



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

CARLOS ADRIANO DE SANTANA LEAL

PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR-RFLP E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS
TRADICIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE
DERMATÓFITOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES E GATOS

RECIFE

2013

CARLOS ADRIANO DE SANTANA LEAL

PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR-RFLP E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS
TRADICIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE
DERMATÓFITOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES E GATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva

Co-Orientador: Prof. PhD. Rinaldo Aparecido Mota

RECIFE

2013

Ficha Catalográfica

L435p

Leal, Carlos Adriano de Santana

Padronização de uma PCR-RFLP e comparação com métodos tradicionais para identificação das principais espécies de dermatófitos em amostras clínicas de cães e gatos / Carlos Adriano de Santana Leal. -- Recife, 2013.

64 f.

Orientador (a): Leonildo Bento Galiza da Silva.

Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2013.

Inclui referências e apêndice.

1. Diagnóstico 2. ITS 3. Zoonose 4. rDNA I. Silva, Leonildo Bento Galiza da, Orientador II. Título

CDD 636.089

CARLOS ADRIANO DE SANTANA LEAL

PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR-RFLP E COMPARAÇÃO COM MÉTODOS
TRADICIONAIS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS ESPÉCIES DE
DERMATÓFITOS EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE CÃES E GATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina
Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonildo Bento Galiza da Silva
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Júnior
UAG / Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. PhD. Rita de Cássia Carvalho Maia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luciana de Oliveira Franco
Universidade Federal Rural de Pernambuco

“Dedico o trabalho a minha mãe e minha esposa que me acompanharam em mais esta luta”.

AGRADECIMENTOS

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

Ao professor Rinaldo por abrir as portas do seu laboratório e permitir que pudesse aprender tanto com esta experiência.

Ao professor Leonildo (Léo) que foi mais que um orientador, foi um amigo pra todas as horas, emprestando seus ouvidos pra que eu pudesse falar sobre os problemas pessoais;

Ao professor José Wilton (Júnior) que me ajudou muito com a parte estatística do trabalho;

Aos meus amigos do laboratório: Pomy, André Mota, André Santos, Nair, Débora, Maína, Bruno, Marcela e Érica Samico, Érica Moraes, Cecília, Givanildo, Flaviana, Sandra Santos, Sandrinha, Renatinha, Lídia, Luana, Pedro Paulo, Orestes, Mauro, Otávio, 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 Virose, 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 re-encontrei durante este período;

À CAPES pela bolsa concedida, única fonte de renda durante este período, sem a qual seria muito mais difícil desenvolver e concluir este trabalho.

RESUMO

Objetivou-se com este estudo padronizar uma técnica de PCR-RFLP e compará-la com métodos tradicionais de identificação de dermatófitos em amostras clínicas de cães e gatos. Foram analisadas 150 amostras clínicas de animais com dermatopatias. Nas amostras de pelos e/ou crostas foram realizados exames direto com KOH (30%) e cultura em ágar dextrose Sabouraud adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. O DNA foi extraído das colônias, após a avaliação das características macro e microscópicas, bem como das amostras clínicas, com o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®). Os *Primers* utilizados foram o ITS 1 e o ITS 4. Os Amplicons foram digeridos pela enzima de restrição *Bse*BI. Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa (*K*). Após a análise dos resultados observou-se padrões de bandas diferentes que identificam *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Observou-se também uma excelente concordância entre os resultados da cultura e da PCR-RFLP de 87,5% (7/8). Outra observação feita foi a de que amostras negativas nos métodos tradicionais (exame direto e cultura), mas que estavam contaminadas com o agente, foram identificadas pela técnica molecular, indicando uma maior sensibilidade da mesma. Concluiu-se, então, que a PCR-RFLP é mais sensível e tão específica quanto os métodos de rotina, o que permite que a mesma seja utilizada para a identificação mais rápida destas espécies de dermatófitos em amostras clínicas de cães e gatos.

Palavras-chave: Dermatofitose. Diagnóstico. ITS. Zoonose

ABSTRACT

The Objective of this study was to standardize a PCR-RFLP and compare it with traditional methods of identification of dermatophytes in clinical specimens from dogs and cats. We analyzed 150 clinical samples from animals with skin diseases. In samples of hair and / or crusts direct microscopic exams were performed with KOH (30%) as well as culture on Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract, chloramphenicol and cycloheximide. DNA was extracted from the colonies, after the evaluation of macroscopic and microscopic features as well as of clinical specimens with the DNeasy Blood & Tissue extraction kit (QIAGEN[®]). The primers used were ITS 1 and ITS 4. The amplicons were digested by restriction enzyme BseBI. To study the correlation between the tests we used the Kappa coefficient (K). After analyzing the results we observed patterns different that identify *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes*. There was also excellent agreement between the results of culture and PCR-RFLP of 87,5% (7/8). Another observation made was that negative samples in traditional methods (direct examination and culture), but were contaminated with the agent, were identified by molecular technique, indicating a higher sensitivity of the same. It concluded, then, that the PCR-RFLP method is more sensitive and as specific as the routine methods, allowing it to be used for a fastest identification of these species of dermatophytes in clinical samples from dogs and cats.

Keywords: Dermatophytosis. Diagnosis. ITS. Zoonosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Anverso da colônia de <i>M. canis</i>	20
Figura 2	Reverso da colônia de <i>M. canis</i>	20
Figura 3	Macroconídios de <i>M. canis</i>	20
Figura 4	Anverso da colônia de <i>M. gypseum</i>	21
Figura 5	Reverso da colônia de <i>M. gypseum</i>	22
Figura 6	Macroconídios de <i>M. gypseum</i>	22
Figura 7	Anverso da colônia de <i>T. mentagrophytes</i>	23
Figura 8	Anverso da colônia de <i>T. mentagrophytes</i> . Colônia mantida em laboratório	24
Figura 9	Reverso da colônia de <i>T. mentagrophytes</i>	24
Figura 10	Macro e microconídios de <i>T. mentagrophytes</i>	24
Figura 11	Lesões multifocais no dorso e cabeça de um felino de aproximadamente três meses de idade (fêmea)	25

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 1

- Figura 1 Amplificação do DNA extraído de colônias de dermatófitos utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4 **39**
- Figura 2 Padrão de bandas observado após digestão enzimática com endonuclease BseBI dos amplicons obtidos na PCR **39**

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO 2

Figura1	Gel de agarose 2% com os resultados obtidos na técnica da PCR-RFLP	51
Figura 2	Gel de agarose 2% com amostras negativas na cultura	52

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1 Tamanho dos fragmentos amplificados a partir de colônias de dermatófitos e padrão observado para cada espécie analisada no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos da UFRPE em 2011 e 2012 **39**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Análise de concordância entre métodos convencionais de diagnóstico de dermatófitos isolados de amostras clínicas de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE em 2011 e 2012	50
Tabela 2	Análise de concordância entre resultados da cultura e da PCR-RFLP para fungos dermatófitos isolados de amostras clínicas de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE em 2011 e 2012	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase iniciada arbitrariamente
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
<i>M. canis</i>	<i>Microsporium canis</i>
<i>M. gypseum</i>	<i>Microsporium gypseum</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rDNA	DNA ribossomal
Sens.	Sensibilidade
RFLP	Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição
Tab.	Tabela
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Geral	17
1.1.2	Específicos	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	DERMATÓFITOS	18
2.2	PRINCIPAIS GÊNEROS E ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS QUE ACOMETEM CÃES E GATOS	19
2.2.1	<i>Microsporum</i>	19
2.2.1.1	<i>M. canis</i>	19
2.2.1.2	<i>M. gypseum</i>	21
2.2.2	<i>Trichophyton.</i>	22
2.2.2.1	<i>T. mentagrophytes</i>	22
2.3	DERMATOFITOSE	25
2.4	TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS	27
3	REFERÊNCIAS	30
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	33
4.1	PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM CÃES E GATOS	34
4.2	COMPARAÇÃO DE MÉTODOS TRADICIONAIS COM A TÉCNICA DA PCR-RFLP NA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM CÃES E GATOS	45

1 INTRODUÇÃO

Na clínica de pequenos animais as dermatopatias representam a grande maioria dos casos atendidos, e dentre elas pode-se destacar as micoses que são causadas principalmente por dermatófitos (CHAVES, 2007).

Dermatófitos são fungos que possuem a capacidade de invadir e multiplicar-se em estruturas queratinizadas causando dermatofitose em homens e animais (LIU et al., 2000; LIU et al., 2002; QUINN et al., 2005; COELHO et al., 2008). Os Gêneros mais envolvidos nas infecções em animais são *Microsporum* e *Trichophyton* (MULLER e KIRK, 1996; CAVALCANTE, 2006).

Segundo Costa (2010), *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *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 grande maioria dos casos ocorridos em humanos tem como agente causador *Microsporum canis*, devido ao contato direto com cães e principalmente gatos infectados que podem ser portadores de artroconídios, fisicamente, em seus pelos sem desenvolver a doença aparente (MULLER e KIRK, 1996; QUINN et al., 2005).

As lesões mais encontradas em cães e gatos são alopecia, crostas melicéricas ou hemorrágicas, eritema e escamas e frequentemente ocorrem na região cefálica e tronco. Nos animais a faixa etária com maior predisposição é até os doze meses e o Yorkshire e o Persa são as raças que mais frequentemente são acometidas, em se tratando de cães e gatos respectivamente (BALDA et al., 2004).

Na rotina laboratorial, a identificação dos dermatófitos depende do seu crescimento em meio de cultura muitas vezes devidamente suplementado, para só após serem avaliados seus aspectos morfológicos macro e microscópicos. No entanto, esse período de crescimento pode levar de duas a três semanas em algumas espécies de dermatófitos, fato este que pode ser acrescido de um desenvolvimento atípico por parte da colônia. Este conjunto de fatores acaba ocasionando um diagnóstico tardio (SHEHATA et al., 2008).

Tendo como base esta dificuldade, métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos e têm contribuído de maneira significativa na identificação de micro-organismos e suas espécies, sobretudo a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), por ser uma técnica simples, rápida, específica e capaz de identificar a presença do agente patogênico por menor

que seja sua quantidade na amostra analisada (FAGGI et al., 2001). Estes métodos são ferramentas laboratoriais desejáveis não apenas para o diagnóstico precoce de infecções fúngicas, mas também para monitorar a resposta terapêutica específica (COLOMBO, 2007).

A técnica Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), que é uma variação da PCR, permite a obtenção de uma série de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes que dão origem a um padrão de bandas, e baseia-se na presença de sítios de restrição na região amplificada do DNA-alvo que pode ser determinada por intermédio do processamento do produto da PCR, com uma ou mais endonucleases de restrição (GARCIA, 1995; VERGARA et al., 2006).

Mirzahoseini et al. (2009), utilizaram a PCR-RFLP visando uma rápida identificação de dermatófitos em amostras clínicas de humanos, por meio da extração de DNA de colônias fúngicas jovens (5-10 dias) e obtiveram resultados que mostraram a possibilidade da identificação de gêneros e até de espécies desse grupo a partir da amplificação da região ITS.

Outras variações da PCR vêm sendo utilizadas para o diagnóstico da dermatofitose em humanos e animais, e tem-se obtido resultados significativos quanto à identificação de gêneros e espécies a partir de amostras cultivadas, o que indica a possibilidade da identificação desses agentes diretamente da amostra colhida do paciente sem a necessidade da realização de uma cultura, reduzindo em muito o tempo de espera pelo resultado e a perda do cultivo por contaminantes (GRÄSER et al., 1998; LIU et al., 2000; FAGGI et al., 2001; GUTZMER et al., 2004; SHEHATA et al., 2008).

Liu et al. (1997) conseguiram identificar duas variedades do *Trichophyton mentagrophytes* utilizando *primers* aleatórios na Reação em Cadeia da Polimerase iniciada arbitrariamente (AP-PCR).

Lemsaddek (2008), em sua tese intitulada estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência, frisou a importância da identificação dos dermatófitos relacionados a espécie para a saúde pública e epidemiologia quando citou que o conhecimento de espécies endêmicas geograficamente poderia determinar, em um caso de infecção pelo agente, se estaríamos diante de um caso esporádico ou de uma nova distribuição do fungo. Enfatizou também que uma identificação mais rápida e específica colaboraria para redução de casos de resistência a antifúngicos e para o desenvolvimento de novas drogas com concentrações inibitórias espécie-específica.

Diante do exposto e considerando a dificuldade encontrada para a identificação dos dermatófitos tanto clínica quanto laboratorialmente, e tendo em vista a sua importância como zoonose, é necessário o estudo e a padronização de técnicas alternativas para diagnóstico que possam aperfeiçoar o processo de identificação de tais fungos, contribuindo diretamente para o controle da disseminação desses fungos em animais e indiretamente no homem.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Desenvolver uma técnica para a identificação molecular de fungos dermatófitos a partir de amostras clínicas de cães e gatos.

1.1.2 Específicos

- Identificar fungos dermatófitos em amostras de pelos ou crostas de cães e gatos utilizando as técnicas da rotina laboratorial (exame direto e cultura);
- Padronizar uma técnica da PCR-RFLP para identificação molecular de dermatófitos a partir de amostras de pelos e/ou crostas;
- Identificar fungos dermatófitos em amostras de pelos e/ou crostas de cães e gatos utilizando a técnica da PCR-RFLP;
- Comparar os resultados obtidos na cultura em placas com os obtidos pela técnica da PCR-RFLP;

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são um grupo de fungos filamentosos, hialinos e septados de distribuição mundial que invadem e colonizam estruturas queratinizadas como o 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; QUINN et al., 2005; PALUMBO et al., 2010).

Estão classificados ecologicamente em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos, sendo os dois primeiros patógenos obrigatórios incapazes de replicar-se no solo e o último saprófito do solo que habita e se replica em associação a material queratinoso em decomposição, e do ponto de vista taxonômico classificados nos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* (LIU et al., 2000; LIU et al., 2002; QUINN et al., 2005; COELHO et al., 2008).

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

Segundo Cruz (2010) a capacidade dos dermatófitos produzirem enzimas como queratinases, por exemplo, aliada ao fato de não possuírem poder invasor explica o porquê de eles infectarem somente tecidos queratinizados superficiais. Outro ponto esclarecido pelo mesmo autor é a questão da adaptação que determinadas espécies de dermatófitos sofreram ao longo do tempo permitindo uma infecção mais frequente em algumas espécies animais, fato este que se deve a supressão de metabólitos produzidos por esse grupo de fungos, que são tóxicos a pele causando irritação e reação inflamatória, obrigando os mesmos a se afastarem do local por não conseguirem sobreviver neste ambiente, então a não produção desses metabólitos por parte deles aumenta o seu período de permanência na pele, já que dessa forma não haverá mais irritação nem inflamação no local.

2.2 PRINCIPAIS GÊNEROS E ESPÉCIES DE DERMATÓFITOS QUE ACOMETEM CÃES E GATOS

Os gêneros que mais comumente causam infecção em animais são *Microsporum* e *Trichophyton*, e em se tratando de espécies *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* são os principais agentes etiológicos das dermatofitose em cães, já em gatos *M. canis* é o mais envolvido. A infecção pode ser adquirida e transmitida, indiretamente, por contato com pelos e crostas contaminados no ambiente ou em fômites e diretamente entre animais (MULLER e KIRK, 1996; CAVALCANTI et al., 2002; CRUZ, 2010; PALUMBO et al., 2010).

2.2.1 *Microsporum*

2.2.1.1 *M. canis*

Microsporum canis é referido como o principal agente causador de dermatofitose, sendo o de maior ocorrência em cães e gatos e é o responsável por 50 a 75% dos casos em cães e 85 a 98% das micoses em gatos, bem como o principal responsável pelas infecções dermatofíticas zoofílicas em seres humanos (CHAVES, 2007; BORBA, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

É um dermatófito zoofílico que atinge cães e gatos causando alopecia e lesões que apresentam uma fluorescência verde clara quando observadas sob a lâmpada de Wood (COPETO, 2010).

Os esporos deste agente se espalham facilmente e conseguem permanecer viáveis por até dois anos no ambiente (BORBA, 2010).

M. canis cresce bem em ágar Sabouraud com cloranfenicol e ciclo-heximida, incubado à temperatura ambiente ou a 37°C, produzindo em uma semana, colônia cotonosa branca ou amarelada (Fig. 1), com reverso amarelo-alaranjado (Fig. 2). Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios em formato fusiforme e equinulados, com parede celular espessa, apresentando de 6 a 15 células e apêndice de fixação (Fig. 3) (QUINN et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010). Os microconídios são piriformes e em pequeno número (CRUZ, 2010).

Figura 1- Anverso da colônia de *M. canis*



Fonte: Leal (2013)

Figura 2- Reverso da colônia de *M. canis*



Fonte: Leal (2013)

Figura 3- Macroconídios de *M. canis*



Fonte: Leal (2013)

2.2.1.2 *M. gypseum*

Espécie geofílica que pode infectar homens e animais pelo contato com o solo contaminado (GIUDICE, 2008).

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

M. gypseum também 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 na superfície (Fig. 4). O verso da colônia apresenta coloração amarelo-acastanhada a marrom-avermelhado (Fig. 5). Microscopicamente apresenta numerosos macroconídios simétricos, fusiformes com três a nove células, com parede celular fina e septos e os microconídios são escassos (Fig. 6) (QUINN et al., 2005; CAVALCANTE, 2006; GIUDICE, 2008).

Figura 4 - Anverso da colônia de *M. gypseum*



Fonte: Leal (2013)

Figura 5- Reverso da colônia de *M. gypseum*



Fonte: Leal (2013)

Figura 6 - Macroconídios de *M. gypseum*



Fonte: Leal (2013)

2.2.2 *Trichophyton*

2.2.2.1 *T. mentagrophytes*

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).

T. mentagrophytes apresenta uma textura furfurácea ou pulverulenta em ágar Sabouraud (Fig. 7), podendo se tornar algodonosa quando mantida em laboratório (Fig. 8), 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 (Fig. 9). 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 (Fig. 10). Observa-se, com muita frequência, grande quantidade de hifas em espiral, órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (CAVALCANTE, 2006; CRUZ, 2010).

Figura 7- Anverso da colônia de *T. mentagrophytes*



Fonte: Leal (2013)

Figura 8 - Anverso da colônia de *T. mentagrophytes*.
Colônia mantida em laboratório.



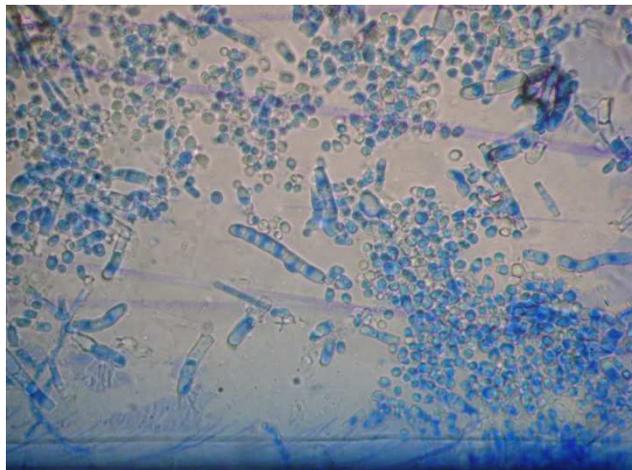
Fonte: Leal (2013)

Figura 9 - Reverso da colônia de *T. mentagrophytes*



Fonte: Leal (2013)

Figura 10 - Macro e microconídios de *T. mentagrophytes*.



Fonte: Leal (2013)

2.3 DERMATOFITOSE

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, 1997). Fato que pode estar relacionado ao estreito contato entre a espécie humana e os animais domésticos (COSTA et al., 1994).

É caracterizada por lesões que podem ser localizadas, multifocais (Fig. 11) 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 em um ou mais dedos também podem ocorrer (MULLER e KIRK, 1996; MEDLEAU e HNILICA, 2003; PALUMBO et al., 2010).

Figura 11- Lesões multifocais no dorso e cabeça de um felino de aproximadamente três meses de idade (fêmea).



Fonte: Leal (2013)

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 de Kérion geralmente são encontradas na face e podem mimetizar piodermites e furunculoses (CAVALCANTE, 2006; PRADO, 2007).

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).

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).

O diagnóstico da dermatofitose é feito pelo histórico do paciente, avaliação das lesões, microscopia direta de pelos e crostas, permitindo a visualização de estruturas fúngicas livres ou aderidas ao pelo, mas que poderão ser confundidas com bolhas formadas durante o processo de clarificação devido a medicamentos tópicos ou oleosidade presente na amostra. Também pode ser utilizada a biópsia, cultivo em placas com meios específicos, além da lâmpada de Wood, que oferece um diagnóstico rápido, no entanto passível de erros, 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).

No exame com a lâmpada de Wood objetiva-se identificar possíveis lesões causadas por dermatófitos, devido a uma fluorescência verde-amarelada emitida pelos filamentos de algumas espécies, pela presença de um pigmento especial, a 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., 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 micro-organismos 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, não sendo necessária uma raspagem profunda, pois o fungo se encontra no extrato córneo e nos pelos. Recomenda-se o acondicionamento em papel limpo, pois se diminui a umidade e com isso se evita o crescimento de contaminantes que podem atrapalhar o diagnóstico (CRUZ, 2010).

No exame direto segundo Carlotti e Pin (2004), o tipo de invasão do pelo orienta a identificação do dermatófito, mesmo que ainda seja necessária a cultura micológica.

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 morfologia das colônias e pelo aspecto microscópico de macroconídios (QUINN et al., 2005)

2.4 TÉCNICAS MOLECULARES UTILIZADAS PARA DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS

Dificuldades na identificação de certos isolados clínicos sejam causadas pela variabilidade natural das espécies, pleomorfismos, mutações espontâneas ou apenas por condições nutritivas inadequadas impedindo que os fungos produzam estruturas reprodutivas, sem as quais identificar a espécie em questão se torna mais complicado, são alguns motivos que incentivaram o investimento em métodos de identificação mais eficientes (COPETO, 2010).

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). Dentre elas está a PCR, que é uma técnica simples e rápida (SHEHATA et al., 2008). Porém, no que se refere à diferenciação intra-específica de agentes deste grupo, os resultados não são satisfatórios, devido a grande semelhança genética (GIUDICE, 2008).

O estudo da região ITS (Espaçadores Transcritos Internos) 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 intra-específica foi encontrada (GIUDICE, 2008; COPETO, 2010).

De acordo com Lemsaddek (2008), as regiões ITS estão localizadas entre a subunidade 18S do DNA ribossomal (rDNA) e o gene 5,8S (ITS 1) e entre o gene 5,8S 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 micro-organismos, 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 flanqueadas por segmentos conservados e o fato de aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade.

Jackson et al. (1999), realizaram a amplificação da região ITS de fungos dermatófitos utilizando *primers* universais, seguida da digestão enzimática dos produtos amplificados com a endonuclease de restrição *MvaI* e observaram padrões diferenciados para maioria das espécies analisadas.

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

Liu et al. (2000), identificaram 23 espécies e subespécies de dermatófitos pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase utilizando *primers* aleatórios (AP-PCR).

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

Gräser et al. (1998), utilizando a PCR *fingerprinting* identificaram variedades de espécies dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.

Faggi et al. (2001), identificaram várias espécies de dermatófitos utilizando uma sequência simples repetitiva (GACA)₄ como iniciador ao aplicarem a técnica da PCR *fingerprinting*.

Shehata et al. (2008), também utilizaram um oligonucleotídeo repetitivo (GACA)₄ como *primer* e diferenciaram variedades de isolados de *T. mentagrophytes*.

Vergara et al. (2006), padronizaram uma técnica de PCR para o diagnóstico de dermatófitos e observaram uma concordância de 93,3% entre os resultados obtidos na PCR e os obtidos com os métodos tradicionais de diagnóstico, quando analisaram 30 cepas pertencentes a esse grupo de fungos, no entanto, quando analisaram 30 amostras clínicas positivas e negativas de pacientes com infecção ativa, observaram 100% de concordância entre os resultados obtidos, o que sugeriu que a PCR é uma técnica que oferece grandes vantagens na identificação dos fungos dermatófitos.

Segundo Kanbe (2008), várias técnicas baseadas em DNA mitocondrial, PCR, RFLP e sequenciamento já foram utilizadas para identificação de dermatófitos ao longo dos anos, demonstrando sensibilidade e especificidade além de rapidez no diagnóstico.

3 REFERÊNCIAS

- BALDA, A. C. et al. 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 Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 133-140, 2004.
- 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.
- CARLOTTI, D. N.; PIN, D. **Diagnóstico dermatológico: avaliação clínica e exames imediatos**. São Paulo: Roca, 2004. 99 p.
- CAVALCANTE, C. S. P. **Caracterização das dermatofitoses canina e felina e manutenção de cepas dermatofíticas *in vitro***. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- CAVALCANTI, J. N. et al. Histopathologic and mycologic aspects of experimental infection of guinea pigs with *Microsporum canis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 39, n. 5, p. 238-243, 2002.
- 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 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 1017-1020, 2008.
- COLOMBO, A. L. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: o grande desafio para os Centros Médicos de atendimento terciário. **Prática Hospitalar**, São Paulo, ano 9, n. 52, p. 50-55, 2007.
- COPETO, S. C. M. F. **Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomioses**. 2010. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
- COSTA, E. O. et al. Surtos interespecíficos de dermatomicoses por *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 337-340, 1994.
- COSTA, F. V. A. **Determinação da variabilidade genotípica entre isolados de *Microsporum canis***. 2010. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. p. 111-142.

FAGGI, E. et al. Application of PCR to Distinguish Common Species of Dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington DC, v. 39, n. 9, p. 3382–3385, 2001.

FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia: diagnóstico e análise de variabilidade. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 14, p. 12-16, 2001.

GARCIA, J. F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos**. 1995. 76 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRÄSER, Y. et al. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporium*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. **British Journal of Dermatology**, London-GB, v. 138, n. 4, p. 576-582, 1998.

GUTZMER, R. et al. Rapid identification and differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh-GB, v. 53, n. 12, p. 1207–1214, 2004.

JACKSON, C. J.; BARTON, R. C.; EVANS, E. G .V. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington-US, v. 37, n. 4, p. 931-936, 1999.

KANBE, T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, The Hague-NL, v. 166, n. 5-6, p. 307–317, 2008.

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. et al. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh-GB, v. 49, p. 493-497, 2000.

LIU, D. et al. PCR identification of dermatophyte fungi *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh-GB, v. 51, p. 117-122, 2002.

LIU, D. et al. PCR identification of *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* and *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* dermatophytes with a random primer. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh-GB, v. 46, p. 1043-1046, 1997.

- MACHOUART-DUBACH, M. et al. Rapid discrimination among dermatophytes, *scytalidium* spp., and other fungi with a pcr-restriction fragment length polymorphism ribotyping method. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington-US, v. 39, n. 2, p. 685–690, 2001.
- MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. São Paulo: Roca, 2003.
- MIRZAHOSEINI, H. et al. Application of PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic Dermatophytes from Clinical Specimens. **Iranian Journal of Public Health**, Tehran-Iran, v. 38, n. 1, p. 18-24, 2009.
- MULLER, G. H.; KIRK, R. W. **Dermatologia de pequenos animais**. Tradução de Danny W. Scott; William H. Miller Jr.; Craig E. Griffin. 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1130 p.
- OLIVEIRA, V. L. et al. 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**, São Paulo, v. 13, n. 16, p. 57-66, 2011.
- PALUMBO, M. I. P. et al. Estudo epidemiológico das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no serviço de dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP –Botucatu. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 459-468, 2010.
- PINHEIRO, A. Q.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 4, p. 287-294, 1997.
- 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 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 224-228.
- RIBEIRO, E. A. **Frequência de fungos dermatófitos em gatos (*Felis catus*) infectados e não infectados pelo vírus da imunodeficiência felina**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu.
- SHEHATA, A. S. et al. Single-Step PCR Using (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington-US, v. 46, n. 8, p. 2641–2645, 2008.
- VERGARA, C. C. et al. Estandarización de una Técnica de Amplificación Genómica (PCR) para el Diagnóstico de Dermatofitos. **Ciencia & Trabajo**, Santiago-Chile, v. 8, n. 22, p. 167-171, 2006.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DE UMA PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM CÃES E GATOS

Formatado de acordo com normas da Revista Pesquisa Veterinária Brasileira (QUALIS CAPES A2)

4.2 COMPARAÇÃO DE MÉTODOS TRADICIONAIS COM A TÉCNICA DA PCR-RFLP NA IDENTIFICAÇÃO DE DERMATÓFITOS EM CÃES E GATOS

Formatado de acordo com normas da Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (QUALIS CAPES A2)

Padronização de uma PCR-RFLP para identificação de dermatófitos em cães e gatos¹

Carlos A. S. Leal²

ABSTRACT.- Leal C.A.S. 2013. [Standardization of a PCR-RFLP for identification of dermatophytes in dogs and cats.] Padronização de uma PCR-RFLP para identificação de dermatófitos em 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 objective of this study was to standardize a PCR-RFLP method for identify the major dermatophyte species that affect dogs and cats. We analyzed 150 clinical samples from animals with skin diseases. Hair samples and/or crusts were grown in Sabouraud dextrose agar supplemented with yeast extract, chloramphenicol and cycloheximide. DNA was extracted from the colonies, after the evaluation of macro and microscopic features, with the DNeasy Blood & Tissue extraction kit (QIAGEN®). The primers used were ITS 1 and ITS 4. The amplicons were digested by restriction enzyme BseBI. Were observed different patterns for each species of dermatophyte analyzed. From the analysis results it is concluded that the pattern of fragments obtained by PCR-RFLP identify *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*, enabling the use of the technique for a fastest identification of these species of dermatophytes in clinical samples from dogs and cats.

INDEX TERMS: ringworm, Microsporum, Trichophyton, ITS, rDNA

RESUMO.- Objetivou-se com este estudo padronizar uma técnica de PCR-RFLP para identificação das principais espécies de dermatófitos que acometem cães e gatos. Foram analisadas 150 amostras clínicas de animais com dermatopatias. As amostras de pelos e/ou crostas foram cultivadas em ágar dextrose Sabouraud adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. O DNA foi extraído das colônias, após a avaliação das características macro e microscópicas, com o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®). Os *primers* utilizados foram o ITS 1 e o ITS 4. Os amplicons foram digeridos pela enzima de restrição BseBI. Observou-se padrões de bandas diferentes para cada espécie de dermatófito analisada. A partir da análise dos resultados conclui-se que os padrões de fragmentos obtidos através da PCR-RFLP identificam *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, possibilitando o uso da técnica para uma identificação mais rápida destas espécies de dermatófitos em amostras clínicas de cães e gatos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: dermatofitose, Microsporum, Trichophyton, ITS, rDNA

¹ Recebido em

Aceito para publicação em

T. 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

Os dermatófitos são um grupo de fungos septados de distribuição mundial que invadem e colonizam estruturas 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 às infecções (Cavalcanti et al. 2002, Quinn et al. 2005, Palumbo et al. 2010).

Os gêneros que mais frequentemente causam infecção em animais são *Microsporum* e *Trichophyton*, e dentre as espécies, *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* são os responsáveis pela maioria dos casos clínicos de dermatofitose em cães e gatos e são transmitidos, indiretamente, por contato com pelos e crostas contaminados no ambiente ou em fômites e diretamente entre animais (Muller & Kirk 1996, Cavalcanti et al. 2002, Palumbo et al. 2010).

A identificação dos dermatófitos depende do seu crescimento em meio de cultura muitas vezes devidamente suplementado, para só após serem avaliados seus aspectos morfológicos macro e microscópicos, no entanto, esse período de crescimento pode levar de duas a três semanas em algumas espécies de dermatófitos, fato este que pode ser acrescido de um desenvolvimento atípico da colônia (Shehata et al. 2008).

Dificuldades na identificação de certos isolados clínicos sejam causadas pela variabilidade natural das espécies, pleomorfismos, mutações espontâneas ou apenas por condições nutritivas inadequadas impedindo que os fungos produzam estruturas reprodutivas, sem as quais identificar a espécie em questão se torna mais complicado, são alguns motivos que incentivaram o investimento em métodos de identificação mais eficientes (Copeto 2010).

Diante destas dificuldades métodos moleculares vêm sendo desenvolvidos e têm contribuído de maneira significativa na identificação de micro-organismos e suas espécies, sobretudo a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) que é uma técnica simples e rápida (Faggi et al. 2001). Estes métodos são ferramentas laboratoriais desejáveis não apenas para diagnóstico precoce de infecções fúngicas, mas também para monitorização da resposta terapêutica específica (Colombo 2007).

A técnica Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP), que é uma variação da PCR, permite a obtenção de uma série de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes que dão origem a um padrão de bandas, e baseia-se na presença de sítios de restrição na região amplificada do DNA-alvo que pode ser determinada por intermédio do processamento do produto da PCR, com uma ou mais endonucleases de restrição (Garcia 1995, Vergara et al. 2006).

Mirzahoseini et al. (2009) utilizaram a PCR-RFLP visando uma rápida identificação de dermatófitos em amostras clínicas de humanos, por meio da extração de DNA de colônias fúngicas jovens (5-10 dias) e obtiveram resultados que mostraram a possibilidade da identificação de gêneros e até de espécies desse grupo a partir da amplificação da região ITS.

Jackson, Barton & Evans (1999), realizaram a amplificação da região ITS de fungos dermatófitos utilizando *primers* universais, seguida da digestão enzimática dos produtos amplificados com a endonuclease de restrição *MvaI* e observaram padrões diferenciados para maioria das espécies analisadas.

Objetivou-se com este estudo padronizar uma técnica da PCR-RFLP para identificação das principais espécies de dermatófitos que acometem cães e gatos.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida no Hospital Veterinário do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – DMV/UFRPE e as amostras foram processadas no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos do DMV/UFRPE.

Foram analisadas 150 amostras clínicas de animais com dermatopatias. As amostras de pelos e/ou crostas foram cultivadas em ágar dextrose Sabouraud adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. As placas foram incubadas aerobicamente em temperatura ambiente (25-27°C) e examinadas diariamente por até cinco semanas de acordo com Cruz (2010).

A extração do DNA do micélio aéreo das colônias foi realizada, após a avaliação das características macro e microscópicas, com o kit de extração DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN®, Hilden – Germany), que não é o mais indicado para este tipo de extração e não possui protocolo estabelecido para este tipo de material, sendo necessárias algumas adaptações ao protocolo de extração de DNA de tecidos em geral, o qual ficou da seguinte forma: em um tubo tipo eppendorf contendo 180 µL de tampão ATL inoculou-se alçadas da colônia e homogeneizou-se em vortex por 15s; em seguida adicionou-se 20 µL de proteinase K,

homogeneizou-se rapidamente no vortex e incubou-se em banho seco com agitação à 56°C por 1h e 1500 rpm (primeira adaptação feita: o protocolo sugeria um tempo máximo de 40 min. para os tecidos mais resistentes, porém foi preciso aumentar este tempo para obtenção de melhores resultados); acrescentou-se, após este período, 4 µL de RNase à suspensão (segunda adaptação: esta etapa não existia no protocolo original), homogeneizou-se e incubou-se em temperatura ambiente por 5 min.; Levou-se novamente ao vortex e adicionou-se 200 µL de tampão AL, vortex, adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%) e novamente homogeneizou-se no vortex; preparou-se tubo de coleta acoplado ao filtro (embalagens individuais) e transferiu-se 600 µL ou o que se conseguiu do conteúdo do eppendorf e em seguida centrifugou-se a 8000 rpm/1min.; trocou-se o tubo de coleta (a parte de baixo) e adicionou-se 500 µL do tampão AW1 e centrifugou-se a 8000 rpm/1min.; trocou-se novamente o tubo de coleção e adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a 14000 rpm/3min.; trocou-se a parte de baixo por um tubo tipo *ependorff* devidamente identificado, adicionou-se 100 µL do tampão AE (terceira modificação: o volume sugerido pelo fabricante era o dobro e verificamos que reduzindo à metade concentramos as amostras e melhoramos os resultados), incubou-se em temperatura ambiente por 10 min. e centrifugou-se a 8000 rpm/1min.; retirou-se o filtro (coluna) e armazenou-se os tubos identificados no freezer.

As reações de amplificação do DNA foram realizadas para um volume final de 25 µL contendo: 5 µL de DNA genômico; 1 µL de cada *primer* a 10 µM (ITS-1 e ITS-4); 5,5 µL de água Mili-Q ultrapura e 12,5 µL de Top Taq™ Master Mix (QIAGEN®, Hilden – Germany), de acordo com instruções do fabricante. Foi utilizado como controle negativo água ultra pura. Os *primers* utilizados foram: ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'); e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al. 1990) (Eurofins MWG Operon), que amplificam as regiões ITS I, 5,8S e ITS II do DNA ribossomal (rDNA). O protocolo térmico para a amplificação foi o recomendado por Mirzahoseini et al. (2009) que consistiu de 35 ciclos de 93°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma etapa de extensão final de 72°C por 7 min. Após a amplificação, o produto de PCR foi colocado em gel de agarose 2%, corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia) e posto em cuba de eletroforese com tampão Tris-acetato-EDTA (1X) (Amresco®) para posterior visualização sob a luz ultravioleta e fotodocumentação.

Os amplicons foram digeridos pela enzima de restrição *BseBI* (Jena Bioscience, Jena-Germany), que reconhece a sequência 5' CC/WGG 3' seguindo o protocolo térmico recomendado pelo fabricante. As reações foram calculadas para um volume final de 12,5 µL (volume bem inferior ao sugerido pelo fabricante: 50 µL) contendo: 2,5 µL (o dobro da concentração sugerida pelo fabricante: 1x; modificação que melhorou bastante o resultado final da reação) do tampão da enzima (10x buffer B2), 6 µL (valor que também precisou ser adaptado, tendo em vista que a sugestão do fabricante era de 1/5 do volume final da reação) do produto da PCR (amplicons), 0,2 µL da enzima *BseBI* e 3,8 µL de H₂O. Após o período de corte enzimático as amostras foram colocadas no freezer para inativação da enzima e posterior avaliação por eletroforese em gel de agarose 2%.

Trabalho gerado a partir de Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE) sob a Licença nº 017/2013.

RESULTADOS

Do total de amostras analisados, 5,3% (8/150) foram positivas para dermatófitos na cultura, das quais 75% (6/8) foram identificadas como *M. canis*, 12,5% (1/8) como *M. gypseum* e 12,5 (1/8) como *T. mentagrophytes*.

O tamanho dos fragmentos amplificados na PCR pode ser observado na figura 1 e o padrão de bandas encontrado após PCR-RFLP, na figura 2. O Quadro 1 mostra o tamanho dos fragmentos e os respectivos padrões observado após restrição enzimática.

Na figura 1 observam-se fragmentos de tamanhos diferentes para cada espécie analisada. Outra informação que pode ser observada na mesma imagem é a amplificação de dois fragmentos no poço 01 que por comparação com as outras bandas amplificadas indicam a existência de dois agentes presentes na mesma amostra, sendo um deles *M. canis* e o outro um possível *M. gypseum*, fato confirmado posteriormente quando confrontados os resultados obtidos na cultura. A amostra em questão, pertencente a um felino fêmea, foi analisada em dois momentos; o primeiro quando da suspeita da doença, sendo isolado *M. canis* e o segundo quando o animal já se encontrava em tratamento e foi realizada uma coleta para avaliação de sua eficácia, sendo isolado nesta análise *M. gypseum*, o que confirma que o

segundo agente já estava presente na amostra desde o início, mas em quantidade não suficiente para ser detectado na cultura.

DISCUSSÃO

De acordo com Fungaro (2001) e Copeto (2010), as regiões ITS são relativamente curtas (500 a 800pb) por serem flanqueadas por segmentos conservados e o fato de aparecerem em grande número de cópias no genoma permite que sejam amplificadas e sequenciadas com facilidade. Esta informação confirma que os fragmentos observados neste estudo (Fig. 1 e 2) tratam-se realmente de sequências contidas na região ITS, região-alvo utilizada em vários estudos moleculares para identificação de espécies de dermatófitos.

Gutzmer et al. (2004) desenvolveram um método de PCR para rápida detecção e diferenciação de fungos em amostras dermatológicas, utilizando sete pares de *primers* localizados no DNA ribossômico (rDNA) e na região ITS e obtiveram informações mais conclusivas a respeito do diagnóstico, em 23,7% (9/38) dos casos, pela PCR quando comparado aos resultados obtidos nos métodos convencionais.

Jackson, Barton & Evans (1999) também amplificaram a região ITS e identificaram fragmentos de aproximadamente 692pb para várias espécies de *Trichophyton*, 740pb para *M. canis* e *Epidermophyton floccosum* e 610pb para *M. gypseum*.

Mirzahoseini et al. (2009) amplificaram a região ITS utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4 pela PCR-RFLP e observaram fragmentos de aproximadamente 720pb para *M. canis* e 680 pb para *T. mentagrophytes*, valores bem próximos ao encontrados por Shehata et al. (2008) que também analisaram a região ITS utilizando os mesmos *primers* e técnica, obtendo para *M. canis* o valor aproximado de 740pb e para espécies de *Trichophyton*, incluindo *T. mentagrophytes*, um produto amplificado de aproximadamente 690pb.

Esses resultados são muito semelhantes aos obtidos neste estudo (Quadro 1). Os resultados aqui encontrados também estão de acordo com aqueles relatados por Lemsaddek (2008) que ao amplificar a região ITS com o objetivo de identificar dermatófitos, observou amplicons de 750pb para *M. canis*, 690pb para *T. mentagrophytes* e 660pb para *M. gypseum*.

CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados conclui-se que os padrões de fragmentos obtidos através da PCR-RFLP identificam *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, possibilitando o uso da técnica para uma identificação mais rápida destas espécies de dermatófitos em cães e gatos.

REFERÊNCIAS

- 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 *Microsporum canis*. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci. 39:238-243.
- Colombo A. L. 2007. Diagnóstico de doenças fúngicas oportunistas: o grande desafio para os Centros Médicos de atendimento terciário. Prática Hospitalar. 52:50-55.
- Copeto S. C. M. F. 2010. Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses. Dissertação de Mestrado em Ciências Biomédicas, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 116 p.
- Cruz, L. C. H. 2010. Dermatófitos, p. 111-142. In: Ibid. (Ed), Micologia Veterinária. 2. ed. Editora Revinter, Rio de Janeiro.
- 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. 39:3382-3385.

- Fungaro M. H. P. 2001. PCR na micologia: diagnóstico e análise de variabilidade. *Biotec. Ciênc. & Desenv.* 14:12-16.
- Garcia J. F. 1995. Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (polymerase chain reaction) de embriões bovinos. Tese de Doutorado em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 76 p.
- 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. Med. Microbiol.* 53:1207-1214.
- 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.* 37:931-936.
- Lemsaddek A. 2008. Estudo de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Tese de Doutorado em Biologia, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa. 218 p.
- 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. *Iranian J. Pub. Health.* 38:18-24.
- Muller G. H. & Kirk R. W. 1996. *Dermatologia de pequenos animais*. 5ª ed. Interlivros, Rio de Janeiro. 1130p.
- 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: Ciências Agrárias.* 31:459-468.
- Quinn P. J., Markey B. K. Carter M. E., Donnelly W. J. & Leonard F.C. 2005. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, p. 224-228.
- Shehata A. S., Mukherjee P. K., Aboulatta H. N., Akhras A. I. El, 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.* 46:2641-2645.
- Vergara C. C., Parcha C., Pineda J. & Arenas E. R. 2006. Estandarización de una Técnica de Amplificación Genómica (PCR) para 38B Diagnóstico de Dermatofitos. *Ciencia & Trabajo.* 8:167-171.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, p.315-322. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. White T.J. (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, New York, USA.

Legendas das Figuras

- Fig.1. Amplificação do DNA extraído de colônias de dermatófitos utilizando os *primers* ITS 1 e ITS 4. M: Marcador molecular (100 pb – amresco®); poços 01, 03, 06 e 09: *Microsporium canis*; 02, 04, 07 e 10: *Microsporium gypseum*; 05, 08 e 11: *Trichophyton mentagrophytes*; C-: controle negativo.
- Fig.2. Padrão de bandas observado após digestão enzimática com endonuclease BseBI dos amplicons obtidos na PCR. M: Marcador molecular (1kb Plus - Fermentas); poços 01e 06: *M. gypseum*; 02, 04 e 05: *M. canis*; 03e 07: *T. mentagrophytes*; 08: vazio; C-: controle negativo.

Quadro

Quadro 1. Tamanho dos fragmentos amplificados a partir de colônias de dermatófitos e padrão observado para cada espécie analisada no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos da UFRPE em 2011 e 2012

Agente etiológico	Fragmento amplificado PCR (pb)	Padrão enzimático PCR-RFLP (pb)
<i>M. canis</i>	~740	~ 500, 700 e 810
<i>M. gypseum</i>	~640	~ 490, 540 e 700
<i>T. mentagrophytes</i>	~680	~ 490, 590, 680 e 800

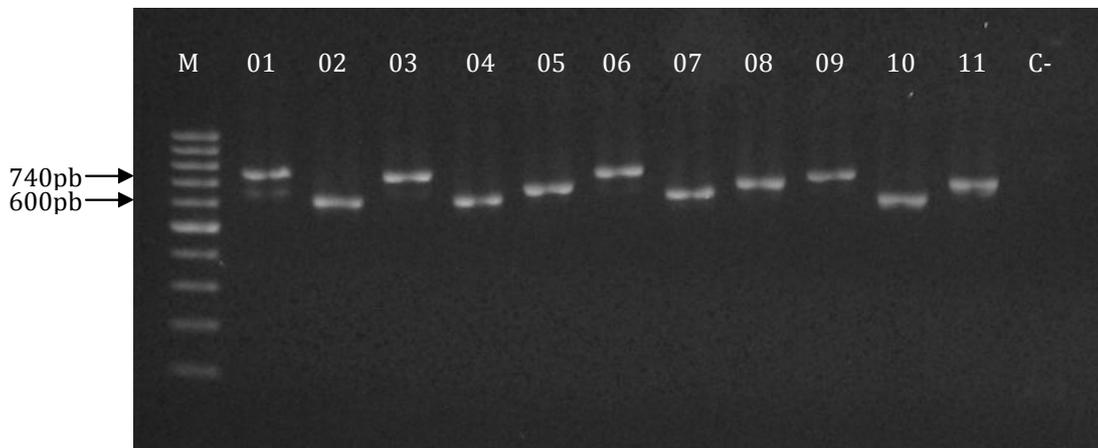


Figura 1

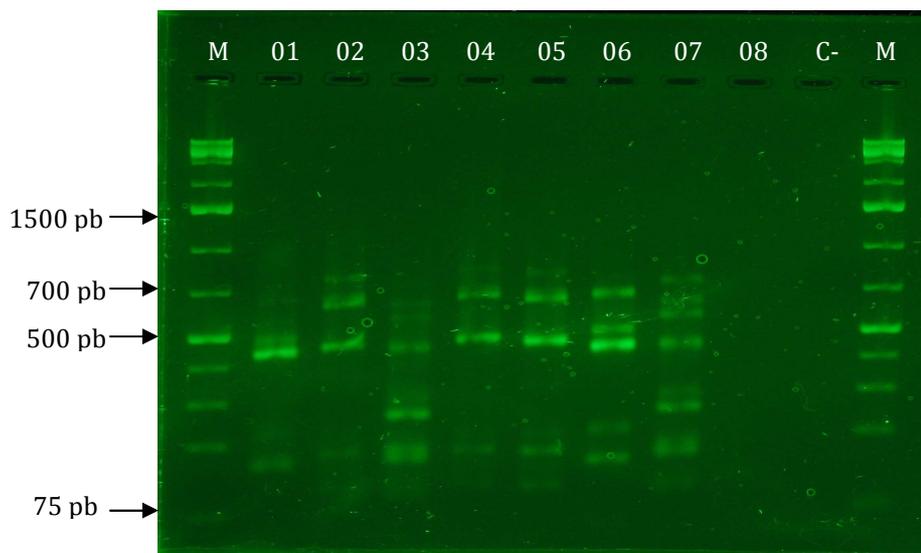


Figura 2

Instruções aos autores

Revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras “pesadas”), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos**

demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso);

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”;** a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano;** a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas

preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, começando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

1 **Comparação de métodos tradicionais com a técnica da PCR-RFLP na identificação de**
2 **dermatófitos em cães e gatos**

3 [Comparison of traditional methods with PCR-RFLP identification of dermatophytes in dogs
4 and cats]

5
6 C. A. S. Leal^{1*}
7

8 ¹Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos, Departamento de Medicina
9 Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de
10 Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brasil. *Autor para correspondência:

11 c_adrianosl@hotmail.com
12

13 **RESUMO**
14

15 Objetivou-se neste estudo comparar a técnica da PCR-RFLP com métodos tradicionais de
16 identificação de dermatófitos que acometem cães e gatos. Foram analisadas 150 amostras
17 clínicas de animais com dermatopatias. Foram realizados exames diretos, culturas e extrações
18 de DNA dos pelos e/ou crostas para identificação dos dermatófitos. Os *primers* utilizados
19 foram o ITS 1 e o ITS 4. A endonuclease *Bse*BI foi a escolhida para a obtenção do padrão de
20 fragmentos. Para o estudo de concordância entre os testes utilizou-se o coeficiente de Kappa
21 (*K*). Observou-se uma excelente concordância entre os resultados da cultura e da PCR-RFLP,
22 87,5% (7/8). Observou-se também que amostras que negativaram nos métodos tradicionais
23 (exame direto e cultura), mas estavam contaminadas com o agente, puderam ser identificadas
24 com a técnica molecular, indicando uma maior sensibilidade da mesma. A partir da análise de
25 concordância entre os resultados obtidos pelos métodos tradicionais e técnica molecular,
26 conclui-se que a PCR-RFLP é mais sensível e tão específica quanto os métodos de rotina, o
27 que permite que a mesma seja utilizada para a identificação mais rápida de *Microsporum*
28 *canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* em amostras clínicas de cães e
29 gatos.
30

31 **Palavras-chave:** Dermatofitose, diagnóstico, ITS.
32 _____
33

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the PCR-RFLP with traditional methods of identification of dermatophytes that affect dogs and cats. We analyzed 150 clinical samples from animals with skin diseases. Direct examinations, cultures and DNA extractions of the material collected were performed for identification of dermatophytes. The primers used were ITS 1 and ITS 4. The BseBI endonuclease was chosen to obtain the pattern of fragments. To study the correlation between the tests we used the Kappa coefficient (K). There was an excellent agreement between the results of culture and PCR-RFLP, 87,5 % (7/8). It was also observed that samples which were negative in traditional methods (direct examination and culture), but were contaminated with the agent, could be identified with the molecular technique, indicating a higher sensitivity of the same. From the analysis of agreement between results obtained by traditional methods and molecular technique, it is concluded that the PCR-RFLP method is more sensitive and as specific as the routine methods, allowing it to be used for more rapid identification *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum* in clinical samples from dogs and cats.

Keywords: Dermatophytosis, diagnosis, ITS.

INTRODUÇÃO

Dermatófitos são fungos que possuem a capacidade de invadir e multiplicar-se em estruturas queratinizadas causando dermatofitose em homens e animais (LIU et al., 2000; LIU et al., 2002; QUINN et al., 2005; COELHO et al., 2008). Os gêneros mais envolvidos nas infecções em animais são *Microsporum* e *Trichophyton* (MULLER e KIRK, 1996; CAVALCANTE, 2006).

Segundo Costa (2010), *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* são os principais agentes etiológicos das dermatofitoses em cães e gatos, pois são dotados de alta infectividade e baixa patogenicidade e virulência.

O diagnóstico da dermatofitose é feito pelo histórico do paciente, avaliação das lesões, microscopia direta de pelos e crostas, permitindo a visualização de estruturas fúngicas livres ou aderidas ao pelo. Também pode ser utilizada a biópsia, cultivo em placas com meios

1 específicos, além da lâmpada de Wood, que oferece um diagnóstico rápido, no entanto
2 passível de erros, porém mesmo com essa variedade de métodos disponíveis, o diagnóstico
3 laboratorial da dermatofitose ainda representa uma grande dificuldade na rotina da clínica
4 veterinária (CAVALCANTI et al., 2002; CHAVES, 2007).

5 Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas para a identificação laboratorial de
6 espécies de dermatófitos, sendo consideradas mais estáveis, rápidas e precisas do que aquelas
7 que se baseiam nas características fenotípicas (GUTZMER et al., 2004; SHEHATA et al.,
8 2008). Dentre elas está a PCR, que é uma técnica simples e rápida (SHEHATA et al., 2008).
9 Porém, no que se refere à diferenciação intra-específica de agentes deste grupo, os resultados
10 não são satisfatórios, devido a grande semelhança genética (GIUDICE, 2008).

11 O estudo da região ITS (Espaçadores Transcritos Internos) pode ser de grande
12 importância para a identificação de espécies de dermatófitos, no entanto, o uso desta técnica
13 para biotipagem das espécies ainda é limitado por que nenhuma variação intra-específica foi
14 encontrada (GIUDICE, 2008; COPETO, 2010).

15 Mirzahoseini et al. (2009) utilizaram a técnica do Polimorfismo do Tamanho do
16 Fragmento de Restrição a partir do produto da PCR (PCR-RFLP) e obtiveram resultados que
17 mostraram a possibilidade da identificação de gêneros e até de espécies de dermatófitos a
18 partir da amplificação da região ITS.

19 Segundo Kanbe (2008), várias técnicas baseadas em DNA mitocondrial, PCR, RFLP e
20 sequenciamento já foram utilizadas para identificação de dermatófitos ao longo dos anos,
21 demonstrando sensibilidade e especificidade, além de rapidez no diagnóstico.

22 Objetivou-se neste estudo comparar a técnica da PCR-RFLP com métodos tradicionais
23 de identificação de dermatófitos que acometem cães e gatos.

24 25 **MATERIAL E MÉTODOS**

26
27 As amostras foram coletadas no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural
28 de Pernambuco e processadas no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais
29 Domésticos da UFRPE. O material analisado consistiu de amostras de pelos e/ou crostas,
30 obtidas pelo método de avulsão e/ou raspado cutâneo das bordas das lesões com lâmina de
31 bisturi estéril, sendo acondicionado em papel limpo e enviado ao laboratório, conforme Cruz
32 (2010).

1 Foram analisadas 150 amostras clínicas de animais com dermatopatias. O exame
2 direto foi realizado utilizando-se o clarificante hidróxido de potássio (30%), em escamas de
3 pele e pelos para identificação de estruturas de parasitismo como hifas e artroconídios de
4 acordo com Muller e Kirk (1996). As amostras de pelos e/ou crostas foram cultivadas em ágar
5 dextrose Sabouraud adicionado de extrato de levedura, cloranfenicol e ciclo-heximida. As
6 placas foram incubadas aerobicamente em temperatura ambiente (25-27°C) e examinadas
7 diariamente por até cinco semanas de acordo com Cruz (2010).

8 O DNA das amostras clínicas foi extraído utilizando-se o kit de extração DNeasy
9 Blood & Tissue (QIAGEN[®], Hilden – Germany) que não é o mais indicado para este tipo de
10 extração e não possui protocolo estabelecido para este tipo de material, sendo necessárias
11 algumas adaptações ao protocolo de extração de DNA de tecidos em geral, o qual ficou da
12 seguinte forma: em um tubo tipo *ependorf* contendo 180 µL de tampão ATL acrescentou-se
13 os pelos e/ou crostas e homogeneizou-se em vortex por 15s; em seguida adicionou-se 20 µL
14 de proteinase K, homogeneizou-se rapidamente no vortex e incubou-se em banho seco com
15 agitação à 56°C por 1h e 1500 rpm (primeira adaptação feita: o protocolo sugeria um tempo
16 máximo de 40 min. para os tecidos mais resistentes, porém foi preciso aumentar este tempo
17 para obtenção de melhores resultados); acrescentou-se, após este período, 4 µL de RNase à
18 suspensão (segunda adaptação: esta etapa não existia no protocolo original), homogeneizou-
19 se e incubou-se em temperatura ambiente por 5 min.; Levou-se novamente ao vortex e
20 adicionou-se 200 µL de tampão AL, vortex, adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%) e
21 novamente homogeneizou-se no vortex; preparou-se tubo de coleta acoplado ao filtro
22 (embalagens individuais) e transferiu-se 600 µL ou o que se conseguiu do conteúdo do
23 *ependorf* e em seguida centrifugou-se a 8000 rpm/1min.; trocou-se o tubo de coleta (a parte
24 de baixo) e adicionou-se 500 µL do tampão AW1 e centrifugou-se a 8000 rpm/1min.; trocou-
25 se novamente o tubo de coleção e adicionou-se 500 µL do tampão AW2 e centrifugou-se a
26 14000 rpm/3min.; trocou-se a parte de baixo por um tubo tipo *ependorf* devidamente
27 identificado, adicionou-se 100 µL do tampão AE (terceira modificação: o volume sugerido
28 pelo fabricante era o dobro e verificamos que reduzindo à metade concentramos as amostras e
29 melhoramos os resultados), incubou-se em temperatura ambiente por 10 min. e centrifugou-se
30 a 8000 rpm/1min.; retirou-se o filtro (coluna) e armazenou-se os tubos identificados no
31 freezer.

1 As reações de amplificação do DNA foram realizadas para um volume final de 25
2 μL , contendo: 5 μL de DNA genômico; 1 μL de cada *primer* a 10 μM (ITS 1 e ITS 4); 5,5 μL de
3 Água Mili-Q ultrapura e 12,5 μL de Top Taq™ Master Mix (QIAGEN®, Hilden – Germany),
4 de acordo com instruções do fabricante. Foi utilizado como controle negativo água ultra pura
5 e como controles positivos DNA extraído de colônias de *M. canis*, *M. gypseum* e *T.*
6 *mentagrophytes*. Os *primers* utilizados foram: ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3');
7 e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White et al.,1990) (Eurofins MWG Operon)
8 que amplificam as regiões ITS I, 5,8S e ITS II do DNA ribossomal (rDNA). O protocolo
9 térmico para a amplificação foi o recomendado por Mirzahoseini et al. (2009) que consistiu de
10 35 ciclos de 93°C por 1 min, 58°C por 1 min e 72°C por 1 min, seguidos de uma etapa de
11 extensão final de 72°C por 7 min. Após a amplificação, o produto de PCR foi colocado em gel
12 de agarose 2%, corado com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia) e posto em cuba
13 de eletroforese com tampão Tris-acetato-EDTA (1X) (Amresco®) para posterior visualização
14 sob a luz ultravioleta e fotodocumentação.

15 Os amplicons foram digeridos pela enzima de restrição *BseBI* (Jena Bioscience, Jena-
16 Germany), que reconhece a sequência 5' CC/WGG 3' seguindo o protocolo térmico
17 recomendado pelo fabricante. As reações foram calculadas para um volume final de 12,5 μL
18 (volume bem inferior ao sugerido pelo fabricante: 50 μL) contendo: 2,5 μL (o dobro da
19 concentração sugerida pelo fabricante: 1x; modificação que melhorou bastante o resultado
20 final da reação) do tampão da enzima (10x buffer B2), 6 μL (valor que também precisou ser
21 adaptado, tendo em vista que a sugestão do fabricante era de 1/5 do volume final da reação)
22 do produto da PCR (amplicons), 0,2 μL da enzima *BseBI* e 3,8 μL de H₂O. Após o período de
23 corte enzimático as amostras foram colocadas no freezer para inativação da enzima e posterior
24 avaliação por eletroforese em gel de agarose 2%.

25 Para o estudo de concordância entre os métodos de diagnóstico utilizou-se o
26 coeficiente de Kappa (*K*) e a interpretação dos valores *K* adotadas foram: 0,00 - 0,20 =
27 concordância fraca; 0,21 - 0,40 = regular; 0,41 - 0,60 = moderada; 0,61 - 0,80 = boa; 0,81-
28 1,00 = muito boa, valores negativos são interpretados como equivalentes a 0,00 (LANDIS &
29 KOCH, 1977). Para o cálculo de concordância utilizou-se o programa computacional Bioestat
30 versão 5.0. Trabalho gerado a partir de Projeto aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
31 Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE) sob a Licença n°
32 017/2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando-se os resultados das amostras clínicas, observou-se que 5,3% (8/150) foram positivos na cultura, 4,7% (7/150) no exame direto e 6% (9/150) na PCR-RFLP (Tab. 1 e 2).

As análises de concordância entre os resultados observados nos métodos tradicionais de identificação de dermatófitos estão apresentadas na Tab. 1. Na Tab. 2 estão apresentadas as análises de concordância entre os resultados da cultura e da PCR-RFLP. Na Fig. 1 estão os resultados obtidos na PCR-RFLP.

Tabela 1. Análise de concordância entre métodos convencionais de diagnóstico de dermatófitos isolados de amostras clínicas de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE em 2011 e 2012

Exame Direto	Microbiológico				Valor de P	Kappa	Sens. (%)	Espec. (%)
	Positivo		Negativo					
	F.A.	F.R.(%)	F.A.	F.R.(%)				
Positivo	5	71,4	2	28,6	<0,0001	0,649	62,5	98,6
Negativo	3	2,1	140	97,9				

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

Quando comparados os resultados obtidos no exame direto com a cultura (Tab. 1) percebeu-se que das sete amostras positivas no primeiro exame, 28,6% (2/7) negativaram na cultura o que deixa claro as dificuldades encontradas para o diagnóstico por este método. Segundo Chaves (2007) os artroconídios podem ser confundidos com bolhas que se formam durante o processo de clarificação, e mimetizam essas estruturas fúngicas induzindo o laboratorista a erros de interpretação.

Tabela 2. Análise de concordância entre resultados da cultura e da PCR-RFLP para fungos dermatófitos isolados de amostras clínicas de cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE em 2011 e 2012

PCR-RFLP	Microbiológico				Valor de P	Kappa	Sens. (%)	Espec. (%)
	Positivo		Negativo					
	F.A.	F.R.(%)	F.A.	F.R.(%)				
Positivo	7	77,8	2	22,2	<0,0001	0,813	87,5	98,6
Negativo	1	0,7	140	99,3				

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

Quando comparados os resultados obtidos na PCR-RFLP com os da cultura (Tab. 2), observou-se um aumento percentual na sensibilidade. Observou-se também um aumento na concordância entre os resultados, quando se comparou os valores de Kappa.

Das nove amostras que apresentaram um padrão de bandas referente a uma das três espécies de dermatófitos pesquisadas, 66,7% (6/9) foram identificadas como *M. canis* e 33,3% (3/9) como *T. mentagrophytes*. Na análise molecular, a amostra 01 (Fig. 1) amplificou duas bandas, na PCR, de pesos moleculares diferentes e equivalentes às espécies *M. canis* e *M. gypseum*, situação similar à encontrada por Copeto (2010) que observaram duas ou três bandas amplificadas na mesma amostra (unhas humanas) e verificaram posteriormente, por meio de sequenciamento, que se tratava de espécies de fungos diferentes parasitando simultaneamente o tecido. No entanto, após o corte enzimático dessa amostra observou-se apenas um fragmento de peso molecular equivalente a *M. gypseum*, o que pode ser explicado pela concentração elevada de DNA naquela amostra, interferindo na ação da enzima de restrição.

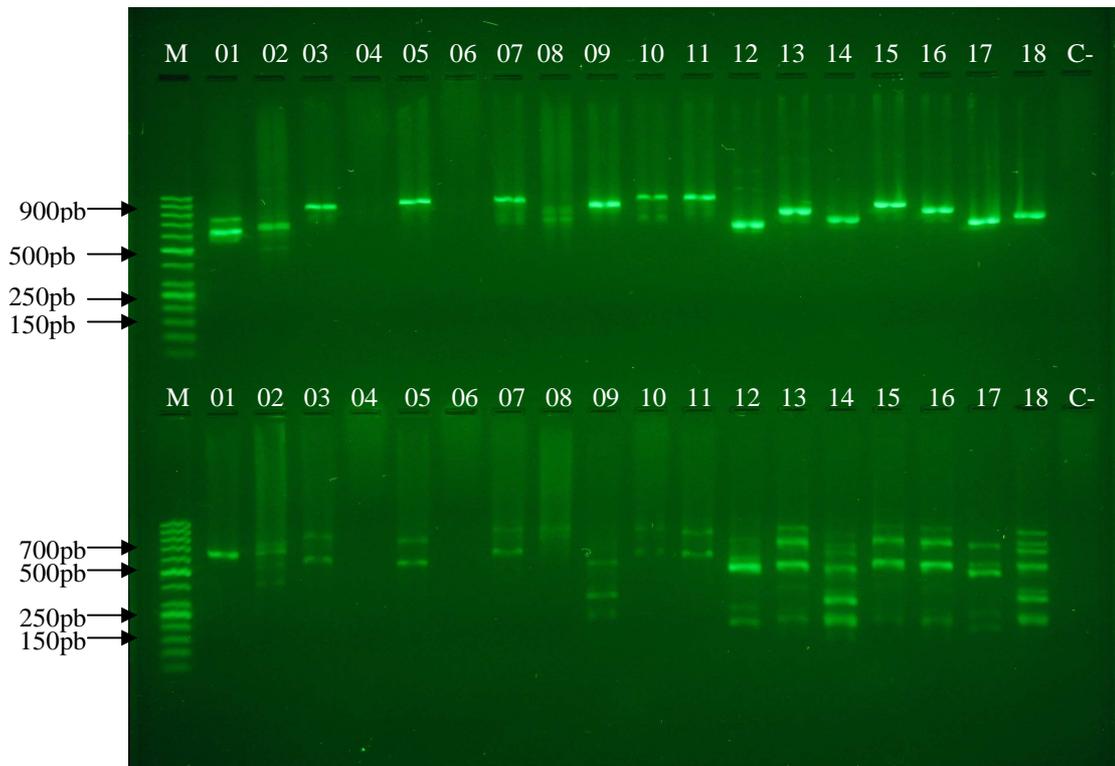


Figura1. Gel de agarose 2% com os resultados obtidos na técnica da PCR-RFLP. PCR (parte superior do gel) e PCR-RFLP (parte inferior do gel). M: marcador molecular 50pb (Fermentas); Amostras: 01- *M. canis* e *gypseum*; 02- *Malassezia* sp.; 03,05, 07, 10 e 11- *M. canis*; 04- *M. gypseum*; 06- *Bacillus* sp.; 08- *Aspergillus* sp.; 09- *T. mentagrophytes*; 12 e17- controles positivos *M. gypseum*; 13, 15 e 16- controles positivos *M. canis*; 14 e 18- controles positivos *T. mentagrophytes*; C-: controle negativo. Amostras identificadas conforme resultado obtido na cultura.

1 Desta mesma amostra, inicialmente analisada por meio de cultura, isolou-se *M.*
 2 *canis*, agente também identificado molecularmente; após o tratamento do animal foi solicitada
 3 uma nova avaliação por meio da coleta de nova amostra, sendo isolado nesta ocasião *M.*
 4 *gypseum*. Resultados em momentos diferentes que confirmam a alta sensibilidade e
 5 especificidade da técnica utilizada, levando a acreditar que existia uma infecção simultânea,
 6 mas que o segundo agente isolado estava, inicialmente, em quantidade não suficiente para ser
 7 detectado na cultura e após o tratamento o agente mais sensível foi eliminado, predispondo ao
 8 desenvolvimento do mais resistente. Desta segunda amostra da qual se isolou *M. gypseum* não
 9 se conseguiu amplificar o DNA do agente em questão (amostra 04, Fig. 1), talvez pela
 10 quantidade insuficiente de material restante da amostra.

11 Na amostra 09 (Fig. 1) ocorreu o contrário, na primeira colheita identificou-se o
 12 agente tanto pelos métodos clássicos quanto pelos moleculares; na segunda colheita após o
 13 tratamento, não se isolou mais o agente na cultura o que sugere uma eliminação ou
 14 inviabilização do patógeno, porém, foi possível identificar o DNA do agente na amostra
 15 (amostra 06, Fig. 2), o que indica que o agente ainda fica presente nos tecidos tratados,
 16 mesmo após a cura clínica, por isto é que em infecções fúngicas se prescreve manter o
 17 tratamento por uma a duas semanas após o desaparecimento das lesões.

18

19

20

21

22

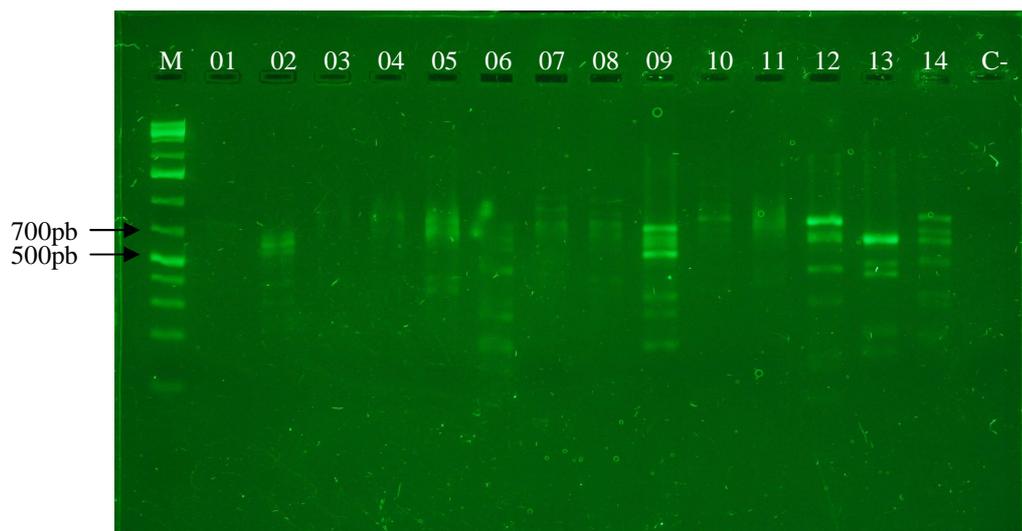
23

24

25

26 **Figura 2.** Gel de agarose 2% com amostras negativas na cultura. M: Marcador
 27 Molecular (1kb Plus, Fermentas). Controles positivos: 12 (*M. canis*), 13
 28 (*M. gypseum*) e 14 (*T. mentagrophytes*); C-: controle negativo; amostras
 29 06 e 09 apresentando padrões similares a *T. mentagrophytes*

30



1 Uma terceira amostra (amostra 09, Fig. 2) que foi negativa nos exames de rotina, no
2 exame molecular demonstrou um padrão de bandas semelhante a *T. mentagrophytes*, o que
3 remonta a mesma situação acima citada, mas também demonstra a alta sensibilidade da
4 técnica, tendo em vista que o material analisado foi o mesmo para todos os exames e que o
5 animal apresentava lesões sugestivas de dermatofitose.

6 Copeto (2010) pela análise do sequenciamento de amostras amplificadas com os
7 *primers* ITS 1 e ITS 4 comprovou a especificidade destes para fungo, fato também
8 evidenciado neste estudo na amostra 06 (Fig. 1), que na cultura apresentou somente
9 crescimento bacteriano e não apresentou nenhuma amplificação na análise molecular o que
10 além de reforçar a constatação desse autor, confirma que o DNA amplificado pertence aos
11 fungos dermatófitos e não a outro material contaminante.

12 A PCR-RFLP, uma variação da PCR, permite a obtenção de uma série de fragmentos
13 de DNA de tamanhos diferentes que dão origem a um padrão de bandas, e baseia-se na
14 presença de sítios de restrição na região amplificada do DNA-alvo que pode ser determinada
15 por intermédio do processamento do produto da PCR, com uma ou mais endonucleases de
16 restrição (GARCIA, 1995; VERGARA et al., 2006).

17 Neste estudo observou-se concordância entre os resultados (positivos e negativos) da
18 cultura e da PCR-RFLP em 98% (147/150) das amostras analisadas, o que é equivalente ao
19 obtido por Machouart-Dubach et al. (2001) que observaram que 74 das 75 amostras
20 analisadas foram concordantes nos resultados em ambas as técnicas, considerando a técnica
21 molecular adequada para o diagnóstico rápido de dermatofitose em amostras clínicas
22 humanas. Também se assemelha ao resultado obtido por Wisselink et al. (2011) que
23 utilizaram a PCR em tempo real para identificação de dermatófitos em pacientes humanos,
24 comparando-a com a cultura e observaram 97,41% de concordância entre os resultados em
25 nível de gênero.

26 Vergara et al. (2006) padronizaram uma técnica de PCR para o diagnóstico de
27 dermatófitos e observaram uma concordância de 93,3% entre os resultados obtidos na PCR e
28 os obtidos com os métodos tradicionais de diagnóstico, quando analisaram 30 cepas
29 pertencentes a esse grupo de fungos, no entanto, quando analisaram 30 amostras clínicas
30 positivas e negativas de pacientes humanos com infecção ativa, observaram 100% de
31 concordância entre os resultados obtidos, o que sugeriu que a PCR é uma técnica que oferece
32 grandes vantagens na identificação dos fungos dermatófitos.

- 1 COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais
2 domésticos em Vila Real, Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*,
3 v.60, n.4, p.1017-1020, 2008.
4
- 5 COPETO, S. C. M. F. *Contribuição para o diagnóstico molecular das onicomicoses*. 2010.
6 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) – Instituto de Higiene e Medicina
7 Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.
8
- 9 COSTA, F. V. A. *Determinação da variabilidade genotípica entre isolados de *Microsporum**
10 *canis*. 2010. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária,
11 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
12
- 13 CRUZ, L. C. H. *Micologia Veterinária*. 2. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2010. p. 111-142.
14
- 15 FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E. et al. Application of PCR to Distinguish Common
16 Species of Dermatophytes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 9, p.3382–3385, 2001.
17
- 18 GARCIA, J. F. *Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR*
19 *(polymerase chain reaction) de embriões bovinos*. 1995. 76 f. Tese (Doutorado em
20 Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São
21 Paulo, São Paulo.
22
- 23 GIUDICE, M. C. *Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem*
24 *molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões*
25 *geográficas do Brasil*. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de
26 Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
27
- 28 GRÄSER, Y.; FARI, M. EL; PRESBER, W. et al. Identification of common dermatophytes
29 (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *British*
30 *Journal of Dermatology*. v.138, n.4, p.576-582, 1998.
31
- 32 GUTZMER, R.; MOMMERT, S.; KÜTTLER, U. et al. Rapid identification and
33 differentiation of fungal DNA in dermatological specimens by LightCycler PCR. *Journal of*
34 *Medical Microbiology*. v.53, n.12, p.1207–1214, 2004.
35
- 36 KANBE, T. Molecular approaches in the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*.
37 v.166, n.5-6, p.307–317, 2008.
38
- 39 LANDIS, J.R. e KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data.
40 *Biometrics*, v.33, n.1, p. 159-174, 1977.
41
- 42 LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R.; PEDERSEN, J. Application of PCR to the identification of
43 dermatophyte fungi. *Journal of Medical Microbiology*, v. 49, p. 493-497, 2000.
44
- 45 LIU, D.; PEARCE, L.; LILLEY, G. et al. PCR identification of dermatophyte fungi
46 *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *Journal of Medical Microbiology*, v.
47 51, p. 117-122, 2002.
48

1 MACHOUART-DUBACH, M.; LACROIX, C.; CHAUVIN, M. F. et al. Rapid
2 discrimination among dermatophytes, *scytalidium* spp., and other fungi with a pcr-restriction
3 fragment length polymorphism ribotyping method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39,
4 n.2, p. 685–690, 2001.

5
6 MIRZAHOSEINI, H.; OMIDINIA, E.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M. et al. Application of
7 PCR-RFLP to Rapid Identification of the Main Pathogenic Dermatophytes from Clinical
8 Specimens. *Iranian Journal of Public Health*, v. 38, n.1, p.18-24, 2009.

9
10 MULLER, G. H.; KIRK, R. W. Dermatologia de pequenos animais. 5. ed. Rio de Janeiro:
11 Interlivros, 1996. 1130p.

12
13 QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E. et al. Microbiologia veterinária e doenças
14 infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 224-228.

15
16 SHEHATA, A. S.; MUKHERJEE, P. K.; ABOULATTA, H. N. et al. Single-Step PCR Using
17 (GACA)₄ Primer: Utility for Rapid Identification of Dermatophyte Species and Strains.
18 *Journal of Clinical Microbiology*, v. 46, n. 8, p. 2641–2645, 2008.

19
20 VERGARA, C. C.; PARCHA, C.; PINEDA, J.; ARENAS, E. R. Estandarización de una
21 Técnica de Amplificación Genómica (PCR) para el Diagnóstico de Dermatofitos. *Ciencia &*
22 *Trabajo*, v. 8, n. 22, p. 167-171, 2006.

23
24 WHITE, T.J.; BRUNS, T.; LEE, S. & TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of
25 fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and
26 Applications. (Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; White, T.J., editors). New York:
27 Academic Press, 1990. p.315-322.

28
29 WISSELINK, G. J.; VAN ZANTEN, E.; KOOISTRA-SMID, A. M. D. Trapped in keratin; a
30 comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical
31 samples using culture and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.85, p.62–66,
32 2011.

33
34
35
36

Instruções aos autores

Política Editorial

O periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (online), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://www.abmvz.org.br/>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou <http://www.abmvz.org.br/>.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço <http://www.abmvz.org.br/>.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo

Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.

- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido no campo próprio.
- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação

Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Comunicação

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

Título: Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.

Autores e Filiação: Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação;
2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.

Resumo e Abstract: Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.

Palavras-chave e Keywords: No máximo cinco.

Introdução: Explanação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.

Material e Métodos: Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.

Resultados: Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

Tabela: Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

Figura: Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências;

As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.

Discussão: Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).

Conclusões: As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.

Agradecimentos: Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

Referências: As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

strong>Como referenciar:

1. Citações no texto

Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
- mais de dois autores: (Ferguson et al., 1979) ou Ferguson et al. (1979)
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson et al. (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson et al., 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

Citação de citação: Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão citado por e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

Comunicação pessoal: Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <**Erro! A referência de hiperlink não é válida.**>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/%20MiamiHerld-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como "Desistência do Autor" artigos em diligência ou "Aguardando diligência do autor", que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação

- **Taxa de submissão:** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados. Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação:** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail abmvz.artigo@abmvz.org.br