

## **Avaliação de método molecular para diagnóstico das dermatofitoses**

Rafaela Rodrigues de Lima<sup>1</sup>,

<sup>1</sup> Instituto Lauro de Souza Lima, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo,  
Bauru-SP

**Resumo:** Os dermatófitos são fungos filamentosos, hialinos, septados que possuem tropismo por estruturas queratinizadas, causando infecções na pele, pelo e unhas, denominadas dermatofitoses. Estas se manifestam com lesões crônicas e de difícil tratamento. A OMS estima que 25% da população mundial seja acometida por dermatófitos. Métodos de diagnóstico molecular baseados na detecção do DNA fúngico têm sido desenvolvidos com a vantagem de serem mais rápidos, sensíveis e específicos. O diagnóstico precoce e assertivo das dermatofitoses deve prevenir a evolução dos casos e tratamentos desnecessários. Este estudo propõe testar um método para diagnóstico molecular de dermatofitoses de baixo custo e de fácil execução. O diagnóstico é baseado em duas reações de PCR, que permitirão a identificação das espécies pertencentes aos três gêneros: *Epidermophyton*, *Trichopyton* e *Microsporum*. Sessenta e sete amostras com suspeita de dermatofitose do laboratório de micologia do Instituto Lauro de Souza Lima foram testadas. O método de extração testado mostrou bom rendimento e baixa pureza. Modificações foram testadas a fim de melhorar a pureza do DNA, no entanto, o ratio 260/280nm não pode ser melhorado, o que possivelmente impediu o funcionamento das PCRs. Mudanças no método de coleta do material do paciente têm potencial para melhorar estes resultados.

**Palavras-chave:** Dermatofitoses; Diagnóstico molecular; PCR.

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL: Laboratório de Saúde Pública

AREA DE CONCENTAÇÃO: Micologia

ORIENTADOR: Ana Carla Pereira Latini

COORIENTADOR: Maria Izilda Andrade, Priscila Bettoni Ballalai Mangilli

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO  
INSTITUTO "LAURO DE SOUZA LIMA"

L628a LIMA, Rafaela Rodrigues.

Avaliação de método molecular para diagnóstico das dermatofitoses  
/ Rafaela Rodrigues Lima, Bauru, 2019.  
13 f.; il.

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento  
Profissional em Laboratório de Saúde Pública da Secretaria de Estado da  
Saúde do Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dra. Ana  
Carla Pereira Latini e coorientação de Maria Izilda Andrade e Priscila  
Bettoni Ballallai Mangilli.

1. Dermatofitoses. 2. Diagnóstico molecular. 3. PCR. I. Latini, Ana  
Carla Pereira. II. Andrade, Maria Izilda. III. Mangilli, Priscila Bettoni  
Ballallai. IV. Título.

WR310

## Introdução

As dermatofitoses, ou micoses superficiais, são as maiores causas de infecções fúngicas em todo o mundo, afetando diretamente a qualidade de vida do portador. Geralmente são causadas por fungos pertencentes ao grupo dos dermatófitos, os quais têm afinidade por estruturas queratinizadas (pêlo/cabelo, unha e pele).<sup>1</sup>

Os microrganismos que causam as dermatofitoses pertencem aos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. O gênero *Microsporum* abrange as espécies *M. canis*, *M. gypseum*, *M. audouinii*, *M. cookei* e *M. nanum*; *Trichophyton* compreende as espécies *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. schoenleinii*, *T. violaceum* e *T. verrucosum*; e o gênero *Epidermophyton* têm apenas uma espécie de importância, o *Epidermophyton floccosum*.<sup>1</sup> Os dermatófitos são fungos filamentosos, e se distribuem em antropofílicos, geofílicos e zoofílicos, sendo o *T. rubrum* o mais isolado em casos de infecções cutâneas.

A gravidade da infecção causada por estas espécies depende das características do patógeno e fatores socioeconômicos relacionados ao hospedeiro e condições ambientais.<sup>2</sup> As lesões recebem a denominação em latim, de *tinea*, seguido do sítio anatômico afetado. As modalidades dermatofíticas mais relevantes são: *tinea capitis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea unguium*, *tinea barbae*, *tinea manuum* e *tinea pedis*. A transmissão se dá pelo contato direto com pessoas e animais infectados ou, indiretamente, por fômites contaminados.<sup>3,4,5</sup> O quadro clínico geralmente inclui despigmentação, placas anulares, perda de cabelo e prurido.<sup>6</sup>

As infecções por dermatófitos, embora não sejam causa importante de morbimortalidade, têm consequências clínicas substanciais já que causam lesões cutâneas crônicas e de difícil tratamento, que impactam na auto-estima e na qualidade de vida do paciente, gerando até mesmo discriminação social.<sup>7,8</sup> É considerado um importante problema de saúde pública, principalmente por causarem infecções invasivas em pacientes imunodeprimidos.<sup>9,10</sup> Estima-se que 20 a 25% da população mundial seja afetada por micoses superficiais, das quais os dermatófitos são os mais comumente encontrados.<sup>11</sup>

Os métodos convencionais para diagnóstico de dermatofitoses têm baixa especificidade e sensibilidade, e são demorados, devido ao crescimento e esporulação. Os testes fisiológicos de rotina, como por exemplo, o da urease, podem levar de duas a quatro semanas.<sup>12</sup> Além disso, entre 19 e 50% de amostras microscopicamente positivas não crescem em cultura. As espécies de dermatófitos mostram um nível em comum de variação na expressão de características fenotípicas, por exemplo, a formação de conídios, que pode gerar dúvida ou confusão na hora de diferenciar o agente etiológico.<sup>13</sup>

Métodos de diagnóstico molecular baseados na detecção do DNA fúngico têm sido desenvolvidos, com a vantagem de serem mais sensíveis, específicos e rápidos do que as técnicas convencionais utilizadas na rotina, como o exame direto com KOH e culturas em meio Sabouraud dextrose e Mycosel.<sup>14</sup> É importante ressaltar que estes testes são capazes de detectar elementos fúngicos mesmo na presença de uso de medicamentos, que configura uma vantagem importante devido a alta frequência de automedicação nestes casos.<sup>15</sup>

O presente trabalho propõe a validação de um método molecular fácil, rápido e de baixo custo, para detecção de agentes causadores de dermatofitoses diretamente da amostra de pacientes atendidos no laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima, na cidade de Bauru-SP.

## **Materiais e métodos**

Todos os participantes do estudo foram encaminhados ao Laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima com suspeita de dermatofitose, após atendimento médico ambulatorial, no período entre setembro e dezembro de 2018. Os pacientes foram submetidos à coleta do material da lesão de cabelo, pele ou unha de acordo com procedimento operacional padrão, por profissional treinado do laboratório. Parte da amostra coletada foi separada para o teste molecular, sem prejuízo para o diagnóstico convencional.

A extração de DNA foi realizada a partir destas amostras, bem como de culturas com tempo de crescimento de aproximadamente 10 dias. O método foi

baseado na patente US2010/0311041 A1, executado em dois passos, com modificações.<sup>20</sup>

O método é baseado em um tampão de lise e uma solução de neutralização. O tampão de lise é constituído por bicarbonato de sódio, cloreto de potássio e tris hidroximetil aminometano, em pH 9,5. A amostra é colocada em 100 µl deste tampão e aquecida a 95° C durante 10 minutos. Após, é adicionado o tampão neutralizante, uma solução de soro albumina bovina a 2%.

As amostras extraídas foram quantificadas em Nanodrop® (ThermoScientific), a fim de averiguar o grau de pureza e concentração do DNA.

O processo de diagnóstico molecular foi feito em uma etapa, consistindo de uma PCR utilizando primers denominados “pan-dermatófito” (Panderm 1: 5'-GAAGAAGATTGTCGTTTGCATCGTCTC-3'; Panderm 2: 5'-CTCGTAGGTCAAAGCACGCCAGAG-3'), com a finalidade de identificar presença ou ausência de dermatófitos na amostra.

As reações de amplificação foram feitas usando 4 µl do produto da extração em termociclador convencional (MJResearch PTC100). A PCR foi realizada da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C/5 minutos; 45 ciclos de amplificação a 94°C/40 segundos, 60°C/1 minuto e 72°C/1 minuto e 10 minutos de extensão final a 72°C. O produto amplificado de 366pb foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 2% com corante de DNA.

O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Instituto Lauro de Souza Lima. Todos os participantes foram informados sobre a pesquisa, e consentiram a participação através da assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido).

## **Resultados**

O método molecular proposto foi testado para 67 amostras. Entre estas, 40 positivas e 27 negativas no exame direto.

Quanto à localização anatômica, as amostras se distribuíram da seguinte forma: 28 de unha das mãos e dos pés, 2 de regiões dorsais, 1 de região mamária, 1 de interglúteo, 15 de plantas dos pés, 2 de glúteos, 5 de

regiões inguinais, 1 de ombro, 2 de abdome, 4 de interdígito, 1 de couro cabeludo, 3 de axilas e 1 de dorso do pé.

A média das concentrações de DNA foi de 190,6ng/ul. O ratio 260/280nm, que avalia o grau de pureza do material, teve média de 0,65.

O primeiro teste de amplificação realizado apontou uma fraca amplificação para a amostra número 4, proveniente de região inguinal de paciente do sexo feminino, cujo diagnóstico convencional por cultura mostrou o *T. rubrum* como o agente causador da lesão (Figura 1).



FIGURA 1. Eletroforese em gel de agarose 2% para detecção da banda de 366pb. Seta indica amostra com fraca amplificação.

Seis destas amostras foram então purificadas com proteinase K, segundo o protocolo Dynal modificado (Miller, 1998). Utilizou-se 30 µl de proteinase K, 40 µl do tampão da enzima, 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água destilada. Estas foram então submetidas à agitação no vortex por 10 minutos e incubadas em banho-maria com agitação durante 30 minutos a 55°C. Após a aplicação desse protocolo, a concentração média das amostras foi de 1,4ng/uL, enquanto o ratio 260/280nm foi de 0,71. Assim, estas não foram submetidas à amplificação, devido à grande perda de concentração do material genético, aliado a falta de ganho na pureza da amostra.

Os primeiros testes foram realizados com 4ul do produto de extração. Após os resultados negativos na amplificação, ajustamos o volume para 2ul de DNA, com o mesmo volume final de reação, para verificar se a alta concentração de DNA também estaria inibindo as reações de PCR (Figura 2).

Marcador  
100pb

Marcador  
100pb



**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose 2% do produto da reação de amplificação usando 2  $\mu$ l da amostra de DNA.

Outro protocolo testado foi a submissão de sete amostras a uma forte agitação em equipamento Fastprep4®, para potencializar a lise da parede celular fúngica. No entanto, também não observamos amplificação a partir destas extrações (Figura 3).

Marcador  
100pb



**FIGURA 3.** Eletroforese em gel de agarose a 2% de 7 amostras submetidas a forte agitação em equipamento FastPrep4®.

Sete amostras de cultura positiva no diagnóstico convencional para dermatófitos, seis para *T.rubrum* e uma de *T. mentagrophytes*, foram testadas com a temperatura de anelamento dos primers modificada para 58°C. Este teste também não mostrou resultado para amplificação (Figura 4).

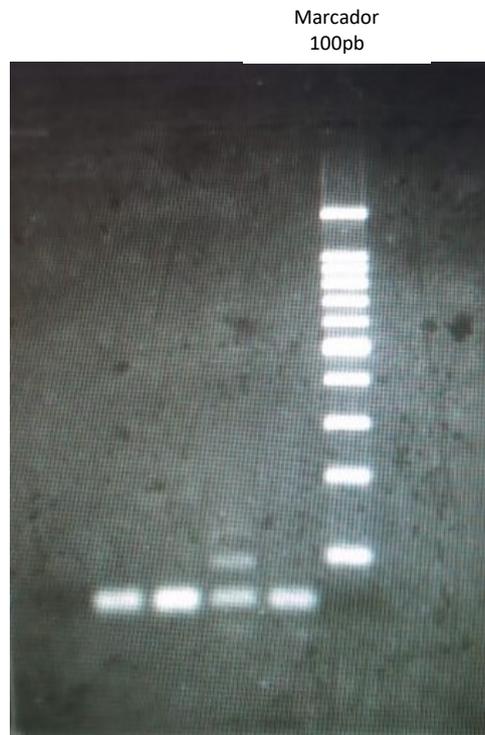


FIGURA 4. Eletroforese em gel de agarose 2% de culturas de dez dias a partir de amostras positivas no diagnóstico convencional.

Um artigo publicado por Brillowska-Dabrowska et al. (2007) descreveu a amplificação com 45 ciclos de 30 segundos de desnaturação, anelamento e extensão, e com desnaturação inicial de 10 minutos. Testamos este protocolo no presente trabalho, com amostras de culturas de dermatófitos com aproximadamente 10 dias de crescimento, porém com a temperatura de anelamento a 58°C. O DNA extraído destas culturas mostrou um bom rendimento, com uma média e 233,5ng/μl, porém com baixa pureza, apresentando uma média do ratio 260/280nm de 0,68. No entanto, estas modificações não mostraram resultados positivos (Figura 5).



**FIGURA 5.** Eletroforese com gel a 1% para detecção do fragmento de 366pb de culturas de dermatófitos com aproximadamente 10 dias de crescimento.

## **Discussão**

Os testes laboratoriais convencionais disponíveis para o diagnóstico de dermatofitoses apresentam grande prevalência de resultados falsos positivos e falsos negativos, além de serem demorados. O exame micológico direto, a cultura em meios seletivos e a detecção de metabólitos por testes químicos não apresentam sensibilidade adequada para o diagnóstico. Já o uso de métodos moleculares para a detecção do DNA do fungo tem sido amplamente explorado e mostram bons resultados quanto a sensibilidade e especificidade, auxiliando na adoção de conduta terapêutica adequada de forma mais precoce. Este estudo buscou a otimização de um método rápido, fácil e menos oneroso para identificação dos agentes causadores desse tipo de micose superficial.

Estima-se que sejam realizados mais de 300 exames por mês relacionados ao diagnóstico de dermatófitos, no Laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima.

O método testado mostrou alto rendimento de DNA, mas baixa pureza do material extraído. Um estudo realizado por Kotrotsiou et al. (2016) comparou três métodos de extração diretamente de amostras de unha com suspeita de onicomicose. O método que se mostrou mais efetivo, com maior rendimento e rapidez, e menos dispendioso foi o método testado em nosso estudo. No entanto, os autores também relatam que este método forneceu DNA com baixa pureza.<sup>16</sup>

O protocolo aqui testado não mostrou resultados de amplificação. No entanto, de acordo com diversos autores, o método é eficiente, mas produz amostras com interferentes que podem inibir a reação de PCR.<sup>8,14,16,18</sup> Os dados de pureza das nossas amostras, refletido pelas razões entre as absorvâncias em 260 e 280nm, falam em favor desta hipótese, uma vez que a presença de impurezas nas amostras deve atuar como inibidores. Neste trabalho a média do ratio, que avalia o grau de pureza do DNA, foi de 0,64, mas o ideal para que amostras estejam livres de impurezas é entre 1,2 e 1,8.

Em nosso estudo a eletroforese foi aplicada para a fim de visualização do produto da amplificação. De acordo com Eça e colaboradores (2005), a eletroforese também permite avaliar a integridade do material extraído. Quanto mais puras e íntegras as moléculas de DNA, mais nítidas e definidas serão as bandas.<sup>17</sup> O primeiro teste realizado, onde a banda visualizada aparece bem fraca e o grau de pureza da mesma está bem abaixo do ideal, que seria entre 1,2 e 1,8 pode indicar que o DNA extraído pode estar fragmentado. Sendo assim a eletroforese seria uma boa estratégia para avaliar a integridade das moléculas do material extraído antes de aplicar o método da PCR.

É razoável supor que a coleta do material biológico seja um passo de suma importância para o resultado deste teste, e se feita de forma inadequada apresenta potencial para interferir no diagnóstico final. A positividade de um exame direto depende de uma amostra obtida corretamente, o que não deve ser diferente para o diagnóstico molecular. Nas lesões de pele, é necessária uma assepsia local com álcool 70% e a coleta da amostra deve ser feita nas bordas das lesões, onde o fungo se encontra. Se apresentarem pústulas ou vesículas bolhosas, deve-se utilizar um *swab* pressionando-o sobre a lesão, e depositando o mesmo em uma solução salina. O mesmo vale para regiões inguinais. No couro cabeludo, os cabelos devem estar limpos e secos, e a amostra deve conter folículos e escamas de pele e alguns tocos de cabelo. Raspa-se o local e coleta-se o folículo com pinça estéril.<sup>19</sup> Para cabelos e pêlos, os mesmos devem ser cortados e colocados em placa de Petri. As unhas devem estar totalmente sem esmaltes com pelo menos dois dias de antecedência, e também é necessária uma assepsia para eliminar contaminantes bacterianos. O material deve ser colhido no leito subungueal, entre a unha sadia e a doente, sendo excluídas as escamas mais externas,

pois podem estar contaminadas com poeira.<sup>19</sup> As amostras do presente estudo foram colhidas de acordo com o procedimento de rotina já realizado no laboratório de Micologia do Instituto Lauro de Souza Lima. É feita uma assepsia local com álcool à 70%, após isso as lesões de pele são raspadas com bisturi estéril, sempre nas bordas das lesões. Amostras de cabelo também são coletadas com bisturi e pinças, raspando-se o couro cabeludo, e colhendo alguns fios de cabelo. O mesmo vale para pêlos e unhas, que são raspadas no leito subungueal, cortando-se um pedaço da mesma quando possível.

Técnicas moleculares são sensíveis e específicas para a identificação direta de fungos, porém é necessário que haja quantidade de amostra satisfatória, o que nem sempre acontece.<sup>5, 11, 13, 14, 16, 21</sup> Quando há quantidade abundante de material, maior é a chance de positividade no exame direto e no método molecular.<sup>21</sup> Esse critério pode explicar a fraca amplificação para uma amostra obtida no primeiro teste (Figura 1), uma vez que esta apresentava maior tamanho. No entanto, o baixo *ratio* 260/280nm da mesma sugere a presença de algum interferente na reação, como já discutido.

A fim de purificar as amostras, foi realizado um tratamento destas com proteinase K, que diminuiu as concentrações de DNA para níveis muito baixos, sem melhora da pureza.

O método modificado com forte agitação no aparelho Fastprep 4® foi realizado para potencializar a lise da parede celular fúngica, porém não obtivemos a amplificação desejada. A membrana da célula fúngica é rica em quitina e outras substâncias, que conferem uma estrutura rígida ao fungo, dificultando a lise no processo de extração do DNA.<sup>22</sup>

As modificações foram testadas a fim de melhorar a pureza do DNA obtido, no entanto, nenhum destes apresentou melhora do *ratio*. Assim, a estratégia proposta se baseia na mudança do método de coleta das amostras, uma vez que o único resultado positivo foi obtido para uma amostra de maior tamanho. A validação deste método para utilização em um centro de referência em dermatologia, como o Instituto Lauro de Souza Lima, deverá contribuir para o diagnóstico rápido, sensível e específico das dermatofitoses, mesmo na presença do uso de medicamentos.

## Evaluation of a molecular method for the diagnosis of dermatophytoses

**Abstract:** Dermatophytes are filamentous, hyaline, septate, fungi that have tropism by keratinized structures, causing infections in the skin, hair and nails, called dermatophytosis. These diseases are manifested as chronic lesions and are difficult to treat. The WHO estimates that 25% of the world population is affected by dermatophytes. Molecular diagnosis methods based on detection of fungal DNA have been developed with the advantage of being faster, more sensitive and specific. The early and assertive diagnosis of dermatophytosis should prevent unnecessary treatments. This study proposes to test a method for molecular diagnosis with low cost and easier than regular exams. This method is based on two PCR reactions, which will allow identification of the species belonging to the three genera: Epidermophyton, Trichophyton and Microsporum. Sixty-seven suspected samples with from mycology laboratory at the Lauro de Souza Lima Institute were tested. The extraction method tested showed good yield and low purity. Modifications were tested in order to improve DNA purity, however, the 260/280nm ratio could not be improved, which possibly prevented the function in go the PCRs. Changes in the method of collecting patient material have the potential to improve these results.

**Key-words:** Dermatophytosis; Molecular Diagnosis; PCR.

### Referências

1. Azulay RD, Azulay DR, Azulay – Abulafia L. ***Dermatologia***. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
2. Peres NTA, Maranhão FCA, Rossi A, Martinez-Rossi NM. ***Dermatophytes: host –pathogen interaction and antifungal resistance***. Na BrasDermatol. 2010; 85: 657-67.
3. Seebacher C, Bouchara VP, Mignon B. ***Updates on the epidemiology of dermatophyte infections***. Mycopathologia. 2008; 166: 335-52.
4. Degreef H. ***Clinical Forms of dermatophytoses (RingwormInfection)***. Mycopathologia. 2008; 166: 257-65.
5. Brillowska- Dabrowska, A., Saunte, D.M andArendrup, M.C. (2007) ***Five - hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of Trichophyton rubrum***. J. ClinMicrobiol45( ), 1200-1204.
6. Macura, A.B. (1993) ***Dermatophytes infections***. Int J. Dermatol 32, 313-323.
7. Havlickova B, Czaika VA, Friedrich M. ***Epidemiological trends in skin mycoses world wide***. Mycoses 2008; 51 (Suppe 4): 2-15.
8. Moraes MA, Machado AA, Medeiros P FO, Reis CM. ***Dermatophytic pseudomycetoma: report of a case caused by Trichophyton tonsurans***. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.34 no.3 Uberaba May/June 2001.

9. Clayton, Y. M., Midgley, G. **Identification of agents of superficial mycoses.** In: Evans, E, G. V.; Richardson, M. D. **Medical Mycology – a practical approach.** IRL Press, Oxford, 1989.
10. Rippon, J.N. **Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes.** WB Saunders, 3<sup>rd</sup> Philadelphia, 1998.
11. Ohst, T., Kupsch, C., Graser Y. **Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay.** British Journal of Dermatology (2016) 174, 602-609.
12. Peres, N., et al. **Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência à antifúngicos.** An Bras Dermatol. 2010; 85 (5): 657-67.
13. Kardjeva V, Summerbell R, Kantardjiev T, et al: **Forty-eight-hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains.** J Clin Microbiol 44:1419, 2006.
14. Gordon K.A., McIver C., et al. **Clinical application of molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique.** Pathology (December 2016) 48 (7), 720-726.
15. Kano, R; Okabayashi, K.; Nakamura, Y; Coka, S.; Kashima, M.; Mizoguchi, M.; Watanabe, S.; Hasegawa, A. **Differences among chitin synthase I gene sequences in *Trichophyton rubrum* and *T. violaceum*.** Med. Mycol. 38:47-50, 2000.
16. Kotrotsiou T., Chatzimichaloglou., et al. **A comparative study of three extraction protocols of DNA from nails: Potential use in the diagnosis of onychomycoses.** Mycoses 2017; 60:183-187.
17. EÇA, L.P.M. et al. **Biologia Molecular – Guia Prático e Didático.** Rio de Janeiro, REVINTER Ltda. 2005. 3<sup>a</sup> ed.
18. Turin, L.; Riva, F.; Galbiati, G.; Cainelli, T. **Fast simple and sensitive double-round polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens.** Eur. J. Clin. Invest., 30:511-518, 2000.

19. Rossana Sette <[http://www.micologia.com.br/coleta\\_amostras.shtml](http://www.micologia.com.br/coleta_amostras.shtml)> Acesso em 27/03/2019 às 21:36.

20. Brillowska-Dabrowska A. December 2006. **DNA preparation from nail samples**. Denmarkpatent WO2006133701

21. Verrier J, Pronina M, Peter C, et al. **Identification of infectious agents in onychomycoses by PCR-terminal restriction fragment length polymorphism**. J Clin Microbiol. 2012;50:553–61

22. MAGNELLI, P. E.; CIPOLLO, J. F.; ROBBINS, P. W. **Glucanase-driven fractionation allows redefinition of Shizoccharomyces pombe cell wall composition and structure: assignment of diglucan**. Analytical Biochemistry, New York, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005