da lâmpada de Wood, culminando com o cultivo em placas (padrão ouro). Também pode ser utilizada a biopsia, porém mesmo com essa variedade de métodos disponíveis, o diagnóstico laboratorial da dermatofitose ainda representa uma grande dificuldade na rotina da clínica veterinária (CAVALCANTI et al., 2002; CHAVES, 2007).

A lâmpada de Wood possibilita identificar possíveis lesões causadas por dermatófitos, devido a uma fluorescência verde-amarelada emitida pelos filamentos de algumas espécies, pela presença da pteridina, mas para tanto é necessário que o animal esteja em um ambiente escuro e que a lâmpada tenha sido aquecida por um período de cinco a 10 min. (CARLOTTI e PIN, 2004; CRUZ, 2010).

Porém em apenas 50 a 60% dos casos é evidenciada a fluorescência e é preciso ter cuidado com “falsos positivos” decorrentes do uso de produtos tópicos ou da coloração azulada das escamas ou amarelada das crostas ou ainda da presença de outros microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, por isso este tipo de exame deve ser considerado apenas como auxiliar (CARLOTTI e PIN, 2004; CRUZ, 2010).

Da qualidade do material coletado e da forma como é acondicionado e enviado depende o sucesso do diagnóstico laboratorial. O material a ser enviado deve ser colhido das bordas da lesão por meio de pinça, arrancamento (avulsão) ou lâmina de bisturi estéril, não sendo necessária uma raspagem profunda, pois o fungo se encontra no extrato córneo e nos pelos. Recomenda-se o acondicionamento em papel limpo, que diminui a umidade e evita o crescimento de contaminantes que podem atrapalhar o diagnóstico (CRUZ, 2010).

Cruz (2010) cita que independente do resultado obtido no exame microscópico direto, obrigatoriamente deve-se fazer o cultivo do material em meio seletivo para isolamento e identificação do agente etiológico.

A identificação é feita principalmente pela macroscopia das colônias e pelo aspecto microscópico de macroconídios (QUINN et al., 2005)

2.5. MÉTODOS MOLECULARES PARA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS

Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas na identificação laboratorial de espécies de dermatófitos, sendo consideradas mais estáveis e precisas do que aquelas que se baseiam nas características fenotípicas. Dentre elas cita-se a PCR, que é uma técnica simples e rápida (SHEHATA et al, 2008). Porém, no que se refere à diferenciação intraespecífica, os resultados não são satisfatórios, devido à grande semelhança genética (GIUDICE, 2008).

A PCR é uma técnica rápida e versátil para a amplificação de segmentos de DNA a partir de uma fonte que contenha apenas uma molécula do DNA alvo. É considerada uma reação em cadeia porque o DNA sintetizado no primeiro ciclo torna-se molde para a síntese de novas fitas nos ciclos seguintes (OLIVEIRA e HENKES, 2002).

A cada ciclo o número de fragmentos amplificados é duplicado, e conseqüentemente, após 30 ciclos, uma molécula é amplificada mais de um bilhão de vezes. A PCR é realizada em três etapas, *desnaturação* que é realizada a uma temperatura próxima a 95°C, *anelamento* que ocorre entre 40 e 70°C e *extensão* geralmente a 72°C, repetidas em média por 25 a 30 ciclos (RODRIGUES et al., 2006).

Segundo Kanbe (2008), várias técnicas baseadas em DNA mitocondrial, e dentre elas cita-se a RFLP, que é uma variação da PCR onde fragmentos são gerados a partir da utilização de enzimas de restrição, já foram utilizadas para identificação de dermatófitos ao longo dos anos, demonstrando sensibilidade e especificidade além de rapidez no diagnóstico.

Pesquisas mostraram que a digestão enzimática com *MvaI* em produtos amplificando a região ITS (Internal Transcribed Spacer) produz padrões de fragmentos únicos e facilmente identificáveis para a maioria das espécies de dermatófitos (GIUDICE, 2008; LEMSADDEK, 2008; SHEHATA et al., 2008).

O estudo da região ITS (sequências intergênicas) pode ser de grande importância para a identificação de espécies de dermatófitos, no entanto, o uso desta técnica para biotipagem das espécies ainda é limitado, por que nenhuma variação intraespecífica foi encontrada (GIUDICE, 2008; COPETO, 2010).

De acordo com Lemsaddek (2008), as regiões ITS estão localizadas entre a subunidade 18S do DNA ribossomal (rDNA), o gene 5,8S (ITS 1) e a porção 28S (ITS 2), e por conter regiões altamente conservadas e regiões variáveis é que o rDNA foi escolhido para estudos que visam identificação e diferenciação de espécies de dermatófitos.

Segundo Fungaro (2001), a região 18S é a mais conservada e é utilizada para comparação entre microrganismos, enquanto que a porção 28S por ser a mais variável é

apropriada para comparação entre gêneros e espécies. As regiões ITS são relativamente curtas (500 a 800pb) por serem delimitadas por segmentos conservados e o fato de aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade.

Vários pesquisadores lançaram mão de outra variação da PCR, a Multiplex PCR (mPCR) e relataram maior sensibilidade e/ou especificidade quando comparada com a primeira (BRILLOWSKA-DABROWSKA et al. 2007, KIM et al., 2011; DHIB et al., 2014; MEHLIG et al. 2014, SPILIOPOULOU et al. 2015),

A mPCR é uma variação da PCR convencional empregada de maneira crescente nos últimos anos. Utilizando mais de um par de *primers* na mesma reação, possibilita a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA-alvo, promovendo uma análise mais ampla, mais rápida e mais barata (SILVA, 2008).

Desde sua introdução, a mPCR tem sido aplicada com sucesso em muitas áreas de diagnóstico de DNA, incluindo análise de deleção, mutação e polimorfismo, análise quantitativa e detecção de RNA (SILVA, 2008).

No entanto, pesquisas objetivando a utilização de tais técnicas para a detecção dos agentes dermatófitos em animais ou em amostras provenientes dos mesmos ainda são escassas.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Desenvolver uma Multiplex PCR para detectar *M. canis*, *M. gypseum* e o complexo *T. mentagrophytes* em pelos e/ou crostas de cães e gatos.

3.2 ESPECÍFICOS

- Desenhar *primers* específicos para as espécies *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (complexo) e testá-los utilizando DNA extraído de cultura pura e de amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos, positivas e negativas, previamente identificadas em cultura;
- Padronizar o protocolo Multiplex PCR a partir dos *primers* desenhados;
- Avaliar Sensibilidade e Especificidade da Multiplex PCR;
- Verificar o grau de concordância entre as técnicas utilizadas (cultura e mPCR).

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

Formatado e submetido ao **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**

1 **PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE**
2 **MICROSPORUM CANIS EM AMOSTRAS DE PELOS E CROSTAS DE CÃES E**
3 **GATOS**

4 **STANDARDIZATION OF A PCR FOR MOLECULAR DIAGNOSIS OF**
5 **MICROSPORUM CANIS IN SAMPLES OF FUR AND CRUSTS OF DOGS AND**
6 **CATS**

7
8 **Resumo**

9 Objetivou-se neste estudo padronizar um protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase
10 (PCR) para detecção de *Microsporium canis* em amostras de pelos e/ou crostas de cães e
11 gatos. Foram seleccionadas 48 amostras previamente identificadas por meio de cultura.
12 Destas, 23 foram positivas para dermatófitos no cultivo. Padronizou-se a PCR a partir de
13 *primers* desenhados para o alvo *M. canis*. 61% (14/23) das amostras positivas para
14 dermatófitos foram identificadas como *M. canis* em cultura. Deste total, 71,4% (10/14)
15 apresentaram um fragmento de 218 pb compatível com o esperado para a espécie fúngica
16 alvo desta reação. Observou-se uma sensibilidade de 71,4% e especificidade de 100% na
17 PCR, além de uma boa concordância entre estas técnicas de diagnóstico (*Kappa*: 0,78;
18 $p < 0,0001$). O protocolo utilizado neste estudo apresentou alta especificidade na detecção
19 de *M. canis* diretamente de amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos, viabilizando
20 um diagnóstico mais rápido e específico, podendo este protocolo ser empregado como
21 um método confirmatório para agilizar a detecção de *M. canis*.

22
23 **Palavras-chave:** animais de companhia, biologia molecular, diagnóstico, fungos

24
25 **Abstract**

26 The aim of this study was to standardize a Polymerase Chain Reaction protocol (PCR)
27 for the detection of *Microsporium canis* in fur and/or crusts of dogs and cats. 48 samples
28 previously identified by culture were selected. Of these, 23 were positive for
29 dermatophytes in culture. PCR was standardized from drawn primers whose target is *M.*
30 *canis*. 61% (14/23) of the dermatophyte positive samples were identified as *M. canis* in
31 culture. Of this total, 71.4% (10/14) presented a fragment of 218 bp compatible with that
32 expected for the fungal species target of the reaction. A sensitivity of 71.4% and

33 specificity of 100% in the PCR were observed, in addition to a good agreement between
34 the techniques (Kappa: 0.78; $p < 0.0001$). The protocol used in this study showed high
35 specificity in the detection of *M. canis* directly from fur and/or crusts of dogs and cats,
36 making possible a faster and more specific diagnosis. This protocol could be used as a
37 confirmatory method, speeding the detection of *M. canis*.

38

39 **Keywords:** Pets, molecular biology, diagnosis, fungi

40

41 **Introdução**

42 A dermatofitose acomete várias espécies animais além de ser uma zoonose, onde
43 a maioria dos casos relatados em humanos tem como agente causador *Microsporum*
44 *canis*, devido ao contato direto com cães e principalmente gatos infectados que estão
45 envolvidos em aproximadamente 50% dos casos (Muller e Kirk, 1996; Quinn et al., 2005).
46 É considerável o aumento no número de casos de dermatofitoses humanas causadas por
47 fungos zoofílicos nos últimos anos (Brilhante et al., 2000; Brillowska-Dabrowska et al.,
48 2013).

49 A identificação laboratorial dos dermatófitos depende do seu crescimento em
50 meio de cultura apropriado e devidamente suplementado, avaliação minuciosa de seus
51 aspectos macro e micromorfológicos, além de profissionais capacitados. Um
52 desenvolvimento atípico da colônia pode resultar em um acréscimo no tempo de
53 identificação ou resultado falso-negativo. Estes fatores podem ocasionar um diagnóstico
54 tardio ou errôneo (Coelho et al., 2008; Shehata et al., 2008; Cruz, 2010).

55 Métodos moleculares têm sido desenvolvidos e vêm contribuindo de maneira
56 significativa na identificação desses agentes e suas espécies, sobretudo a técnica da
57 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser uma técnica sensível, específica e rápida
58 (Faggi et al., 2001; Vergara et al., 2006; Shehata et al., 2008; Brillowska-Dabrowska et
59 al., 2013).

60 Variações da PCR também tem sido utilizadas na tentativa de padronizar uma
61 técnica para viabilizar um diagnóstico mais rápido e específico, principalmente quando
62 se refere a micologia humana (Gräser et al., 1998; Jackson et al., 1999; Faggi et al., 2001;
63 Liu et al., 2001; Shehata et al., 2008; Mirzahoseini et al., 2009; Brillowska-Dabrowska et
64 al., 2013), no entanto, em relação à micologia veterinária há carência de profissionais

65 qualificados, de técnicas específicas para o diagnóstico e identificação fúngica, além da
66 escassez na publicação de artigos científicos, pois na maioria das vezes os artigos citam
67 amostras de animais como parte da pesquisa e não como objetivo principal da mesma
68 (Faggi et al., 2001; Cano et al., 2005).

69 Dessa forma, uma PCR capaz de detectar um agente zoonótico em nível de espécie
70 e envolvido na maioria dos casos de dermatofitose humana e animal utilizando apenas
71 amostras biológicas, é de grande importância para o diagnóstico em medicina veterinária,
72 como também para medicina. Para tanto, objetivou-se neste estudo padronizar um
73 protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detectar *Microsporum canis*
74 em amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos.

75

76 **Material e Métodos**

77 A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais
78 Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco-DMV/UFRPE. O projeto foi
79 submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade
80 Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil (Licença nº 003/2014).

81 Para padronização da PCR para *M. canis* foram utilizadas 48 amostras de pelos
82 e/ou crostas de cães e gatos, sendo 23 positivas e 25 negativas para dermatófitos na
83 técnica de cultivo.

84 Todas as 48 amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar dextrose
85 Sabouraud, adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. As placas
86 foram incubadas em temperatura ambiente (25-27°C) e examinadas diariamente por até
87 cinco semanas (Cruz 2010).

88 O DNA das 48 amostras de pelos e crostas foi extraído utilizando-se o kit de
89 extração DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®, Hilden - Germany) de acordo com o
90 seguinte protocolo: em um tubo tipo *eppendorf* contendo 180µL de tampão ATL foram
91 acrescentados os pelos e/ou crostas e homogeneizados em vortex por 15 segundos; em
92 seguida foram adicionados 20µL de proteinase K, homogeneizados rapidamente no
93 vortex e incubados em banho seco com agitação à 56°C por 1h e 1500 rpm; foram
94 acrescentados, após este período, 4µL de RNase à suspensão, que foi homogeneizada e
95 incubada em temperatura ambiente por 5 minutos; e em seguida levada ao vortex e

96 adicionados 200µL de tampão AL, vortex, em seguida adicionados 200µL de etanol (96-
97 100%) e novamente a solução foi homogeneizada no vortex.

98 Foram preparados tubos de coleta acoplados aos filtros (embalagens individuais)
99 e transferidos 600µL ou o que se conseguiu do conteúdo do tubo anterior, para nova
100 centrifugação a 6080xg/1 minuto; logo após o tubo de coleta (a parte de baixo) foi
101 trocado e adicionados 500µL do tampão AW1 e realizada outra centrifugação a 6080xg/1
102 minuto. Novamente o tubo de coleção foi substituído e 500µL do tampão AW2 foi
103 adicionado e realizou-se outra centrifugação a 18630xg/3min.; a parte de baixo ou tubo
104 de coleta foi substituído por um tubo tipo *ependorf*® (1,5mL) devidamente identificado
105 com 100µL do tampão AE.

106 Os tubos foram, então, incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e em
107 seguida centrifugados a 6080xg/1 minutos; o filtro (coluna) foi retirado e descartado e os
108 tubos devidamente identificados foram acondicionados no freezer (-20°C).

109 Os *primers* foram desenhados e analisados por meio de ferramentas
110 disponibilizadas no GenBank/NCBI. Após as avaliações, os *primers* escolhidos foram:
111 Mc Fw: 5' CCTCCCCAGTAACCACCCA 3' e Mc Rv: 5'
112 GCATATCAATAAGCCGGAGG 3' que amplificam um fragmento de 218 pb.

113 As reações de amplificação do DNA foram otimizadas para um volume final de
114 12,5µL, contendo: ~ 1,5 ng (2,5µL) de DNA genômico; 0,5µL de cada *primer* a 10µM;
115 2,75µL de Água Mili-Q ultrapura e 6,25µL de Top Taq™ Master Mix (QIAGEN®, Hilden
116 – Germany). Foi utilizado como controle negativo água ultrapura e como controles
117 positivos, o DNA extraído de colônias de *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM
118 6921) e *T. mentagrophytes* (URM 6211), provenientes da Coleção de Culturas - Micoteca
119 URM – Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade
120 Federal de Pernambuco (CCB/UFPE).

121 O protocolo térmico padronizado foi o seguinte: desnaturação inicial a 94°C por
122 7 minutos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por
123 30 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C por 6 minutos.

124 Após a amplificação, o produto de PCR foi corado com *Blue Green Loading Dye*
125 *I* (LGC Biotecnologia), plotado em gel de agarose 3% e colocado em cuba de eletroforese
126 com tampão Tris-acetato-EDTA (1X) (Amresco®) para posterior visualização sob a luz
127 ultravioleta e fotodocumentação.

128 Para o estudo de concordância entre a cultura fúngica e a PCR utilizou-se o
 129 coeficiente de Kappa (K) e a interpretação dos valores de K adotados foram: 0,00 - 0,20
 130 = concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa;
 131 0,81- 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00
 132 (Landis e Koch, 1977). Para o cálculo de concordância utilizou-se o programa
 133 computacional Bioestat versão 5.0 (Ayres et al., 2007).

134

135 Resultados

136 Das 23 amostras previamente identificadas na cultura como dermatófitos, 14
 137 foram *M. canis*, quatro *M. gypseum*, três *T. mentagrophytes*, um *M. nanum* e um
 138 *Trichophyton* sp.

139 Das 14 amostras identificadas como *M. canis* na cultura, em 10 (71,4%) observou-se
 140 um fragmento de 218 pb compatível com o esperado para a espécie fúngica alvo da
 141 reação.

142 Na Tab. 1 estão os resultados obtidos após análise estatística comparativa entre
 143 cultura e PCR para *M. canis*. A Fig. 1 demonstra um fragmento de 218 pb, amplificado a
 144 partir do DNA extraído de uma amostra de pelo previamente identificada em cultura como
 145 positiva para *M. canis*.

146

147 Tabela 1. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade entre resultados da
 148 cultura e da PCR para *Microsporum canis* isolados de amostras clínicas de
 149 cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE.

150

PCR	Exame Microbiológico				Valor de P	Kappa (K)	Sens. (%)	Espec. (%)
	Positivo		Negativo					
	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)				
Positivo	10	100,0	-	-	<0,0001	0,78	71,4	100,0
Negativo	4	10,5	34	89,5				

151 F.A.: Frequência absoluta; F.R.: Frequência relativa; Sens.: Sensibilidade; Espec.: Especificidade.

152

153

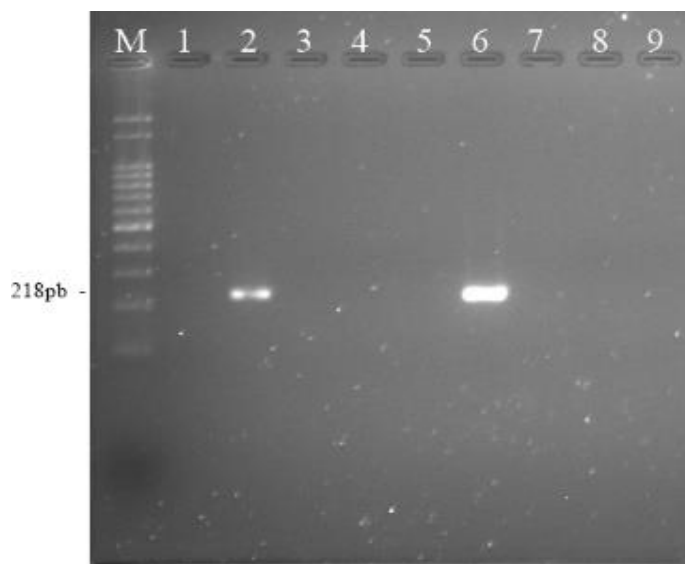


Figura 1. PCR utilizando DNA de amostras clínicas positivas para dermatófitos em cultura. Gel de agarose 3%. M: Marcador de peso molecular 100pb (LGC biotecnologia); 1: *T. mentagrophytes*; 2: *M. canis*; 3: *M. gypseum*; 4: *Trichophyton* sp.; 5: *M. nanum*; 6: *M. canis* (URM 6273); 7: *M. gypseum* (URM 6921); 8: *T. mentagrophytes* (URM 6211); 9: Controle negativo

Discussão

Após a padronização do protocolo de PCR utilizando as 48 amostras clínicas, verificou-se a amplificação somente das amostras identificadas como *M. canis*, demonstrando alta especificidade dos *primers* desenhados, onde mesmo tendo como base o DNA de outros fungos e até mesmo de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero não houve anelamento por parte dos iniciadores (Fig. 1).

Comparando-se os resultados da cultura fúngica com os da PCR, observou-se uma sensibilidade de 71,4% e uma especificidade de 100%, demonstrando a aplicabilidade deste protocolo, evidenciado também pelo valor do *Kappa* (0,78) que segundo Landis e Koch (1977) revela uma boa concordância entre as técnicas.

Diferente do nosso estudo, Liu et al. (2001) desenvolveram uma PCR *M. canis* específica, porém utilizaram DNA extraído de colônias de dermatófitos e não-dermatófitos, isoladas a partir de amostras biológicas humanas, assim como de cepas ATCC. No protocolo estabelecido neste estudo, utilizamos o DNA extraído diretamente das amostras de pelos de cães e gatos, o que pode dificultar o processo de detecção do agente, pois além da quantidade e qualidade de DNA extraído ser inferior, segundo Rodrigues et al. (2006), compostos orgânicos e inorgânicos, além de substâncias como bile e sais, também podem inibir a PCR em amostras biológicas como tecido animal.

180 Brillowska-Dabrowska et al. (2013) desenvolveram uma PCR *M. canis* específica
181 e observaram 100% de sensibilidade e especificidade, utilizando 130 isolados clínicos de
182 dermatófitos, 10 leveduras ou fungos miceliais, 12 amostras de pelo e pele de animais
183 (cobaias) com ou sem infecção experimental por *M. canis* e 35 amostras de pacientes
184 humanos, incluindo sete amostras positivas para *M. canis* e 15 amostras negativas para
185 dermatófitos, demonstrando a aplicabilidade desta PCR para a detecção do agente na
186 rotina laboratorial.

187 Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas para a identificação laboratorial
188 de espécies de dermatófitos, sendo consideradas mais estáveis, rápidas e precisas do que
189 aquelas que se baseiam nas características fenotípicas (Gutzmer et al., 2004; Shehata et
190 al, 2008).

191 Machouart-Dubach et al. (2001), comparando a cultura com a PCR-RFLP
192 utilizando amostras clínicas, observaram que 74 das 75 amostras analisadas foram
193 concordantes nos resultados em ambas as técnicas, considerando a técnica molecular
194 adequada para o diagnóstico rápido da dermatofitose.

195 Vergara et al. (2006) também padronizaram uma técnica de PCR para o
196 diagnóstico de dermatófitos e observaram uma concordância de 93,3% entre os resultados
197 obtidos na PCR e aqueles obtidos com os métodos tradicionais de diagnóstico, quando
198 analisaram 30 cepas pertencentes a esse grupo de fungos, no entanto, quando analisaram
199 o DNA de 30 amostras clínicas (pele, unha e pelos) positivas e negativas, em cultura, de
200 pacientes humanos com infecção ativa, observaram 100% de concordância entre os
201 resultados obtidos, o que sugeriu que a PCR é uma técnica que oferece grandes vantagens
202 na identificação dos fungos dermatófitos.

203 Estas vantagens vão desde a redução no tempo para obtenção do resultado, pois
204 possui uma sensibilidade e especificidade similar à cultura, redução de custos,
205 considerando que um diagnóstico precoce e específico pode evitar um tratamento tardio
206 ou ineficiente ou um prolongamento do mesmo.

207 Outro ponto a ser destacado é que a dermatofitose é uma zoonose e há relatos de
208 insensibilizações por parte de *M. canis* à Terbinafina (Brillowska-Dabrowska et al.,
209 2013), ou seja, o desenvolvimento de técnicas que visem o diagnóstico preciso e precoce
210 de espécies fúngicas com potencial zoonótico, não só irá contribuir para a clínica médica
211 veterinária como também para a saúde pública.

212 **Conclusão**

213 O protocolo padronizado neste estudo apresentou uma alta especificidade na
214 detecção de *M. canis* diretamente de amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos,
215 viabilizando um diagnóstico mais rápido e específico, podendo ser empregado como um
216 método confirmatório capaz de agilizar a detecção do agente em questão.

217 **Agradecimentos**

218 À Micoteca do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de
219 Pernambuco, pelas cepas gentilmente cedidas.

220 **Referências**

- 221 AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. BioEstat 5.0:
222 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM;
223 CNPq, 2007. 364 p.
- 224 BRILHANTE, R.S.N.; PAIXÃO, G.C.; SALVINO, L.K. et al. Epidemiologia e
225 ecologia das dermatofitoses na cidade de Fortaleza: o *Trichophyton tonsurans* como
226 importante patógeno emergente da Tinea capitis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33, n.5,
227 p.417-425, 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822000000500002>
- 228 BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; MICHALEK, E.; SAUNTE, D.M.L. et al. PCR
229 test for *Microsporum canis* identification. *Med. Mycol.*, v.51, n.6, p.576–579, 2013.
230 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.755741>
- 231 CANO, J.; REZUSTA, A.; SOLÉ, M. et al. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as
232 a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J. Dermatol. Sci.*, v.39, p.17-
233 21, 2005.
- 234 COELHO, A.C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em
235 animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, n.4,
236 p.1017-1020, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352008000400035>
- 237
- 238 CRUZ, L.C.H. Dermatófitos. In: Micologia Veterinária. 2nd ed. Rio de Janeiro:
239 Revinter; 2010. p. 111-142.
- 240 FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E. et al. Application of PCR to Distinguish Common
241 Species of Dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, v.39, n.9, p.3382–3385, 2001.
242 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.9.3382-3385.2001>

- 243 GRÄSER, Y.; EL FARI, M.; PRESBER, W. et al. Identification of common
244 dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain
245 reactions. *Br. J. Dermatol.*, v.138, n.4, p.576-582, 1998. Disponível em:
246 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9640360>
- 247 GUTZMER, R.; MOMMERT, S.; KÜTTLER, U. et al. Rapid identification and
248 differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J.*
249 *Medical Microbiol.*, v.53, n.12, p.1207–1214, 2004. Disponível em:
250 <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45779-0>
- 251 JACKSON, C.J.; BARTON, R.C.; EVANS, E.G.V. Species identification and strain
252 differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer
253 regions. *J. Clin. Microbiol.*, v.37, n.4, p.931-936, 1999. Disponível em:
254 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88627/pdf/jm000931.pdf>
- 255 LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical
256 data. *Biometrics*, v.33, n.1, p.159-174, 1977.
- 257 LIU, D.; PEARCE, L.; LILLEY, G. et al. A specific PCR assay for the dermatophyte
258 fungus *Microsporum canis*. *Med. Mycol.*, v.39, n.2, p.215–219, 2001. Disponível em:
259 doi: <http://dx.doi.org/10.1080/mmy.39.2.215.219>
- 260 MACHOUART-DUBACH, M.; LACROIX, C.; CHAUVIN, M.F. et al. Rapid
261 discrimination among dermatophytes, scytalidium spp., and other fungi with a per-
262 restriction fragment length polymorphism ribotyping method. *J. Clin. Microbiol.*, v.39,
263 n.2, p.685–690, 2001. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.2.685-](http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.2.685-690.2001)
264 [690.2001](http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.2.685-690.2001)
- 265 MIRZAHOSEINI, H.; OMIDINIA, E.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M. et al.
266 Application of PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic
267 Dermatophytes from Clinical Specimens. *Iran. J. Public Health*, v.38, n.1, p.18-24,
268 2009. Disponível em: <http://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/3206>
- 269 MULLER, G.H.; KIRK, R.W. Dermatologia de pequenos animais. Danny W. Scott,
270 William H. Miller, Jr., Craig E. Griffin; tradução [da 5. ed. original] Cid Figueiredo.
271 Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1130p.
- 272 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E. et al. Dermatofitos. In: Microbiologia
273 veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005. p. 224-228.

274 RODRIGUES, J.J.S.; SILVA, R.C.; SIQUEIRA, M.M. Técnicas de Biologia Molecular
275 Aplicadas ao Diagnóstico. In: ROSSETI, M.L.; SILVA, C.M.D.; RODRIGUES, J.J.S.
276 Doenças Infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.
277 p. 16-40.

278 SHEHATA, A.S.; MUKHERJEE, P.K.; ABOULATTA, H.N. et al. Single-Step PCR
279 Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and
280 Strains. *J. Clin. Microbiol.*, v.46, n.8, p.2641–2645, 2008. Disponível em:
281 <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00697-08>

282 VERGARA, C.C.; PARCHA, C.; PINEDA, J.; ARENAS, E.R. Estandarización de una
283 Técnica de Amplificación Genómica (PCR) para el Diagnóstico de Dermatofitos. *Cienc.*
284 *Trab.*, v.8, n.22, p.167-171, 2006.

285
286
287
288
289

4.2 ARTIGO 2

Formatado e submetido à **Pesquisa Veterinária Brasileira**

Padronização de uma multiplex PCR para detecção de dermatófitos em pelos e crostas de cães e gatos¹

Carlos A. de S. Leal^{2*}, Pomy de C. P. Kim², Jonatas C. de Almeida², Renata P. B. de Melo², André de S. Santos², Débora C. V. Lima², José W. Pinheiro Júnior², Rinaldo A. Mota²

ABSTRACT.- Leal C.A.S., Kim P.C.P., Almeida J.C., Melo R.P.B., Santos A.S., Lima D.C.V., Pinheiro Júnior J.W. & Mota R.A. 2017. [Standardization of a PCR multiplex for the detection of dermatophytes in dogs and cats fur and crusts.] Padronização de uma multiplex PCR para detecção de dermatófitos em pelos e crostas de cães e gatos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: c_adrianosl@hotmail.com

The aim of this study was to standardize a multiplex PCR (mPCR) reaction to detect *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and the *Trichophyton mentagrophytes* complex in dog and cat fur and/or crusts. 250 fur and/or crusts samples from dogs and cats were analyzed by direct examination and culture, DNA from them was extracted for mPCR. Primers were designed and the DNA extracted from colonies of *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM 6921) and *T. mentagrophytes* (URM 6211) from the Collection of Cultures - URM Micoteca - Department of Mycology, Biological Sciences Center of the Federal University of Pernambuco (CCB / UFPE). As negative controls, sterile distilled water and DNA extracted from *Alternaria* sp., were used to verify the specificity of the primers. Of the total samples analyzed, 15 (6%) were identified in culture as dermatophytes, and of these, 10 were *M. canis*, three *M. gypseum* and two *T. mentagrophytes* (complex). Of these 15 positive samples, 11 (73.3%) were detected by mPCR. Besides these, six others, negative in culture, were identified as *M. gypseum*. There was good agreement between culture results and mPCR (Kappa: 0.66). The protocol standardized in this study can be used as a screening method, because it has a sensitivity greater than that of the culture, used in parallel to the routine exams, allowing a diagnosis in a shorter time.

INDEX TERMS: Internal Transcribed Spacers, keratin, *loci*, mycosis

RESUMO.- Objetivou-se padronizar uma reação do tipo multiplex PCR (mPCR) para detectar *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e o complexo *Trichophyton mentagrophytes* em amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos. 250 amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos foram analisadas por meio de exame direto e cultura, o DNA das mesmas foi extraído para mPCR. *Primers* foram desenhados e como controle positivo da reação utilizou-se o DNA extraído de colônias de *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM 6921) e *T. mentagrophytes* (URM 6211), provenientes da Coleção de Culturas - Micoteca URM - Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE). Como controles negativos de reação, utilizou-se água destilada esterilizada e DNA extraído de *Alternaria* sp. para verificar a especificidade dos *primers*. Do total de amostras analisadas, 15 (6%) foram identificadas, em cultura, como dermatófitos, e destas, 10 foram *M. canis*, três *M. gypseum* e dois *T. mentagrophytes* (complexo). Destas 15 amostras positivas, 11 (73,3%) foram detectadas por meio da mPCR. Além destas, seis outras, negativas em cultura, foram identificadas como *M. gypseum*. Verificou-se uma boa concordância entre os resultados da cultura e mPCR (Kappa: 0,66). O protocolo padronizado neste estudo pode ser utilizado como um método de triagem, por apresentar uma sensibilidade maior que a da cultura, usado paralelamente aos exames de rotina, permitindo um diagnóstico em menor tempo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Espaçadores Transcritos Internos, queratina, *loci*, micose

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

² Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência: c_adrianosl@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma das dermatopatias mais comuns na clínica veterinária e humana, causada por um grupo de fungos que possuem a capacidade de invadir e se desenvolver em estruturas queratinizadas e semiqueratinizadas, os dermatófitos (Liu et al. 2000, Cavalcanti et al. 2002, Liu et al. 2002).

Os gêneros de dermatófitos mais envolvidos em infecções em animais são *Microsporium* e *Trichophyton* (Muller & Kirk 1996, Quinn et al. 2005). Ainda, de acordo com Balda et al. (2004), *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e o complexo *Trichophyton mentagrophytes* são os principais agentes etiológicos das dermatofitoses em cães e gatos, pois são dotados de alta infectividade e baixa patogenicidade e virulência.

A identificação laboratorial dos dermatófitos depende do seu crescimento em meio de cultura apropriado, devidamente suplementado, para só após, serem avaliados seus aspectos morfológicos macro e microscópicos, no entanto, essa identificação pode ser dificultada devido a não produção de macroconídios, estruturas chave neste processo (Shehata et al. 2008).

Além disso, espécies fúngicas nunca antes isoladas, podem vir a parasitar animais de companhia que passaram a dividir espaço com animais exóticos introduzidos nos lares, o que vai exigir técnicas mais específicas e profissionais mais qualificados (Kim et al. 2011).

Alguns métodos moleculares foram desenvolvidos e vêm contribuindo de maneira significativa na identificação desses agentes e suas espécies, sobretudo a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser sensível, específica e rápida (Faggi et al. 2001).

Variações desta técnica, têm sido usadas no auxílio da identificação e diferenciação de isolados que não são facilmente identificáveis por meio das técnicas laboratoriais e moleculares convencionais (Gräser et al. 1998, Jackson et al. 1999, Liu et al. 2001, Shehata et al. 2008, Mirzahoseini et al. 2009, Brillowska-Dabrowska et al. 2013, Leal et al. 2017).

A Multiplex PCR (mPCR) é outra variação da PCR convencional utilizada no diagnóstico de microrganismos, que se baseia no uso de dois ou mais pares de *primers* na mesma reação, permitindo a amplificação simultânea de mais de uma sequência de DNA-alvo presente na amostra analisada, de maneira específica, barateando e deixando a análise mais ampla e com economia de tempo (Silva 2008).

Multiplex PCRs foram desenvolvidas e utilizadas para identificação de espécies de dermatófitos utilizando DNA extraído de culturas e diretamente de amostras de raspados de pele em humanos (Brillowska-Dabrowska et al. 2007, Kim et al. 2011, Dhib et al. 2014, Mehlig et al. 2014, Spiliopoulou et al. 2015), demonstrando o potencial da técnica, no entanto, pesquisas que tenham por objetivo o desenvolvimento deste tipo de técnica para a detecção de dermatófitos em animais, são escassas (Kano et al. 2003, Cafarchia et al. 2013, Dabrowska et al. 2014).

Objetivou-se neste estudo padronizar uma reação do tipo multiplex PCR (mPCR) para detecção de *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* em amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da pesquisa e amostragem. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco-DMV/UFRPE. O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil (Licença nº 003/2014).

Neste estudo foram analisadas 250 amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos, com dermatopatias, atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE e encaminhadas ao laboratório para diagnóstico.

Exame direto. Utilizou-se o hidróxido de potássio (KOH) (30%) para clarificação dos pelos e escamas, objetivando a identificação de estruturas de parasitismo e artroconídios (Muller & Kirk 1996).

Cultura. Todas as 250 amostras foram cultivadas, independente do resultado do exame direto, em placas de Petri contendo ágar dextrose Sabouraud, adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. As placas foram incubadas em ambiente de aerobiose em temperatura ambiente (25-27°C) e examinadas diariamente por até cinco semanas (Cruz 2010).

Extração do DNA. O DNA das 250 amostras foi extraído utilizando-se o *kit DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN®, Hilden – Germany) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante para tecidos em geral, com algumas modificações: o protocolo recomenda um tempo máximo de incubação, em banho seco com agitação (1500 rpm) à 56°C, de 40 minutos, por se tratar de um grupo de fungos que possui quitina na parede celular; este tempo foi aumentado para 1h; outro acréscimo feito ao protocolo foi a adição, após este período, de 4µL de RNase à suspensão, visando a purificação do DNA; outra modificação realizada foi a redução do volume da solução tampão AE (eluente) de 200µL para 100µL, já que a quantidade de DNA fúngico presente na amostra do pelo ou crosta é pequena.

Como controle positivo da reação utilizou-se o DNA extraído das colônias de *M. canis* (URM 6273), *M. gypseum* (URM 6921) e *T. mentagrophytes* (URM 6211), provenientes da Coleção de Culturas - Micoteca URM – Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CCB/UFPE).

Como controles negativos de reação, utilizou-se água destilada esterilizada e DNA extraído de *Alternaria* sp. para verificar a especificidade dos *primers*.

Desenho dos primers. Foram selecionadas sequências de referência para as espécies alvo a partir de um estudo no banco virtual (GenBank/NCBI) da região ITS, na sua porção mais variável, utilizando-se o programa *Primer 3* do NCBI que sugeriu sequências compostas de 18 a 25 bases para serem empregadas como iniciadores, respeitando-se as condições para que uma reação de Multiplex PCR possa ser realizada. Estes fragmentos foram testados quanto à especificidade pelo alinhamento local (BLAST/NCBI) frente às sequências nucleotídicas de inúmeros organismos depositados no “GenBank”. O software *OligoAnalyzer1.0.3* também foi utilizado para verificação de possíveis alinhamentos inespecíficos.

Após todas as análises, os *primers* foram selecionados e estão demonstrados no Quadro 1.

Amplificação do DNA. As reações de amplificação do DNA foram otimizadas para um volume final de 15 µL, contendo: ~1,5 ng (3 µL) de DNA genômico; 0,25 µL de cada *primer* (três pares) a 10 µM (Tab. 1); 3 µL de Água ultrapura e 7,5 µL de Top Taq™ Master Mix (QIAGEN®, Hilden – Germany).

O protocolo térmico utilizado para a amplificação foi o seguinte: desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos seguida por 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos, finalizando com uma extensão final a 72°C por 6 minutos. Após a amplificação, o produto de PCR foi plotado em gel de agarose 3%, corado com *Blue Green LoadingDye 1* (LGC Biotecnologia) e colocado em cuba de eletroforese com tampão Tris-acetato-EDTA (1X) (Amresco®) para posterior visualização sob a luz ultravioleta e fotodocumentação.

Análise estatística. Para o estudo de concordância entre os testes foi utilizado o coeficiente *Kappa* (*K*) e a interpretação convencional dos valores *K* adotada foi: 0,00 – 0,20 = concordância fraca; 0,21 – 0,40 = regular; 0,41 – 0,60 = moderada; 0,61 – 0,80 = boa; 0,81 – 1,00 = muito boa. Valores negativos foram interpretados como equivalentes a 0,00 (Landis & Koch 1977). Também foram realizados cálculos de sensibilidade e especificidade conforme Pereira (2003).

Para o cálculo de concordância foi utilizado o programa computacional Bioestat versão 5.0 (Ayres et al. 2007).

RESULTADOS

Das 250 amostras analisadas, 15 (6%) foram identificadas, em cultura, como dermatófitos, e destas, 10 foram *M. canis*, três *M. gypseum* e duas como pertencentes ao complexo *T. mentagrophytes*.

Destas 15 amostras positivas, 11 (73,3%) foram detectadas por meio da mPCR, e além destas, seis outras, negativas em cultura, foram identificadas como *M. gypseum*.

No poço 12 foram incluídos, no mesmo tubo, os três pares de *primers* desenhados e o DNA das três espécies pesquisadas (mix de DNAs), acrescidos do DNA de *Alternaria* sp., que serviu como um segundo controle negativo. Após eletroforese foi possível verificar a amplificação de todos os fragmentos que correspondiam a detecção dos fungos presentes na amostra.

O Quadro 2 apresenta as análises estatísticas dos resultados observados na cultura e na mPCR. A figura 1 demonstra os diferentes fragmentos amplificados no protocolo padronizado.

DISCUSSÃO

Na Figura 1 observam-se as reações de amplificação do tipo Multiplex PCR para *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (complexo), que segundo Rodrigues et al. (2006), é aquela na qual vários *loci* são amplificados ao mesmo tempo e no mesmo frasco, proporcionando economia de tempo, reagentes e dando mais rapidez ao resultado.

As regiões ITS além de serem relativamente curtas, aparecem em grande número de cópias no genoma e isto pode ser verificado nos resultados obtidos. Isto confirma que os *amplicons* observados (Fig. 1) tratam-se realmente de sequências contidas na região-alvo (ITS 1 e 2) utilizada em vários estudos moleculares para diferenciação entre espécies de fungos (Fungaro 2001).

Kim et al. (2011) desenharam três pares de *primers* visando desenvolver uma mPCR para detectar onze espécies de dermatófitos em DNA extraído de raspados de pele de pacientes humanos com diagnóstico clínico de dermatofitose. No entanto, foram necessárias três reações, em separado, com protocolos térmicos individualizados, para em conjunto, identificar o fungo presente na amostra analisada. Fato que não ocorreu no nosso estudo, onde foi possível diferenciar as três espécies pesquisadas numa única reação e inclusive detectar as mesmas, presentes simultaneamente.

Outro ponto que difere este protocolo daquele desenvolvido por Kim et al. (2011) é o volume final de cada reação, onde padronizaram 50µL para cada reação, logo, em três reações diferentes, necessárias para a identificação do fungo, totaliza-se 150µL, sendo dez vezes maior que o volume final padronizado neste trabalho.

Dhib et al. (2014) também desenvolveram uma mPCR com o objetivo de identificar e diferenciar espécies do complexo *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* em tineas e onicomicoses humanas, a partir dos iniciadores desenhados. Da mesma forma que a anterior, a reação ocorre em três etapas e o volume total da reação também foi de 50µL por etapa, totalizando 150µL.

Outras pesquisas foram desenvolvidas utilizando a mPCR em comparação com técnicas de rotina para detecção de espécies de dermatófitos diretamente de amostras clínicas humanas (Brillowska-Dabrowska et al. 2007, Mehlig et al. 2014, Spiliopoulou et al. 2015), e em todas observou-se um aumento da sensibilidade nos resultados, fato também verificado neste estudo, onde seis amostras de DNA extraído de pelos, que em cultura tiveram resultado negativo, apresentaram um fragmento compatível com *M. gypseum*.

Este protocolo padronizado, atendeu a todos os pré-requisitos citados por Rodrigues et al. (2006), onde além de economizar tempo e reagentes, conseguiu diferenciar as três espécies pesquisadas numa reação única e ainda elevou a sensibilidade no diagnóstico, comprovando ser uma ferramenta de grande utilidade na rotina laboratorial.

Dhib et al. (2014), recomendaram a utilização da mPCR, devido a sua alta sensibilidade, também em casos onde a cultura é negativa ou ocorre contaminação da mesma, dificultando ou impossibilitando a identificação do agente patogênico.

Dessa forma, o desenvolvimento de protocolos moleculares capazes de detectar a presença de agentes causadores de enfermidades, principalmente zoonóticas, de forma mais rápida numa amostra encaminhada para análise, pode contribuir bastante para o avanço da área estudada, assim como para o tratamento e controle das mesmas.

E em se tratando do estreito contato dos cães e gatos com os humanos e da escassez de pesquisas na área da micologia veterinária, pesquisas como estas, são de grande importância para a saúde animal e, porque não dizer, para saúde humana também.

CONCLUSÃO

O protocolo padronizado neste estudo pode ser utilizado como um método de triagem, por apresentar uma sensibilidade maior que a da cultura, usado paralelamente aos exames de rotina, permitindo um diagnóstico preciso em menor tempo.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida e à Micoteca do Centro de Ciências Biológicas da UFPE pelas cepas gentilmente cedidas.

REFERÊNCIAS

- Ayres M., Ayres Júnior M., Ayres D.L. & Santos A.S. 2007. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: MCT; IDSM; CNPq. 364 p.
- Balda A.C., Larsson C.E., Otsuka M. & Gambale W. 2004. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Acta Sci. Vet. 32(2):133-140.
- Brillowska-Dabrowska A., Michalek E., Saunte D.M.L., Nielsen S.S. & Arendrup M.C. 2013. PCR test for *Microsporium canis* identification. Med. Mycol. 51(6):576-579. doi: 10.3109/13693786.2012.755741
- Brillowska-Dabrowska A., Saunte D.M. & Arendrup M.C. 2007. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum*. J. Clin. Microbiol. 45(4):1200-1204. doi:10.1128/JCM.02072-06
- Cafarchia C., Gasser R.B., Figueredo L.A., Weigl S., Danesi P., Capelli G. & Otranto D. 2013. An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis. Med. Mycol. 51:136-143. doi: 10.3109/13693786.2012.691995
- Cavalcanti J.N., Guerra J.L., Gambale W., Corrêa B. & Paula C.R. 2002. Histopathologic and mycologic aspects of experimental infection of guinea pigs with *Microsporium canis*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 39(5):238-243.
- Cruz LCH. 2010. Dermatofitos. In: Micologia Veterinária. 2. ed., Revinter, Rio de Janeiro, 111-142.
- Dabrowska I., Dworecka-Kaszak B. & Brillowska-Dabrowska A. 2014. The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets. Acta Biochim. Pol. 61(2):375-378.
- Dhib I., Fathallah A., Yaacoub A., Hadj Slama F., Said M.B. & Zemni R. 2014. Multiplex PCR assay for the detection of common dermatophyte nail infections. Mycoses. 57(1):19-26. doi:10.1111/myc.12096
- Faggi E., Pini G., Campisi E., Bertellini C., Difonzo E. & Mancianti F. 2001. Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. J. Clin. Microbiol. 39(9):3382-3385.
- Fungaro MHP. 2001. PCR na micologia: diagnóstico e análise de variabilidade. Biotecnologia Cienc. Desenvolv. 14:12-16.
- Gräser Y., El Fari M., Presber W., Sterry W. & Tietz H-J. 1998. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. Brit. J. Dermatol. 138(4):576-582.
- Jackson C.J., Barton R.C. & Evans E.G.V. 1999. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J. Clin. Microbiol. 37(4):931-936.

- Kano R., Hirai A., Muramatsu M., Watari T. & Hasegawa A. 2003. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. *J. Vet. Med. Sci.* 65(2):267-270.
- Kim J.I., Choe Y.B., Ahn K.J. & Lee Y.W. 2011. Identification of Dermatophytes Using Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Ann. Dermatol.* 23(3):304-312. doi: 10.5021/ad.2011.23.3.304
- Landis J.R. & Koch G.G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 33(1):159-174.
- Leal C.A.S., Kim P.C.P., Mota A.R., Lima D.C.V., Gomes A.L.V., Pinheiro Júnior J.W., Silva L.B.G. & Mota R.A. 2017. PCR-RFLP: uma alternativa a cultura (padrão Ouro) no diagnóstico de dermatófitos em cães e gatos. *Pubvet.* 11(2):181-186.
- Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J. A specific PCR assay for the dermatophyte fungus *Microsporum canis*. *Med Mycol.* 2001; 39(2):215-219. doi: 10.1080/mmy.39.2.215.219
- Liu D., Coloe S., Baird R. & Pedersen J. 2000. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.* 49(6):493-497. doi: 10.1099/0022-1317-49-6-493
- Liu D., Pearce L., Lilley G., Coloe S., Baird R. & Pedersen J. 2002. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J. Med. Microbiol.* 51(2):117-122. doi: 10.1099/0022-1317-51-2-117
- Mehlig L., Garve C., Ritschel A., Zeiler A., Brabetz W., Weber C. & Bauer A. 2014. Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses.* 57:27-34. doi:10.1111/myc.12097
- Mirzahoseini H., Omidinia E., Shams-Ghahfarokhi M., Sadeghi G. & Razzaghi-Abyaneh M. 2009. Application of PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic Dermatophytes from Clinical Specimens. *Iran. J. Public. Health.* 38(1):18-24.
- Muller G.H. & Kirk R.W. 1996. *Dermatologia de pequenos animais*. Danny W. Scott, William H. Miller, Jr., Craig E. Griffin; tradução [da 5. ed. original] Cid Figueiredo, Interlivros, Rio de Janeiro, 1130p.
- Pereira MG. 2003. *Epidemiologia Teoria e Prática*. 7a. reimp. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 596p.
- Quinn P.J., Markey B.K., Carter M.E., Donnelly W.J. & Leonard F.C. 2005. Dermatofitos. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Artmed, Porto Alegre, 224-228.
- Rodrigues J.J.S., Silva R.C. & Siqueira M.M. 2006. Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao diagnóstico. In: Rosseti M.L., Silva C.M.D., Rodrigues J.J.S. *Doenças infecciosas: diagnóstico molecular*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 16-40.
- Shehata A.S., Mukherjee P.K., Aboulatta H.N., El Akhras A.I., Abbadi S.H. & Ghannoum M.A. 2008. Single-Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. *J. Clin. Microbiol.* 46(8):2641-2645.
- Silva M.A. 2008. Utilização de pcr multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. Belo Horizonte, Brasil, 32p. (M. Sc. Dissertation. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais).
- Spiliopoulou A., Bartzavali C., Jelastopulu E., Anastassiou E.D. & Christofidou M. 2015. Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. *J. Med. Microbiol.* 64:25-31. doi 10.1099/jmm.0.079962-0

Legendas das Figuras

Figura 1. Multiplex PCR em gel de agarose 3%. M: Marcador molecular 100pb (LGC biotecnologia); 1, 3, 5, 7, 9, 11 e 13: poços vazios; 2: *M. canis* (URM 6273); 4: *M. gypseum* (URM 6921); 6: *T. mentagrophytes* (URM 6211); 8: *Alternaria* sp.; 10: controle negativo (H₂O destilada esterilizada); 12: reação multiplex (mix DNA).

Quadro 1. Sequências nucleotídicas dos *primers* desenhados a partir das regiões gênicas ITS 1 e 2 e do gene 5.8S rRNA, utilizados neste estudo.

Nome do <i>Primer</i>	Sequência 5' → 3'	Espécie fúngica identificada
A. ben. Fw	AGGGATCAACGTTCCATCAG	<i>T.</i>
A. ben. Rv	TTTGCTTGCTAACGCTCAGA	<i>mentagrophytes</i>
M. c. Fw	CCTCCCCAGTAACCACCCA	<i>M. canis</i>
M. c. Rv	CCTCCGGCTTATTGATATGC	
M. g. Fw	CCACACGCCCATTTCTTGTCT	<i>M. gypseum</i>
M. g. Rv	GTCCTAGAGGCGTTGGTTTG	

Quadro 2. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade obtida entre resultados da cultura e da mPCR para *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* isolados de pelos de cães e gatos.

mPCR	Exame Microbiológico				Valor de P	<i>Kappa</i> (K)	Sens. (%)	Espec. (%)
	Positivo		Negativo					
	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)				
Positivo	11	64,7	6	35,3	<0,0001	0,66	73,3	97,4
Negativo	4	1,7	229	98,3				

F.A.: Frequência absoluta- F.R.: Frequência relativa- **Sens.:** Sensibilidade- **Espec.:** Especificidade.

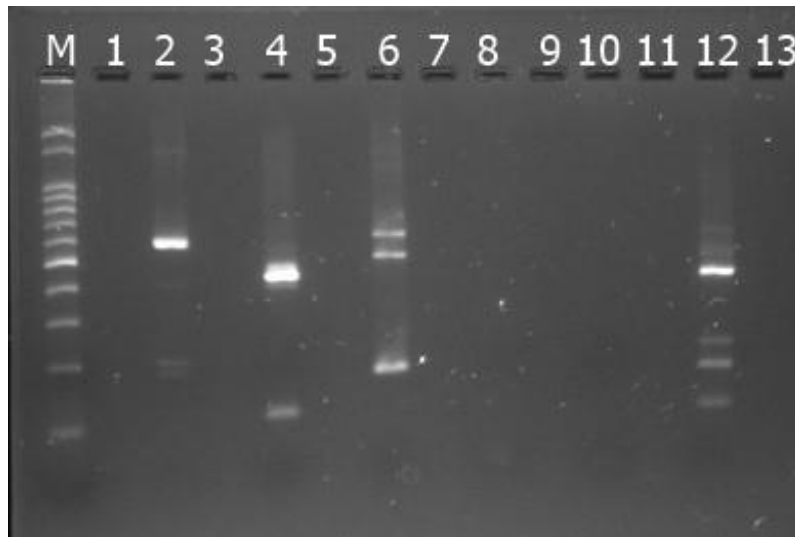


Figura 1.

5 DISCUSSÃO

Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas para a identificação laboratorial de espécies de dermatófitos, sendo consideradas mais estáveis, rápidas e precisas do que aquelas que se baseiam nas características fenotípicas (GUTZMER et al., 2004; SHEHATA et al., 2008). Características estas que podem sofrer influência do ambiente onde a cultura está sendo mantida e da composição do meio de cultura, fazendo com que estruturas reprodutivas importantes não sejam produzidas.

A PCR e suas variações, estão contribuindo muito para o avanço das pesquisas nas diversas áreas do conhecimento.

As técnicas padronizadas neste estudo, mostraram grande potencial para aplicação na rotina laboratorial, diminuindo o tempo de espera por um resultado, aumentando a sensibilidade diagnóstica, especificando o resultado e reduzindo custos para o mesmo.

Segundo Nunes et al. (2015), na prática é rara a existência de um teste ideal (100% de sensibilidade e especificidade), pois geralmente estes valores são inversamente proporcionais.

E apesar de priorizarem a especificidade, a mPCR apresentou uma maior sensibilidade quando comparada a cultura, o que a torna uma opção de triagem interessante para a rotina laboratorial, quando se fala em amostras oriundas da clínica de cães e gatos.

Mudanças climáticas, deslocamentos de pessoas e animais dentro do país e para fora ou para dentro dele, podem favorecer o surgimento ou ressurgimento de enfermidades nunca antes diagnosticadas ou já há muito tidas como erradicadas em determinado local.

Portanto, técnicas capazes de detectar um determinado agente, de maneira rápida e específica, podem contribuir de forma essencial para o desenvolvimento de políticas de controle e prevenção, além de agilizar o diagnóstico, permitindo um tratamento direcionado.

6 CONCLUSÃO

Os protocolos padronizados neste estudo, a partir de *primers* desenhados apresentaram alta sensibilidade e especificidade na detecção de *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* diretamente de amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos, viabilizando um diagnóstico mais rápido, podendo ser empregados na rotina laboratorial como métodos capazes de agilizar a detecção dos agentes em questão.

REFERÊNCIAS

- BORBA, L. A. Coloração de esporos em pelos na dermatofitose e comparação de técnicas de diagnóstico. 2010. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- BORMAN, A. M.; LINTON, C. J.; MILES, S.-J.; JOHNSON, E. M. (2008) Molecular identification of pathogenic fungi. *J Antimicrob Chemoth*, 61(1):i7–i12. doi:10.1093/jac/dkm425
- BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; MICHALEK, E.; SAUNTE, D.M.L.; NIELSEN, S.S.; ARENDRUP, M.C. (2013) PCR test for *Microsporium canis* identification. *Med Mycol*, 51(6):576–579. doi: 10.3109/13693786.2012.755741
- CARLOTTI, D.-N.; PIN, D. (2004) Diagnóstico dermatológico: avaliação clínica e exames imediatos. São Paulo: Roca, 99p.
- CAVALCANTE, C. S. P. Caracterização das dermatofitoses canina e felina e manutenção de cepas dermatofíticas *in vitro*. 2006. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- CAVALCANTI, J.N.; GUERRA, J.L.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B.; PAULA, C.R. (2002) Histopathologic and mycologic aspects of experimental infection of guinea pigs with *Microsporium canis*. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 39(5):238-243.
- CHAVES, L. J. Q. Dermatomicoses em cães e gatos: avaliação do diagnóstico clínico-laboratorial e dos aspectos epidemiológicos em uma população de portadores de lesões alopecias circulares. 2007. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- COPETO, S. C. M. F. Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses. 2010. 116 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa.
- COSTA, E. O.; DINIZ, L. S. M.; COUTINHO, S. D.; CARVALHO, V. M.; DUTRA, L. F.; SERRA, E. G. (1994) Surtos interespecíficos de dermatomicoses por *Microsporium canis* e *Microsporium gypseum*. *Rev Saúde Pública*, 28(5):337-340.
- COSTA, F. V. A. Determinação da variabilidade genotípica entre isolados de *Microsporium canis*. 2010. 63p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- CRUZ, L. C. H. (2010) Dermatofitos. In: *Micologia Veterinária*. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, p. 111-142.
- FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; BERTELLINI, C.; DIFONZO, E.; MANCIANTI, F. (2001) Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. *J Clin Microbiol*, 39(9):3382–3385.

FERREIRO L., SANCHES E.M.C., SPANAMBERG A., FERREIRA R.R., MACHADO M.L.S., ROEHE C., PEREIRA S.A., SCHUBACH T.M.P.; SANTURIO J.M. (2007) Zoonoses micóticas em cães e gatos. *Acta Sci Vet*, 35(supl. 2): s296-s299.

FUNGARO, M. H. P. (2001) PCR na micologia: diagnóstico e análise de variabilidade. *Biociencia Cienc Desenvolv*, 14:12-16.

GRÄSER, Y.; FARI, M. EL; PRESBER, W.; STERRY, W.; TIETZ, H-J. (1998) Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Brit J Dermatol*, 138(4):576-582.

GIUDICE, M. C. Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporium gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil. 2008. 119 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GUIMARÃES, F.F.; BAPTISTA, A.A.S.; MACHADO, G.P; LANGONI, H. (2010) Ações da vigilância epidemiológica e sanitária nos programas de controle de zoonoses. *Vet. Zootec*. 17(2):151-162.

GUTZMER R, MOMMERT S, KÜTTLER U, WERFEL T, KAPP A. (2004) Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *J Medical Microbiol*, 53(12):1207–1214. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.45779-0>

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LÜCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KÖLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K.; LICHTWARDT, R.; MOZLEY-STANDRIDGE, J. S.; OBERWINKLER, F.; PARMASO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHÜBLER, V.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WESS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y.; ZHANG, N. (2007) A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, 111:509-547.

HNILICA, K. A. (2012) *Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico*. 3. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 632p.

JACKSON, C.J.; BARTON, R.C.; EVANS, E.G.V. (1999) Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J Clin Microbiol*, 37(4):931-936.

KANBE, T. (2008) Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166(5-6):307–317.

LEMSADDEK, A. Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. 2008. 218 f. Tese (Doutorado em Biologia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.

LIU, D.; PEARCE, L.; LILLEY, G.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J.(2001) A specific PCR assay for the dermatophyte fungus *Microsporum canis*. *Med Mycol*, 39(2):215–219. doi: 10.1080/mmy.39.2.215.219

MAGAGNIN, C. M. Caracterização fenotípica e genotípica de isolados clínicos de *trichophyton* sp. do estado do Rio Grande do Sul. 2013. 56 f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MIRZAHOSEINI, H.; OMIDINIA, E.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; SADEGHI, G.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. (2009) Application of PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic Dermatophytes from Clinical Specimens. *Iran J Public Health*, 38(1):18-24.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W. (1996) *Dermatologia de pequenos animais*. Danny W. Scott, William H. Miller, Jr., Craig E. Griffin; tradução [da 5. ed. original] Cid Figueiredo. – Rio de Janeiro: Interlivros, 1130p.

NENOFF, P.; HERRMANN, J.; GRÄSER, Y. (2007) Trichophyton mentagrophytes sive interdigitale? A dermatophyte in the course of time. *J Dtsch Dermatol Ges*, 5(3):198-202. doi: 10.1111/j.1610-0387.2007.06180.x

NUNES, A. A.; MARTINEZ, E. Z.; ANA, L. W.; PAZIN-FILHO, A.; COELHO, E. B.; MELLO, L. M. (2015) Testes diagnósticos no contexto da avaliação de tecnologias em saúde: abordagens, métodos e interpretação. *Medicina (Ribeirão Preto)*.48(1): 8-18. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v48i1p8-18>

OLIVEIRA, J. F. C.; HENKES, L. E. 2002. Marcadores moleculares em reprodução animal. *In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 261-279.

OLIVEIRA, V. L.; ALVES, C. L. D.; PEREIRA, M. L.; CARDENES, K. M. v. d. H. (2011) Ocorrência de *Microsporum canis* em felinos sadios atendidos no Hospital Veterinário da Unidade 3 da Faculdade Anhanguera de Campinas. *Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente*, 13(16):57- 66.

PALUMBO, M. I. P.; MACHADO, L. H. A.; PAES, A. C.; MANGIA, S. H.; MOTTA, R. G. (2010) Estudo epidemiológico das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP –Botucatu. *Semina Ciênc Agrar*, 31(2):459-468.

PINHEIRO, A. Q.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C. (1997) Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30(4):287-294.

PRADO, M. R. Isolamento de *Microsporum canis*, *Malassezia* spp. e *Candida tropicalis* em cães: um destaque para teste de sensibilidade de *Malassezia pachydermatis* *in vitro*. 2007. 159

p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. (2005) Dermatofitos. In: Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed, p. 224-228.

RIBEIRO, E. A. Frequência de fungos dermatofitos em gatos (*Felis catus*) infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência felina. 2005. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração: Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.

RODRIGUES, J. J. S.; SILVA, R. C.; SIQUEIRA, M. M. (2006) Técnicas de Biologia Molecular aplicadas ao diagnóstico. In: ROSSETI, M. L.; SILVA, C. M. D.; RODRIGUES, J. J. S. Doenças infecciosas: diagnóstico molecular. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 16-40.

SHEHATA, A. S.; MUKHERJEE, P. K.; ABOULATTA, H. N.; EL AKHRAS, A. I.; ABBADI, S. H.; GHANNOUM, M. A. (2008) Single-Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. J Clin Microbiol, 46(8):2641-2645.

SILVA, M. A. Utilização de pcr multiplex para o diagnóstico etiológico da mastite bovina. 2008. 32p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

VERGARA, C.C.; PARCHA, C.; PINEDA, J.; ARENAS, E.R. (2006) Estandarización de una Técnica de Amplificación Genómica (PCR) para el Diagnóstico de Dermatofitos. Cienc Trab, 8(22):167-171.