

LEITE, João Jaime Giffoni. **Caracterização fenotípica e molecular, detecção de genes de virulência e perfil de sensibilidade antifúngica de *Trichophyton tonsurans***. 2012. 150 f. Tese (Doutorado em em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RESUMO

Trichophyton tonsurans é uma espécie de dermatófito ubíqua representada em todos os continentes, sendo um parasita antropofílico por excelência, embora casos em animais já tenham sido reportados. O considerável aumento dos isolamentos de *T. tonsurans* tem demonstrado importância mundial, especialmente relacionado a casos de *Tinea capitis* nos EUA, Canadá, Japão e Brasil. O objetivo geral deste trabalho foi contribuir para melhor entendimento sobre os aspectos fenotípicos e genotípicos de *T. tonsurans*. Foram utilizadas 25 cepas de *T. tonsurans* isoladas de casos de *Tinea capitis* na cidade de Fortaleza-CE. A fenotipagem dos isolados foi realizada com base em características macro e micromorfológicas, bioquímicas e nutricionais. A sensibilidade ante aos antifúngicos foi avaliada através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando as drogas cetoconazol (CET), itraconazol (ITR), fluconazol (FLU), voriconazol (VOR) e griseofulvina (GRI). Quanto aos aspectos moleculares, as cepas foram identificadas através de PCR-RFLP, avaliadas através dos marcadores moleculares polimórficos, RAPD e M13-*fingerprinting* e submetidas a detecção de sete genes de virulência que codificam as enzimas carboxipeptidase-M14, ceramidase, subtilisina-2, laccase, urease, fosfolipase e aspartato proteinase (*CarbM14*, *Ceraminidase*, *SUB2*, *Lac*, *URE1*, *PBL1* e *Cnap1*). No teste de sensibilidade, as cepas de *T. tonsurans* estudadas mostraram valores de CIM $\leq 0,03$ a $16\mu\text{g}/\text{mL}$ para ITR e CET, $\leq 0,125$ a $4\mu\text{g}/\text{mL}$ para VOR, $62,5$ a $250\mu\text{g}/\text{mL}$ para FLU e 2 a $16\mu\text{g}/\text{mL}$ para GRI. Na análise molecular, os isolados *T. tonsurans* analisados apresentaram baixa variabilidade genômica, na qual, do total de 25 amostras, 18 (72%) apresentaram padrão eletroforético semelhante, com fragmentos de tamanhos entre 61 a 1200pb. Todos os isolados analisados foram negativos na amplificação dos genes *PBL1* e *Cnap1* e positivos para os genes *CarbM14*, *Ceraminidase*, *SUB2*, *Lac* e *URE*. Além da detecção do gene codificante da enzima laccase (*Lac*), foi possível determinar fenotipicamente a produção de melanina nos isolados. Assim, os isolados de *T. tonsurans* analisados mostraram-se sensíveis, *in vitro*, aos derivados azólicos e a griseofulvina, embora valores elevados de CIM tenham sido obtidos com fluconazol. Apesar da baixa variabilidade genotípica demonstrada, as cepas apresentaram alta variabilidade fenotípica. Ademais, foi possível determinar a presença de genes codificantes de fatores de virulência, em particular, o gene *Lac*, que ainda não havia sido relacionado à espécie *T. tonsurans*, expõe um novo atributo que pode contribuir na manutenção e patogenicidade desse fungo.

Palavras-chave: *T. tonsurans*. Fenotipagem. Diversidade genética. Fatores de virulência. Sensibilidade antifúngica.

ABSTRACT

Trichophyton tonsurans is a ubiquitous dermatophyte species represented on all continents, being a parasite anthropophilic par excellence, although cases in animals have already been reported. The considerable increase in isolations of *T. tonsurans* has demonstrated global importance, especially related to cases of *Tinea capitis* in the United States, Canada, Japan and Brazil. The aim of this study was to contribute to better understanding of the phenotypic and genotypic aspects of *T. tonsurans*. A total of 25 strains of *T. tonsurans* isolated from cases of *Tinea capitis* in the city of Fortaleza, CE. The phenotyping of the isolates was based on macro and micromorphological characteristics, biochemical and nutritional. The antifungals susceptibility was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) using the drugs ketoconazole (CET), itraconazole (ITR), fluconazole (FLU), voriconazole (VOR) and griseofulvin (GRI). Regarding the molecular aspects, the strains were identified by PCR-RFLP, evaluated through polymorphic molecular markers, RAPD and M13-*fingerprinting* and evaluated to detection of seven virulence genes encoding the enzymes carboxypeptidase-M14, ceramidase, subtilisin-2, laccase, urease, phospholipase and proteinase aspartate (*CarbM14*, *Ceraminidase*, *SUB2*, *Lac*, *URE1*, *Cnap1* and *PBL1*). In the susceptibility test, the strains of *T. tonsurans* studied showed MIC values ≤ 0.03 to $16\mu\text{g}/\text{mL}$ for ITR and CET, ≤ 0.125 to $4\mu\text{g}/\text{mL}$ for VOR, 62.5 to $250\mu\text{g}/\text{mL}$ for FLU and 2 to $16\mu\text{g}/\text{mL}$ for GRI. Molecular analysis of *T. tonsurans* isolates showed low genomic variability, in which the total of 25 samples 18 (72%) showed similar electrophoretic pattern, with fragments of sizes between 61 to 1200pb. All isolates tested were negative in gene amplification *PBL1* and *Cnap1* and positive for the genes *CarbM14*, *Ceraminidase*, *SUB2*, *Lac* and *URE1*. In addition the detection of the gene encoding the enzyme laccase (*Lac*) was determined phenotypically melanin production. Thus, the isolates of *T. tonsurans* analyzed were susceptible *in vitro* to azole derivatives, and griseofulvin, although high levels of MIC have been obtained with fluconazole. Despite the low genotypic variability demonstrated strains showed high phenotypic variability. Moreover, it was possible to determine the presence of genes encoding virulence factors, in particular the *Lac* gene that had not yet been related to *T. tonsurans*, exposes a new attribute that can contribute to the maintenance and pathogenicity of this fungus.

Keywords: *T. tonsurans*. Phenotyping. Genetic diversity. Virulence factors. Antifungal sensitivity.