

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA LISBOA



Tinea capitis – análise em hospital universitário terciário da área de Lisboa
(agosto de 2018 a maio de 2020)

Rita de Cássia Anaya Gutierrez

Orientador: Prof. Dr. João António Augusto Ferreira

Dissertação especialmente elaborada para a obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas Emergentes

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA LISBOA



Tinea capitis – análise em hospital universitário terciário da área de Lisboa no período
de agosto de 2018 a maio de 2020

Rita de Cássia Anaya Gutierrez

Orientador: Prof. Dr. João António Augusto Ferreira

Dissertação especialmente elaborada para a obtenção do grau de Mestre em
Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas Emergentes
Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes (iMM)

A impressão desta dissertação foi aprovada pelo Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 21 de dezembro de 2021.

Agradecimentos

Desejo expressar a mais sincera gratidão.

À Universidade de Lisboa, na pessoa do seu Magnífico Reitor Professor Doutor António Manuel da Cruz Serra.

À Faculdade de Medicina da Universidade Lisboa, em especial à Professora Doutora Emília Valadas, Professor Doutor Thomas Hanschied e Professor Doutor João Melo Cristino, por todo o aprendizado e acolhimento.

Ao Professor Doutor João António Augusto Ferreira, orientador da presente tese, meu agradecimento por partilhar todo conhecimento e amizade – alguns são professores, outros mestres que levaremos para o resto da vida.

Ao Professor Doutor Paulo Leal Filipe por toda ajuda e cordialidade.

Ao Professor Doutor Mário Ramirez, pela orientação em todo o curso.

À minha família, aos meus pais sempre presentes nas etapas mais importantes da minha vida, ao meu marido Randal, por todo o apoio nas horas mais difíceis, ao meu filho Miguel, pela ternura e aprendizado.

Ao meu amigo, Marco Neves, por todos ensinamentos, pela compreensão e amizade.

À minha amiga, Gleice Regina Guerra, pela disposição, presença e amizade.

Resumo

A *tinea capitis* é uma infecção dermatofítica do couro cabeludo, que acomete principalmente crianças entre três e oito anos e tem impacto social relevante. A lesão primária pode evoluir para alopecia cicatricial como seqüela. A presente tese teve com objetivo relatar as espécies de *tinea capitis* prevalentes na região de Lisboa, identificar a faixa etária mais atingida, comparar estatisticamente os resultados entre os principais meios de diagnóstico (exame direto e cultivo micológico), otimizar o diagnóstico definitivo com a associação de exames de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciação de amostras obtidas de colônias de fungos dermatófitos. Foram estudadas 248 amostras clínicas com diagnóstico presuntivo de *tinea capitis* de doentes atendidos no serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria (um hospital universitário terciário), Lisboa, no período entre agosto de 2018 e maio de 2020. Das amostras analisadas, 111 foram positivas, somando-se os resultados dos exames direto e de cultura. Foram identificados dermatófitos no cultivo micológico em 102 amostras: 48 casos de *Microsporium audouinii* (47,06%), 37 de *Trichophyton soudanense* (36,28%), 9 de *Trichophyton tonsurans* (8,82%), 2 de *Trichophyton mentagrophytes* (1,96%), 1 de *Microsporium canis* (0,98%), 3 em que não foi possível diferenciar *Microsporium audouinii* de *Microsporium canis* (2,94%) e 2 em que não foi possível a diferenciação entre *Trichophyton soudanense* e *Trichophyton violaceum* (1,96%). Dos exames positivos, 33% dos doentes eram declarados como pertencentes ao fototipo V ou VI. A identificação de dermatófitos por PCR-sequenciação esteve em concordância significativa com a identificação microscópica das colônias cultivadas.

Palavras-chave: dermatófitos, *Tinea capitis*, *Trichophyton soudanense*, *Microsporium audouinii*, *Trichophyton tonsurans*.

Abstract

Tinea capitis is a dermatophytic infection of the scalp, which mainly affects children aged between three and eight years and has a relevant social impact. The primary lesion may progress to cicatricial alopecia as a sequel. This study aimed at reporting the species of *tinea capitis* in the Lisbon region, describing age and sex of affected patients, comparing statistically the results between the main means of diagnosis (direct examination and mycological cultivation), and optimizing the diagnosis with the association of polymerase chain reaction (PCR) followed by sequencing assays performed on clinical samples and fungal colonies. A total of 248 clinical samples with a presumptive diagnosis of *tinea capitis* were studied, from patients treated at the Dermatology Department of Hospital de Santa Maria (a tertiary, referral and teaching Hospital), Lisboa, between August 2018 and May 2020. A total of 111 tests were considered positive, comprising the results of both direct examinations of clinical samples plus the macroscopic and microscopic examination of fungal cultures. Dermatophytes were identified in the mycological culture in 102 cases: 48 cases of *Microsporium audouinii* (47.04%), 37 of *Trichophyton soudanense* (33.34%), 9 of *Trichophyton tonsurans* (8.82%), 2 of *Trichophyton mentagrophytes* (1.96%), and 1 of *Microsporium canis* (0.98%). In 3 and 2 cases, respectively, it was not possible to differentiate between *Microsporium audouinii* and *Microsporium canis* (2.94%), and between *Trichophyton soudanense* and *Trichophyton violaceum* (1.96%). Of the positive cases, 33% referred to patients declared to belong to phototype V or VI. The identification of dermatophytes by PCR-sequencing were in excellent agreement with their identification based on microscopic examination of fungal colonies.

Keywords: dermatophytes, *Tinea capitis*, *Trichophyton soudanense*, *Microsporium audouinii*, *Trichophyton tonsurans*.

Sumário

1	Introdução	11
2	<i>Tinea capitis</i>	15
2.1	<i>Microsporum audouinii</i>	20
2.2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	21
2.3	<i>Trichophyton tonsurans</i>	22
2.4	<i>Trichophyton soudanense</i> e <i>Trichophyton violaceum</i>	23
2.5	Tratamento	23
3	Material e métodos	28
3.1	Cultivo <i>in vitro</i> e análise da morfologia das colônias	28
3.2	Exame molecular por PCR-sequenciação	28
3.3	Análise estatística.....	30
4	Resultados	32
4.1	Caracterização das amostras clínicas	32
4.2	Caracterização da população-alvo	32
4.3	Resultados dos exames micológicos, direto e de culturas, e sua correlação.....	33
4.4	Correlação entre tipo de parasitismo capilar (<i>ectotrix</i> , <i>endotrix</i>) e identidade do dermatófito (género, espécie) causal.....	36
4.5	Correlação entre fotótipo cutâneo e identidade do dermatófito causal.....	37
4.6	Tecnologia de PCR-sequenciação.....	38
4.6.1	Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de colônias cultivadas em meio sólido.....	38
4.6.2	Quantificação de DNA a partir de colônias cultivadas em meio sólido	41
4.6.3	Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de colônias cultivadas em meio líquido	41
4.6.4	Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de amostras clínicas	42
4.6.5	Outros protocolos de PCR	42
5	Discussão.....	44
6	Conclusão.....	50
	Referências bibliográficas	51
	Anexos.....	56

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

BSA – Albumina sérica bovina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – *Enzyme linked immunosorbent assay*

FA – Fosfatase alcalina

GAFFI – *Global Action Fund for Fungal Infections*

GOT – Transaminase oxalacética

GPT – Transaminase glutâmica- pirúvica

ITS – Internal transcribed spacer

KOH – Hidróxido de potássio

LSU – *Large subunit*

Min – *Minutes*

ng – Nanogramas

pb – Pares de base

PCR – *Polymerase chain reaction*

rDNA – DNA ribossomal

RNA – Ácido ribonucleico

RPB1 – RNA polymerase II subunidade 1

rpm – Rotações por minuto

sec – *Seconds*

SSU – Small subunit

TC – *Tinea capitis*

TRS – Trato respiratório superior

ul – Microlitros

VIH – Vírus da imunodeficiência humana

Lista de figuras

- Figura 1 – Tricoscopia de TC por *T. tonsurans* (A) cabelo em “forma de vírgula” (seta preta); em “ponto de interrogação” (seta azul) e cabelo em “forma de clip” (seta vermelha). (B) cabelo em forma de vírgula em grande quantidade (Schechtman *et al.*, 2015).17
- Figura 2 – (A) Imagem da fluorescência de Calcofluor-White em uma amostra de TC com padrão *ectotrix* com artroconídios. (B) hifa em amostra de *T. corporis* (Motamedi *et al.*, 2019).18
- Figura 3 – Grupo (“cluster”) de genes do rDNA e sítio de hibridação de *primers* universais (ITS1 e ITS4) (adaptado de White *et al.*, 1990).....20
- Figura 4 – *M. audouinii*, A) lesão clínica. B) exame microscópico de uma cultura com 14 dias de incubação elucidando macroconídeos (Donghi, Hauser e Bosshard, 2011). C) microscopia do cultivo de *M. audouinii*; notar a característica presença de clamidosporos terminais ou sub-terminais (Fernandes, 2013).21
- Figura 5 – I) Microscopia *T. mentagrophytes*: (a) hifas septadas e ramificadas; (b) abundantes microconídios esféricos ou semiesféricos; (c) que se assemelham a cachos de uvas; (d) clamidoconídio esférico; (e) hifas espirais; (f) macroconídeos; (g) e corpos nodulares. II) Macroscopia de isolados *T. mentagrophytes* em agar dextrose Sabouraud A, C e D vista anverso e B, E e F vista reverso (Frías-De-León *et al.*, 2020).22
- Figura 6 – *T. tonsurans* A) Cultura TC criança com 12 anos (Nenoff *et al.*, 2014). B) Micélio *T. tonsurans* azul de lactofenol 40 X. Os microconídios são observados nos conidióforos perpendiculares às hifas-mãe, formando cruzamentos em cruz de Lorena (Bonifaz, 2012).23
- Figura 7 – *T. violaceum* A) Colônia com três semanas de cultivo, anverso e reverso. B) Hifas não esporuladas. C) Imagem clínica (Zhan *et al.*, 2018).23
- Figura 8 – Distribuição das amostras analisadas com diagnóstico presuntivo no laboratório de micologia do Hospital de Santa Maria, Lisboa, quanto à localização das lesões clínicas.32
- Figura 9 – Macroscopia de isolados em agar dextrose Sabouraud. (A) *T. soudanense*: anverso com micélio aéreo encarnado. (B) *T. soudanense*: reverso com coloração da colônia marrom-avermelhado. (C) *M. audouinii*: anverso com micélio aéreo escasso. (D) *M. audouinii*: reverso com o centro encarnado. (E) *T. tonsurans*: anverso micélio aéreo com aspeto de camurça. (F) *T. tonsurans*: reverso com coloração da colônia marrom-encarnado. (G) *T. soudanense*: anverso com micélio aéreo aveludado. (H) *T. soudanense*: reverso com coloração da colônia marrom-encarnado.33
- Figura 10 – Diagrama da apresentação dos exames positivos para o exame direto (n=82), positivo para a cultura (n=102) e concordantes entre si (n=73). Fonte: elaboração própria.34
- Figura 11 – Distribuição das amostras cultivadas.34
- Figura 12 – Distribuição dos resultados das culturas de TC de acordo com o fototipo (n=102) sendo 33 pertencentes ao grupo V e VI.38

Figura 13 – Produtos de PCR de isolados clínicos de TC: <i>T. tonsurans</i> (poços: 6, 7 e 11), <i>T. soudanense</i> (poços 5, 8, 10, 13, 14 e 15), <i>M. audouinii</i> (poço 16), controlo positivo - <i>Epidermophyton</i> (poço 17) e controlo negativo – água ultra (18).	39
Figura 14 – Distribuição das amostras de dermatófitos sequenciados.....	39
Figura 15 – A) Distribuição da quantificação de DNA na relação de 260/280. B) Comparação entre positivos e negativos.	41
Figura 16 – Produtos de PCR de isolados em meio líquido de TC: <i>C. globosum</i> (poço 2 e 4) e <i>T. tonsurans</i> (poço 6) respetivamente.	42
Figura 17 – Produtos de PCR de regiões ITS1-ITS2 de isolados clínicos de TC: <i>M. audouinii</i> 2 µl, 4 µl e 6 µl -positivos (poço 2, 3 e 4) e <i>T. soudanense</i> 2 µl -positivo (poço 5), 4 µl e 6 µl negativo (poço 6 e 7), e controlo positivo nos dois últimos poços.	43

Lista de tabelas

Tabela 1 – Tratamento recomendado para TC	24
Tabela 2 – Contingência de casos de TC observados entre os exames direto em amostra clínica e cultura	35
Tabela 3 – Padrão de envolvimento capilar	36
Tabela 4 – Contingência de resultados observados como padrão <i>ectotrix e endotrix</i> no exame direto de amostra clínica e cultura	37
Tabela 5 – Contingência de resultados de exames de cultura e PCR-sequenciação	40
Tabela 6 – Resultado de qui-quadrado e índice Kappa para resultados de cultura e PCR-sequenciação	41

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são um dos reinos mais importantes dos eucariotas. Estima-se que cerca de 600 espécies, dentre 2 milhões de espécies de fungos na Terra, podem causar doença nos humanos. Desde infecções mais leves e superficiais, até mais graves, sistêmicas. Estima-se que mais de um bilhão de pessoas no mundo sejam acometidas com doenças fúngicas graves, além de 1,5 milhões de mortes relacionadas a elas. A Global Action Fund for Fungal Infections (GAFFI) fez um apelo contra a negligência destas doenças, para o diagnóstico precoce, uma vez que, no estágio inicial, são doenças tratadas com mais sucesso. As micoses sistêmicas acometem principalmente pessoas com sistema imune deficiente, pessoas imunocomprometidas, como doentes de vírus da imunodeficiência humana (VIH), oncológicos, transplantados, com doenças autoimunes, traumatizados e sob cuidados intensivos (Kohler, Casadevall, Perfect, 2015).

Os mamíferos são altamente resistentes a infecções fúngicas invasivas, provavelmente porque a endotermia e a homeotermia aumentam a imunidade antifúngica (Bergman e Casadevall, 2010; Robert e Casadevall, 2009). Para um fungo parasitar o ser humano e mamíferos em geral, deve ultrapassar algumas barreiras: crescer em temperaturas elevadas (superior a 37° C); penetrar barreiras constituídas pelos tecidos do hospedeiro; digerir ou absorver componentes de tecidos humanos; e, finalmente, resistir ao sistema imunológico humano (Kohler, Casadevall, Perfect, 2015).

Dentre as infecções fúngicas sistêmicas, destacam-se vários agentes da família *Ajellomycetaceae*, que habitam o solo e evoluíram para parasitar mamíferos. São parasitas intracelulares com mecanismos muito parecidos com o dos protozoários: *Paracoccidioides* em membranas orais e respiratórias, *Blastomyces* em ossos, articulações e pele e *Histoplasma* multissistêmico, que ataca o trato gastrointestinal e suprarrenais, ossos e pele. As infecções dermatológicas por *Histoplasma* se apresentam sobretudo em mulheres jovens, associadas a uma resposta de hipersensibilidade aos antígenos de *Histoplasma capsulatum*, e se manifestam como eritema nodoso e eritema multiforme (Medeiros, 1966). Também são frequentes em doentes com VIH-SIDA, ocorrendo em 10-25% dos doentes com histoplasmose sistêmica (Chang e Rodas, 2012).

A família *Basidiomycota*, representada pelo criptococos, raramente infetava humanos até o século passado, mas o número de casos de criptococose em humanos começou a

umentar, associados principalmente ao VIH (Queiroz *et al.*, 2018; Oliveira, Arantes e Caiuby, 1999). A porta de entrada é inalatória e pode ser representada por duas situações epidemiológicas: criptococose oportunista, que acomete indivíduos imunossuprimidos, normalmente associada a *Cryptococcus neoformans*, e criptococose primária, que acomete indivíduos imunocompetentes, causada por *Cryptococcus gatti* e endêmica em países tropicais. Ambas causam meningoencefalite, com ou sem lesão pulmonar, renal, suprarrenal, e dos ossos e pele (Queiroz *et al.*, 2018; Oliveira, Arantes e Caiuby, 1999). Doentes imunossuprimidos tem uma evolução aguda e muitas vezes letal, mas o diagnóstico precoce reduz a mortalidade. Uma das ferramentas de diagnóstico, além da pesquisa de antígeno (Bennett *et al.*, 2014), seria a broncoscopia rotineira dos doentes VIH (Queiroz *et al.*, 2018; Oliveira, Arantes e Caiuby, 1999). Normalmente, as lesões cutâneas refletem a disseminação da doença, entretanto a forma cutânea primária foi relatada em doentes imunocompetentes e em doentes sob corticoterapia sem VIH (Vandersmissen *et al.*, 1996; Kumar *et al.*, 2005; Xiujiào, Ai'e, 2005).

Outras doenças fúngicas oportunistas que acometem doentes imunossuprimidos são candidíase, fusariose e aspergilose (Talapko *et al.*, 2021; Kohler, Casadevall, Perfect, 2015).

A candidíase, de maior incidência em doentes imunossuprimidos está associada a disfunção do sistema imunitário, inflamação, disbiose de microbiota ou dano na barreira muco-intestinal, conduzindo a candidíase oral, gastroentérica, genital e sistêmica disseminada, atingindo ossos, sistema nervoso, coração, rins, fígado, pulmão e olhos (Talapko *et al.*, 2021).

A aspergilose é causada por *Aspergillus* sp., principalmente *Aspergillus fumigatus*, que corresponde a 50-60%, seguido de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus niger*. Dificilmente ocorre em pessoas imunocompetentes. É introduzido no organismo predominantemente por inalação sendo, em indivíduos saudáveis, eliminado eficazmente pelo sistema imunitário (Gu *et al.*, 2021). Os doentes imunocomprometidos, sejam doentes de VIH, oncológicos ou que recebam imunossuppressores, podem sofrer de formas pulmonares e, ocasionalmente, sistêmicas de aspergilose invasiva, a qual apresenta uma letalidade de 50 a 95% (Gu *et al.*, 2021). Como terapêutica, a anfotericina B e o itraconazol são os mais utilizados, mas têm efeitos adversos hepáticos e renais. Ainda está em estudo o desenvolvimento de vacina para a aspergilose (Gu *et al.*, 2021).

A fusariose pode se manifestar como infecções superficiais (ceratite e onicomicose), invasivas e disseminadas principalmente em doentes imunocomprometidos, levando à sinusite, pneumonia, endoftalmite, fungemia e formas disseminadas (Nucci e Anaissie, 2007). Existem mais de 50 espécies, a mais comum é *Fusarium solani* (50%), seguida de *Fusarium verticillioidis* e *Fusarium moniliforme*, porém nas onicomicoses o mais comum é *Fusarium oxysporum* (Godoy *et al.*, 2004).

Dentre as micoses superficiais, as onicomicoses se destacam sendo uma das mais prevalentes. Além dos dermatófitos, a invasão nas unhas pode ocorrer também por fungos não dermatófitos e leveduras (Moubasher, Abdel-Sater e Soliman, 2017). Os doentes com isolados de leveduras e agentes não dermatófitos devem ser avaliados de acordo com a sintomatologia, a lesão clínica e o número de colônias isoladas (Araújo *et al.*, 2003; López-Jodra e Torres-Rodriguez, 1999). Dentre os não dermatófitos, encontram-se: *Scopulariopsis brevicaulis*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *Aspergillus* sp., *Scytalidium hyalinum* e *Onychocola canadensis*. Entre as leveduras, a mais comum é a *Candida* sp., principalmente nas mãos e em mulheres (Araújo *et al.*, 2003; López-Jodra e Torres-Rodriguez, 1999).

Entre 1994 e 1997, foram relatados, no Hospital San Paolo em Milão, 589 casos de onicomicose, sendo: 68% causados por dermatófitos, 49% *Trichophyton rubrum* (n=290) e 19% *Trichophyton mentagrophytes* var. *interdigitale* (n=113); 32,67% causados por leveduras e fungos não dermatófitos, 24% por *Candida* sp. (n=132) nas mãos e nos pés (n=3), 3,06% por *S. brevicaulis* (n=18) todos nos pés, 1,36% por *A. niger* (n=8) todos nos pés, 1,02% por *Aspergillus* sp. (*fumigatus*, *flavus*, *terreus*) (n=6) nos pés, 2,38% por *F. oxysporum* (n=8) nos pés e nas mãos (n=6), 0,51% por *Acremonium* sp. (n=3) nos pés, 0,17% por *Alternaria alternata* (n=1) nas mãos, e 0,17% por *Curvularia* sp. (n=1) nos pés e mãos (Gianni, Cerri e Crosti, 2000). Em um estudo prospetivo, da mesma maneira, *Candida* sp. e *Candida albicans* foram as leveduras mais encontradas nas unhas de mulher – esses agentes mostraram resistência a antifúngicos comumente utilizados, como itraconazol e fluconazol, porém eram sensíveis a anfotericina B (Sunita, Bichitrananda e Swati, 2021).

Abdelhamid *et al.* (2021) encontraram em seu estudo 51,4% casos de *A. niger*, seguidos de 15,7% de *C. albicans*, 5,7% de *A. flavus*, 2,9% de *A. fumigatus*, 1,4% de *T. rubrum*, 1,4% de *Acremonium*, 1,4% de *Microsporum gypseum* e 15,7 % com isolamento de vários fungos.

Tinea capitis (TC) ocorre com menor incidência que as onicomicoses, sendo mais susceptíveis as crianças, e a maioria está relacionada com dermatófitos. A grande importância do diagnóstico precoce na TC é evitar sequelas, como alopecia permanente (Bennassar e Grimalt, 2010).

2 *TINEA CAPITIS*

A TC é caracterizada pela infecção dermatofítica do couro cabeludo, com ocorrência predominante em crianças entre três e oito anos e na fase pré-púbere, tendo relevante impacto social (Bennassar e Grimalt, 2010; Isa-Isa, Arenas e Isa, 2010). Estão associados diversos dermatófitos, dependendo da demografia, que incluem os zoofílicos, como: *Microsporum canis* – um dos mais descritos na Europa –, *T. mentagrophytes*, *Trichophyton verrucosum* e *Trichophyton benhamiae*. Este último tem como reservatório os roedores e cobaias, foi descrito na região central da Alemanha e suas colônias são facilmente confundidas com o *M. canis* (Uhrlass, Kruger, Nenoff; 2015).

As espécies antropofílicas – como *Microsporum audouinii*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton violaceum* e *Trichophyton soudanense* – têm mostrado crescente registo na Europa. Um estudo epidemiológico realizado por Sacheli *et al.* em 2018, na Bélgica, revelou a predominância de *M. audouinii*, seguido por *T. soudanense* e *T. tonsurans*, em 94% dos doentes provenientes do continente africano. Em outro estudo retrospectivo, entre 2001 e 2018 na Suíça, houve maior prevalência de *T. violaceum* e *T. soudanense* na TC em crianças de origem africana, em confronto com resultados de pesquisas anteriores que apontavam como predominante *T. verrucosum* e *Epidermophyton floccosum* entre 1967 a 1970 (Bontems *et al.*, 2020).

Um levantamento na Áustria, feito entre 1985 a 2008, mostrou que *T. soudanense* só começou a ser registado em 1997, mas mesmo assim com predomínio de isolamento *M. canis* na TC (Binder *et al.*, 2011). O mesmo foi relatado em outro levantamento na Clínica da Universidade de Würzburg na Alemanha, comparando os períodos de 1/1990 a 6/2002 e 7/2002 a 12/2014, demonstrando uma inversão nos dados estatísticos, com aumento de *M. canis*, *M. audouinii*, *M. gypseum*, *T. violaceum*, *T. interdigitale* e *T. soudanense* e um decréscimo de *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *T. verrucosum* (Ziegler *et al.*, 2016). Os dois estudos apontaram a migração de pessoas como o fator responsável pela mudança no perfil de isolamento.

A TC acomete principalmente crianças entre 3 e 7 anos, sendo grávidas e recém-nascidos raramente acometidos. Rothman *et al.* (1947) elucidou com seu trabalho que a quantidade de gordura no couro cabeludo influencia no controlo de TC. Quanto maior a quantidade de lípidos piores as condições para os dermatófitos, o que explicaria a predisposição maior em crianças comparadas a adolescentes, dado que após a puberdade o aumento das

hormonas sexuais induz maior produção de sebo no couro cabeludo (Rothman *et al.*, 1947).

A apresentação clínica e microscópica da tricomicose pode ser dividida em três formas diferentes: *Tinea sensu stricto*, *microsporose sensu stricto* e *Tinea favus*. A apresentação vai depender do tipo de invasão do couro cabeludo/folículos pilosos, e resistência e grau de resposta inflamatória do hospedeiro. Os sinais clínicos irão se manifestar desde cabelos quebradiços com pouca escamação ao Kerion, massa inflamatória grave e dolorosa na maior parte do couro cabeludo, que pode ser confundida com uma infecção bacteriana e, na ausência do tratamento correto, pode evoluir para alopecia cicatricial como sequela (Elewski, 2000). Os sintomas envolvem prurido, e perda parcial de cabelo com grau de inflamação variável (Hay, 2017; Elewski, 2000).

Os dermatófitos, por meio de enzimas queratolíticas lisam a queratina estabelecendo a infecção (Metin, Dilek e Demirseven, 2015). A reação inflamatória é mediada pela ativação de *toll-like receptors* dos queratinócitos, com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, podendo elevar anticorpos, especialmente do tipo IgE, sendo sua intensidade local dependente da idade, estado imunológico do doente, predisposição pessoal e da espécie do dermatófito envolvido (Metin, Dilek e Demirseven, 2015). A TC inflamatória é resultado de uma intensa reação de hipersensibilidade e pode se apresentar clinicamente das seguintes formas: *favus*, Kerion, granuloma de Majocchi dermatofítico e micetoma (Isa-Isa, Arenas e Isa, 2010).

Existe ainda a diferenciação quanto ao envolvimento capilar, podendo este ser classificado de *ectotrix* ou *endotrix*. O primeiro, com artrósporos predominantemente ao redor da haste capilar ao nível mediano, leva à formação de uma bainha contendo hifas e esporos. As hifas crescem em direção ao bolbo do cabelo e estão associados ao envolvimento de tipo *ectotrix* *M. canis*, *M. audouinii* (esporos pequenos), *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum* (esporos grandes). Na sua apresentação clínica estará presente descamação e inflamação, e cabelos quebradiços de 2 a 3 mm do couro cabeludo, além da fluorescência sob a luz ultravioleta filtrada (Hay, 2017).

Já o *endotrix* envolve a o interior da haste folicular, com quebra destas últimas ao nível da sua emergência à superfície do couro cabeludo, constituindo as hastes quebradas e dilatadas padrão de agrupamento de múltiplos pontos negros (“*black dot tinea capitis*”). Este tipo não apresenta fluorescência sob a luz ultravioleta filtrada e está associado

normalmente a espécies antropofílicas: *T. soudanense*, *T. tonsurans* e *T. violaceum* (Hay, 2017).

Na forma fávica (*favus*), os cabelos são menos danificados e chegam a crescer a um tamanho considerável. A presença de ar nas hastes de cabelo é uma característica específica. Por fim, as hifas formam um aglomerado na base dos cabelos, encontrando-se o padrão fávico associados a *Trichophyton schoenleinii*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (Tavares-Bello *et al.*, 2021; Hay, 2017; Shiraki *et al.*, 2006).

O diagnóstico definitivo engloba o exame clínico e exames auxiliares, nomeadamente a dermatoscopia, a avaliação com lâmpada de Wood, e os exames micológicos. A dermatoscopia do couro cabeludo, a tricoscopia, permite uma avaliação inicial e pode ser uma aliada juntamente com a lâmpada ultravioleta, na indisponibilidade do diagnóstico micológico (Mayser *et al.*, 2020). A estrutura capilar com afinamento do córtex e com a cutícula íntegra estão associadas a TC *endotrix*. Os cabelos em forma de vírgula (Figura 1) são típicos de *M. canis*, porém este aspeto não deve ser utilizado isoladamente, e algumas lesões como pontos pretos vistos nas TC por *endotrix* (*T. tonsurans*, *T. violaceum*, *T. soudanense*) também estão presentes em doentes com alopecia areata e tricotilomania (Brasileiro, 2016; Schechtman, 2015).

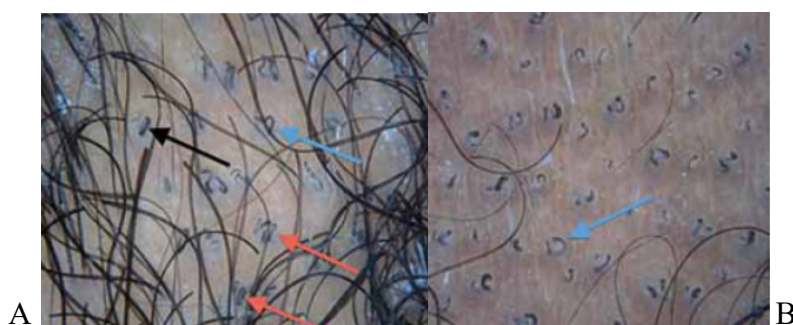


Figura 1 – Tricoscopia de TC por *T. tonsurans* (A) cabelo em “forma de vírgula” (seta preta); em “ponto de interrogação” (seta azul) e cabelo em “forma de clip” (seta vermelha). (B) cabelo em forma de vírgula em grande quantidade (Schechtman *et al.*, 2015).

A microscopia da amostra clínica preparada com solução de hidróxido de potássio (KOH) 10-20% incubada por 10 a 20 minutos, permite a identificação de hifas e esporos, e embora não permita identificar a espécie envolvida permite classificar o tipo de envolvimento pilar, *ectotrix* ou *endotrix* (Mayser *et al.*, 2020; Hay, 2017). O exame de microscopia de amostra clínica, exame direto, com KOH pode ser associado a coloração fluorescente, como Calcofluor-white ou Blankophor, que se ligam à quitina do fungo,

tornando-se visíveis quando expostos à luz ultravioleta (Mayser *et al.*, 2020; Hamer, Moore, Dennig, 2006).

A adição dos corantes, além de ser um teste de custo baixo, aumenta a sensibilidade e especificidade. Num estudo foram comparados o uso de Blankophor, Calcofluor e combinação destes com KOH, revelando com Blankophor, sensibilidade de 100% e especificidade de 86%; com a combinação de Blankophor e KOH, 90% e 88%; com Calcofluor 80% e 84%; e com Calcofluor e KOH, 83% e 84%, respectivamente (Hamer, Moore, Dennig, 2006). Motamedi *et al.* (2019) compararam a cultura micológica, Calcofluor-white, e PCR¹ *real-time*, e o método de diagnóstico Calcofluor-white se mostrou superior em relação aos outros dois métodos de diagnóstico com uma sensibilidade de 98,9% e especificidade de 99,1%, relativamente à cultura micológica, 70,5% e 100%, e o PCR *real-time*, 94,7% e 95,7%, respectivamente.

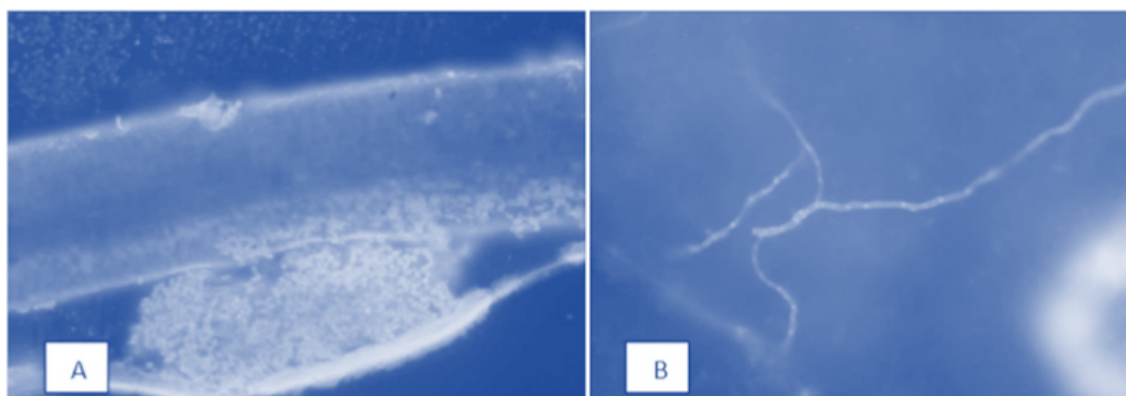


Figura 2 – (A) Imagem da fluorescência de Calcofluor-White em uma amostra de TC com padrão *ectotrix* com artroconídios. (B) hifa em amostra de *T. corporis* (Motamedi *et al.*, 2019).

A cultura com agar-Sabouraud-dextrose (2% ou 4%), Kimming agar, meios de agar associados com antibióticos (cloranfenicol, cicloheximida, gentamicina) tem a função de suprimir o crescimento de bactérias contaminantes (Mayser *et al.*, 2020; Robert e Pihet, 2008). Os cotos de cabelo e crostas podem ser semeados em placa de Petri e devem ser mantidos na incubadora à temperatura de 26-27°C por 3 a 4 semanas, com análise semanal para identificação de colónias e, posteriormente, identificação por microscopia (Mayser *et al.*, 2020; Robert e Pihet, 2008).

A metodologia molecular PCR e subsequente identificação por sequenciação (PCR-sequenciação), por PCR-ELISA ou PCR *real-time*, são alternativas altamente sensíveis e

¹ *Polimerase chain reaction*, ou reação em cadeia da polimerase.

específicas para um diagnóstico rápido e preciso, podendo ser realizadas a partir tanto das colônias como diretamente de material clínico (Mayser *et al.*, 2020; Hay, 2017; Wiegand, 2017; Motamedi *et al.*, 2017). Há também relatos do uso de espectrometria de massa MALDI_TOF. Além da sensibilidade e especificidade, outro ponto relevante é a rapidez com que se obtém o diagnóstico: de 24 a 48 horas *versus* 3 a 4 semanas com a cultura (Mayser *et al.*, 2020; Brillowska-Dabrowska, Saunte e Arendrup, 2007). Motamedi *et al.* (2017) analisaram 499 amostras com suspeita de dermatofitose e compararam o PCR *real-time* à microscopia e cultura, demonstrando a superioridade do PCR *real-time*, com sensibilidade e especificidade de 87,5% e 85% respectivamente. Porém, em 853 amostras com suspeita de dermatofitose em que se comparou o PCR *real-time* e exame de microscopia direta de amostras clínicas, predominantemente de pele e unhas, com raras amostras de cabelo (somente 11 eram suspeita de TC e, destas, somente 2 foram positivas), a sensibilidade diminuiu para 75% mantendo-se a especificidade em torno de 85% nos casos de suspeita de TC (Motamedi *et al.*, 2017).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação de segmentos de DNA a partir de uma molécula do DNA alvo, sendo uma reação em cadeia, pois o DNA sintetizado no primeiro ciclo torna-se molde para a síntese de novas cadeias nos ciclos seguintes. A cada ciclo, o número de fragmentos é duplicado e, no final de 30 ciclos, tem-se mais de um bilhão de moléculas amplificadas (p. ex., Rodrigues *et al.*, 2006). Para isso ocorrer, são necessárias três etapas em cada ciclo: desnaturação, que ocorre a 95°C; hibridação dos *primers* (“*annealing*”), em que a temperatura do termociclador fica entre 40 a 70°C; e extensão, geralmente aos 72°C, num total de 25 a 30 ciclos (p. ex., Rodrigues *et al.*, 2006).

O DNA ribossomal (rDNA) nuclear está presente em todos os organismos vivos e está associado à manutenção da célula, na tradução do RNA em proteínas. Amplificação e sequenciação direta do rDNA foi uma das primeiras técnicas descritas para o PCR na micologia (White *et al.*, 1990). Os genes codificantes para rRNAs 18S, 5,8S e 28S dos ribossomos estão separados no rDNA por duas regiões espaçadoras, que são os *internal transcribed spacers* (ITS1, ITS2). Os genes rDNA possuem regiões mais conservadas como a subunidade 18S, utilizada para comparação de gêneros distantes, e mais variáveis 28S, usadas para a distinção de espécies, e de grande importância na identificação de dermatófitos (White *et al.*, 1990). Segundo Lemsaddek (2008), os ITS, localizados entre subunidades 18S do DNA ribossomal (rDNA) e o gene 5,8S (ITS1), e entre este último e a subunidade 28S do rDNA (ITS2) (Figura 3), são utilizados para a amplificação de

dermatófitos; ITS1-5,8S-ITS2 rDNA como iniciadores (*primers*), entre eles ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') são relativamente curtos (500 a 800pb) (Ramaraj, 2016; Ahmadi *et al.*, 2015; White *et al.*, 1990).

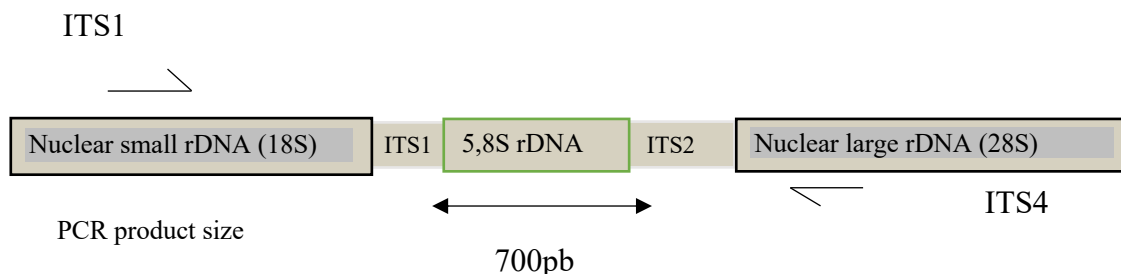


Figura 3 – Grupo (“cluster”) de genes do rDNA e sítio de hibridação de *primers* universais (ITS1 e ITS4) (adaptado de White *et al.*, 1990).

É importante a identificação da espécie causadora da TC em doentes para o direcionamento do tratamento. Como antes referido, são usadas desde técnicas mais simples e acessíveis, como o exame de amostra clínica com KOH, que estabelece a presença de infecção fúngica e o padrão de envolvimento capilar, ao exame macroscópico e microscópico de culturas, que permite a identificação do agente etiológico na maioria dos casos, até às técnicas moleculares. Estas últimas são frequentemente usadas para certificação de diagnósticos que persistem como duvidosos usando as técnicas clássicas (exame direto, culturas). O diagnóstico da espécie garante melhor escolha da terapêutica e melhor estimativa de prognóstico.

Os subitens que se seguem detalham características das principais espécies causadoras de TC.

2.1 *Microsporium audouinii*

M. audouinii, dermatófito antropofílico (Figura 4), é altamente contagioso e considerado, até 1950, a doença dos orfanatos. Por muito tempo não foi encontrado mais na Europa, muito provavelmente devido ao uso da griseofulvina. Com a imigração recente de africanos, houve uma recrudescência desse patógeno na Europa, sendo a espécie predominante identificada na Bélgica, Portugal e com aumento de casos relatados na Alemanha (Sacheli *et al.*, 2020; Bontems *et al.*, 2020; Pérez-Tanoira, 2017; Ziegler *et al.*, 2016). O seu padrão de invasão é *ectotrix* e *endotrix-ectotrix*, os esporos circundam a

haste capilar que, por sua vez, perde a elasticidade e se torna frágil. Emite fluorescência esverdeada ao exame da lâmpada de Wood (Fuller *et al.*, 2014; Seeliger e Heymer, 1981 citado por Nenoff, 2014).

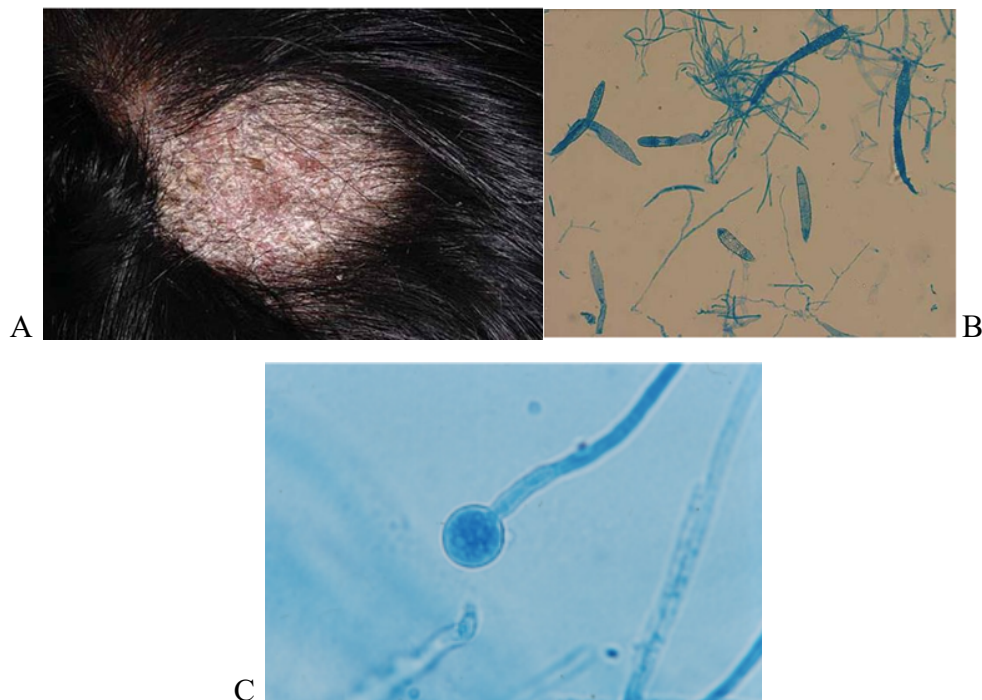


Figura 4 – *M. audouinii*, A) lesão clínica. B) exame microscópico de uma cultura com 14 dias de incubação elucidando macroconídeos (Donghi, Hauser e Bosshard, 2011). C) microscopia do cultivo de *M. audouinii*; notar a característica presença de clamidosporos terminais ou sub-terminais (Fernandes, 2013).

2.2 *Trichophyton mentagrophytes*

Atualmente, o complexo *T. mentagrophytes* corresponde a cinco espécies: *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale*, *Trichophyton erinacei*, *Trichophyton quinckeanum* e *Trichophyton benhamie*, morfologicamente semelhantes, porém, com suscetibilidade diferente aos antifúngicos (Frías-De-Léon *et al.*, 2020).

É o agente mais comum de micose superficiais em muitas espécies animais (cobaias, hamsters, coelhos, chinchilas), é antropofílico, zoofílico e geofílico, dependendo da espécie. Os mais comuns são *T. interdigitale*, que é antropofílico, possui micélio aéreo de dispersão com numerosos conídeos; e *T. mentagrophytes*, zoofílico, que origina colônias pulverulentas. Muito comuns em crianças de 3 a 7 anos e mulheres, muito provavelmente pelo contacto íntimo com animais de estimação (Shiraki *et al.*, 2006). Nos humanos podem se manifestar como *Tinea corporis*, *Tinea ungueum* e TC nomeadamente na sua variante favosa (ou fávica; *T. mentagrophytes var. quinckeanum*) (Tavares-Bello *et al.*, 2021; Shiraki *et al.*, 2006).

A colônia do *T. mentagrophytes* (Figura 5) é tipicamente granulosa e amarelada no anverso e de cor castanha no reverso. No exame microscópico detetam-se microconídeos arredondados em forma de cachos de uva, e macroconídeos, por vezes com formato de charuto, conectados com hifas transversais. As hifas podem-se apresentar septadas e/ou em espiral (Frías-De-León *et al.*, 2020). O padrão de envolvimento capilar é *ectotrix* (Fuller *et al.*, 2014).

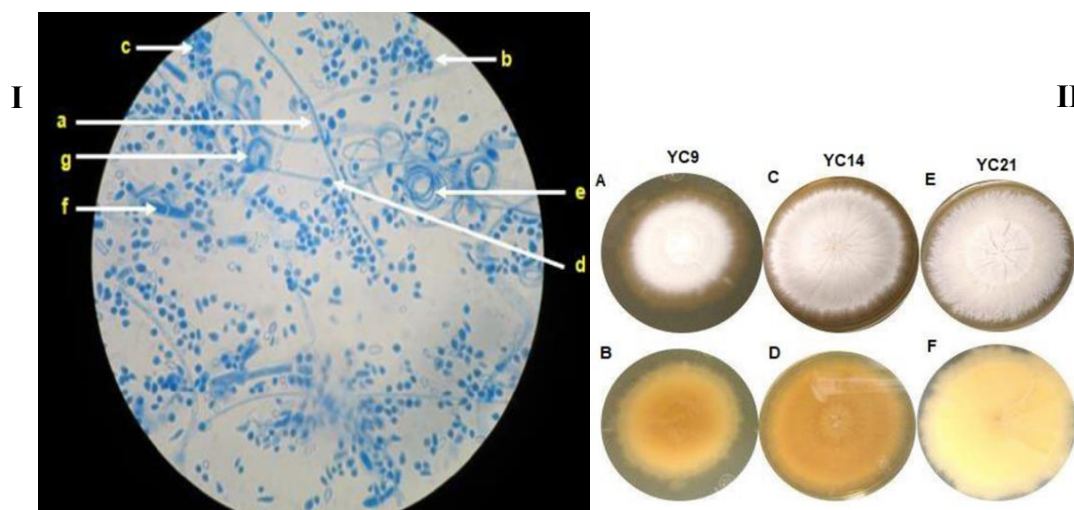


Figura 5 – I) Microscopia *T. mentagrophytes*: (a) hifas septadas e ramificadas; (b) abundantes microconídios esféricos ou semiesféricos; (c) que se assemelham a cachos de uvas; (d) clamidoconídeo esférico; (e) hifas espirais; (f) macroconídeos; (g) e corpos nodulares. II) Macroscopia de isolados *T. mentagrophytes* em agar dextrose Sabouraud A, C e D vista anverso e B, E e F vista reverso (Frías-De-León *et al.*, 2020).

2.3 *Trichophyton tonsurans*

É um dermatófito antropofílico, um dos mais comuns na TC. Suas colônias têm crescimento restrito, textura aveludada de cor bege a castanha, e no reverso apresenta um pigmento marrom-escuro. As características das colônias são, contudo, muito variáveis. Já na microscopia, apresenta hifas ramificadas, hialinas com presença de clamidoconídios alternada com microconídios, formando pequenos conidióforos perpendiculares à hifa mãe, com padrão de envolvimento capilar *endotrix*. Os macroconídeos são irregulares, com paredes espessas (Fuller *et al.*, 2014; Bonifaz, 2012).

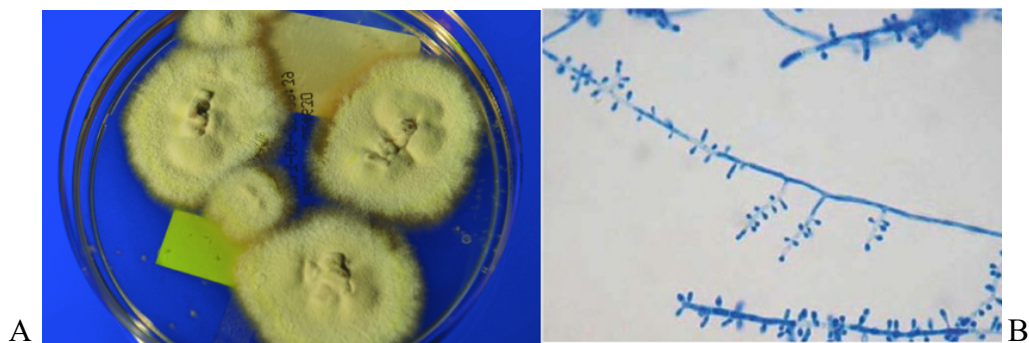


Figura 6 – *T. tonsurans* A) Cultura TC criança com 12 anos (Nenoff *et al.*, 2014). B) Micélio *T. tonsurans* azul de lactofenol 40 X. Os microconídios são observados nos conidióforos perpendiculares às hifas-mãe, formando cruzamentos em cruz de Lorena (Bonifaz, 2012).

2.4 *Trichophyton soudanense* e *Trichophyton violaceum*

Causadores da TC antropofílica, predominantemente na África e Ásia, estão intimamente relacionados, situados no mesmo *cluster* do complexo *T. rubrum* (Graser *et al.*, 2000). As colônias são de crescimento lento. *T. soudanense* apresenta coloração laranja-amarelada ou amarelada, já *T. violaceum* apresenta micélio vermelho púrpura ou branco, com reverso amarelo escuro, marrom-avermelhado a roxo-violeta (Figura 7), com microconídios em forma de lágrima e hifas distorcidas. Ramificações com apresentação reflexiva estão associadas a *T. soudanense*. As apresentações clínicas desta classe de dermatófitos são idênticas, com ponto preto na dermatoscopia e com atingimento capilar de tipo *endotrix* (Fuller *et al.*, 2014; Ninet *et al.*, 2003; Graser *et al.*, 2000).



Figura 7 – *T. violaceum* A) Colônia com três semanas de cultivo, anverso e reverso. B) Hifas não esporuladas. C) Imagem clínica (Zhan *et al.*, 2018).

2.5 Tratamento

O tratamento da TC requer um complemento oral, pois a terapia tópica apesar de inicialmente apresentar melhoras no prurido tem altos índices de recidivas. O uso de terbinafina, itraconazol, fluconazol e griseofulvina está descrito no último *guideline* de TC e esquematizada na Tabela 1 (Mayser *et al.*, 2020). A griseofulvina foi a primeira a

ser usada, porém em muitos países não existe a apresentação pediátrica e as doses diárias irão depender da espécie envolvida, sendo mais resistentes *T. tonsurans* e *T. schoenleinii*, que podem requerer ciclos mais longos e doses mais altas (Hay, 2017).

Tabela 1 – Tratamento recomendado para TC

Droga (1)	Dose (1)	Disponibilidade em Portugal/apresentação (2)	Monitorização (2)	Duração do tratamento para <i>Trichophyton spp.</i> (1)	Duração do tratamento para <i>Microsporum/Nannizzia spp.</i> (1)
Itraconazol	5 mg/kg uma vez ao dia, com a principal refeição; suspensão (jejum, sem ingestão de alimentos por 1h) ou Para indivíduos < 20 kg, 50 mg/dia Para indivíduos > 20 kg, 100 mg/dia	Disponível solução (10 mg/ml); cápsulas (100mg)		4 semanas	6 semanas
Fluconazol	6 mg/kg/dia	Disponível cápsula (100, 150 e 200 mg); solução oral (40mg/ml)	GOT/ GPT e FA		
Terbinafina	Para indivíduos < 20 kg, 62,5 mg/dia Para indivíduos 21-40 kg: 125 mg Para indivíduos > 40 kg: 250 mg/dia	Disponível comprimido (250mg)	ALT, AST, hemograma	4 semanas	8-12 semanas
Griseofulvina	20 mg/kg SID ou BID com a principal refeição do dia	Indisponível	ALT, AST, hemograma	6-8 semanas	8-12 semanas

Fonte: adaptado de (1) Mayser *et al.*, 2020; (2) Infarmed.

Legenda: alanina aminotransferase (ALT); aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA), transaminase oxalacética (GOT), transaminase glutâmica- pirúvica (GPT).

O itraconazol e a terbinafina podem ser alternativas para o tratamento nas espécies *Trichophyton*, embora ainda haja poucos dados em relação ao tempo de tratamento. Além disso, a terbinafina não é totalmente eficaz para *Microsporum*, podendo ser administrada nestes casos em doses mais elevadas. Outra questão ainda por ser totalmente esclarecida é o tempo de tratamento no caso do itraconazol e fluconazol, normalmente de 4 a 6 semanas (Hay, 2017).

Bar *et al.* (2019) realizaram um estudo retrospectivo com 304 doentes pediátricos com TC por *M. audouinii*, *T. violaceum* e *T. soudanense*, e compararam o tratamento com griseofulvina por 8 semanas, griseofulvina por 12 semanas e terbinafina por 4 semanas.

Concluíram que a griseofulvina por 12 semanas foi o tratamento mais eficaz, principalmente nos casos que envolviam *M. audouinii* e *T. soudanense*, porém não houve diferença significativa entre o tratamento com griseofulvina com 12 ou 8 semanas de tratamento.

Dado que a griseofulvina não está disponível na forma pediátrica em alguns países, e havendo estudos que apontam para a eficácia do fluconazol ser semelhante à da griseofulvina, fluconazol poderá constituir terapia alternativa (Dastghaib, Azizzadeh e Jafari, 2005). O fluconazol também foi testado em crianças em um estudo multicêntrico com administração por via oral uma vez por semana, em TC causada por *T. violaceum*, *T. tonsurans*, e *M. canis* e foram obtidas cura clínica e micológica com tratamento por 8 semanas; no caso específico de *M. canis*, alguns doentes tiveram mais 4 semanas de terapia para obter a cura e, na maioria do doentes, não foram observados efeitos adversos importantes – os casos que ocorreram foram, na maioria, distúrbios gastrointestinais e somente um dos doentes teve elevação das enzimas hepáticas mas sem sintomatologia –, de modo que nenhum doente teve que descontinuar o tratamento (Gupta *et al.*, 2000).

Outro estudo apontou a terbinafina com resultados superiores à griseofulvina para o tratamento de TC causada por *T. tonsurans*, porém, o inverso ocorreu para o tratamento de TC por *M. canis*, revelando-se neste caso a superioridade da griseofulvina (Elewski *et al.*, 2008).

Outra alternativa para o tratamento de TC causada por *M. canis* é o itraconazol (5mg/kg, uma vez ao dia). Binder *et al.* (2009) obtiveram a cura clínica e micológica em crianças entre 3 a 26 semanas de idade com tratamento por 3 a 6 semanas.

Donghi, Hauser e Bossohard (2011) investigaram 3 casos clínicos de TC por *M. audouinii* que não apresentaram melhoras com terbinafina e fluconazol, com remissão da doença após a substituição por griseofulvina. O que chamou a atenção foi o facto de as crianças serem da mesma escola, procedendo-se então à triagem dos contactantes dos 3 doentes, com colheita de amostras com auxílio da escova de dentes e posterior cultura em agar Sabouraud. Em um dos casos, o pai, a mãe e a irmã do doente eram portadores assintomáticos e, na escola, dentre 95 colegas, 5 foram diagnosticados positivos assintomáticos: 3 das crianças eram imigrantes da África, um era imigrante de Tamil e um suíço. Quatro dessas crianças tinham contacto com o paciente. Todos os indivíduos assintomáticos foram tratados com cetoconazol tópico (*shampoo*). Isso pode demonstrar

a importância de, em casos de difícil resolução, testar assintomáticos, nomeadamente membros da família, independentemente da idade. Ilkit e Demirhindi (2008) destacaram a importância de identificar portadores assintomáticos, principalmente na idade escolar e familiares de doentes em tratamento, e correlacionaram *T. tonsurans* e *T. violaceum* com as maiores taxas de portadores assintomáticos.

Além do tratamento por via oral, o Kerion necessita a remoção das crostas com auxílio de compressas húmidas, e as infeções bacterianas secundárias devem ser levadas em consideração (Hay, 2017). Na forma inflamatória, deve-se considerar o uso de corticosteróides em reações mais exacerbadas ou generalizadas (Hay, 2017). Ainda o uso de *shampoo* à base de cetoconazol, de 2 a 3 vezes por semana, pode ser associado ao tratamento oral. Nos doentes que tiverem infeções zoonóticas, seus animais de companhia devem ser tratados (Mayser *et al.*, 2020).

A monitorização da resposta à terapêutica deve se iniciar após 4 semanas de tratamento. Além da remissão dos sinais clínicos, deve-se repetir exames através de microscopia da amostra clínica preparada com KOH e novas culturas, e espera-se o resultado negativo para suspender o tratamento, com reavaliação após o término do tratamento (Mayser *et al.*, 2020; Binder *et al.*, 2009; Gupta *et al.*, 2000).

Exames laboratoriais, principalmente os associados à função hepática (como AST, ALT, GGT), devem ser monitorizados antes do início do tratamento e após 2-4 semanas da instituição do tratamento, devido à hepatotoxicidade do tratamento para TC (Mayser *et al.*, 2020).

Os antifúngicos, no geral, podem levar a efeitos adversos gastrointestinais, como náuseas, vômitos e dor abdominal, porém, na maioria dos casos, não há necessidade de descontinuação do tratamento, somente em casos de efeitos mais graves (Binder *et al.*, 2009; Dastghaib, Azizzadeh e Jafari, 2005, Gupta *et al.*, 2000). Para a griseofulvina e terbinafina, apesar de raros, os efeitos secundários podem corresponder a aumentos das enzimas hepáticas, anemia e/ou hiperlipemia (Stolmeier *et al.*, 2018). A terbinafina pode levar também à eosinofilia e/ou erupção cutânea (Haroon *et al.*, 1995). Já a griseofulvina pode também elevar o ácido úrico, e provocar leucocitose e granulocitopenia (Haroon *et al.*, 1995), além de infeção na pele (Memisoglu *et al.*, 1999). Outro ponto importante da griseofulvina é que, para aumentar sua absorção, há a necessidade de ser administrada com alimentos, de preferência com elevada taxa de lípidos (Mayser *et al.*, 2020).

A grande questão no tratamento de crianças é evitar a alopecia cicatricial como sequela da doença, o que ocorre no tratamento tardio ou se a cura da doença é incompleta, quando não há monitorização da cura ou dos portadores assintomáticos que convivem com os doentes e que servem de fonte de reinfeção. Por outro lado, deve-se evitar os efeitos secundários indesejáveis dos antifúngicos.

O diagnóstico rápido é a melhor ferramenta para o sucesso do tratamento, além de se evitar tratamentos desnecessários enquanto se aguarda os resultados da cultura. Além disso, reconhecer especificamente a espécie do dermatófito envolvido direciona melhor o tratamento. Portanto, o avanço nas técnicas moleculares parece ser um bom caminho para agilizar e direcionar o tratamento mais adequado para cada doente.

Este trabalho tem como objetivo reconhecer as espécies mais comuns na região de Lisboa como causadoras de TC, e colocar o PCR como uma ferramenta de diagnóstico na TC, em particular nos casos em que o diagnóstico com as técnicas clássicas foi inconclusivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo epidemiológico retrospectivo de TC no Laboratório da Micologia da Clínica Dermatológica Universitária de Lisboa/ Serviço de Dermatologia do Hospital de Santa Maria Lisboa, compreendendo o período entre agosto de 2018 e maio de 2020. De 1.092 amostras de diagnóstico presuntivo de dermatomicose coletadas no Serviço de Dermatologia, foram selecionadas 248 amostras suspeitas de TC.

As amostras foram submetidas aos exames de diagnóstico micológico: exame de microscopia direta de amostra clínica, exame direto, com KOH 10% (em suspeitas de TC), 20% ou 40% consoante o tipo de amostra, cultura micológica em Sabouraud-dextrose-agar com adição de cloranfenicol (50 mg/L) +/- cicloheximida (50 mg/L), complementados em casos selecionados com análise molecular da amostra clínica ou da colônia obtida no isolamento micológico. O exame microscópico das colônias foi efetuado após coloração com azul de lactofenol. A técnica molecular utilizada foi a de *polymerase chain reaction* (PCR)-sequenciação. Foi estabelecida, sempre que possível, a correlação entre resultados de diagnóstico micológico com o fototipo, idade e sexo. Os fotótipos foram classificados de acordo com a classificação de Fitzpatrick.

3.1 Cultivo *in vitro* e análise da morfologia das colônias

Para as amostras suspeitas de TC o exame microscópico direto e o exame microscópico de culturas foram efetuados segundo os protocolos de rotina no laboratório de micologia, como discriminado acima.

3.2 Exame molecular por PCR-sequenciação

Para a realização dos exames moleculares nas amostras diretas e colônias obtidas nos isolamentos, foi realizada a extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Brillowska-Dabrowska, Saunte e Arendrup, 2007), amplificação com *primers* universais (ITS1 e ITS4) quantificação do DNA em espectrofotómetro de microvolume (NanoDrop). As amostras positivas para o PCR foram sujeitas a sequenciação genética, sendo as sequências obtidas comparadas com o banco de sequências da empresa STAB VIDA, Lda.

Os protocolos para a extração e ampliação do DNA foram otimizados tanto em culturas sólidas como líquidas.

Para amostras diretas: as amostras clínicas foram fragmentadas com um bisturi, e adicionado 100 µl de tampão de extração (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM Tris-Cl, pH 9,5). Posteriormente foram incubadas a 95 °C por 10 minutos em bloco térmico. Ao término da incubação, adicionou-se 100 µl de tampão anti-inibição (2% albumina sérica bovina, BSA), o que será discutido no capítulo 4. As amostras foram homogenizadas com *vortex* durante 15 sec e centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 min. Por fim, o sobrenadante foi recolhido para novo tubo.

Para as amostras a partir de colônia: foi removido um fragmento de ~20x20x20 mm da colônia, retirando-se o máximo de agarose e transferido para um microtubo de 1,5 ml, adicionado 1 ml de água bidestilada, seguido de homogeneização com *vortex* e incubação em bloco térmico a 95 °C durante 10 minutos, centrifugação a 14.000 rpm durante 1 min, sendo então o sobrenadante desprezado. Ao *pellet* (botão) foi adicionado 1 ml de água destilada, seguindo-se homogeneização em *vortex* durante 15 sec, seguindo-se duas incubações de 5 minutos cada em bloco térmico a 95 °C durante 5 min, e nova homogeneização com *vortex*. Após centrifugação a 14.000 rpm durante 1 min e remoção do sobrenadante seguiu-se incubação a -20 °C durante 4 min, sendo o microtubo colocado subsequentemente à temperatura ambiente durante 3 min.

Foram então adicionados 100 µl de tampão de extração (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM Tris-Cl, pH 9,5), com incubação da amostra 10 min a 95 °C em bloco térmico. Seguiu-se adição de 100 µl de tampão anti-inibição (2% BSA), homogeneização com *vortex* e centrifugação (14.000 rpm, 2 min). O sobrenadante foi então recolhido para novo tubo.

Para colônias em meio líquido: as amostras foram cultivadas em 2 ml de meio de Sabouraud líquido com cloranfenicol 0,05% e incubadas a 27 °C por 8 dias.

Após a incubação, os *pellets* foram ressuspensos em 500 µl de tampão de lise (400 mM Tris HCl pH 8; 60 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl) à temperatura ambiente por 10 min, suplementados com 150 µl acetato de potássio a 3M, (pH 4,8) e centrifugados a 12.000 rpm 1 min. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo com volume igual de álcool isopropílico e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado,

sendo o *pellet* de DNA lavado com 500 µl de álcool a 70% e dissolvido em 50 µl de tampão TE (10 mM Tris Hcl, 1 mM EDTA).

Para ampliação: a solução de DNA foi homogeneizada e quantificada em espectrofotómetro (NanoDrop 2000) e diluída para a concentração de 50-100 ng/µl. Posteriormente foi adicionada a mistura (*mix*) para PCR (19 µl água ultrapura, 25 µl Sigma ReadyMix Taq PCR Reaction Mix com MgCl₂, 2 µl de *primer* ITS 1, 2 µl de *primer* ITS 4, e 2 µl de DNA molde/*template*).

Em termociclador foram executados 34 ciclos de amplificação (desnaturação 95 °C, 1 min; hibridação de *primers* 55 °C, 1 min; extensão 72 °C, 1 min), extensão final 72 °C, 10 min, seguindo-se incubação a 4 °C até recolha da amostra.

A eletroforese em gel de agarose foi processada em TBE, sendo cada poço preenchido com 2 µl dos produtos de reação de PCR de cada amostra, ou com controlos (positivo e negativo), diluídos em 8 µl de H₂O ultrapura e adicionados de 2 µl de tampão de amostra (*loading buffer*). Como marcador foi usado 2 µl de marcador de tamanho molecular **GRS® 100 bp** em 3 µl de H₂O, adicionado de 2 µl de tampão de amostra. A eletroforese decorreu a 100V durante aproximadamente 30 minutos. A visualização e documentação dos resultados foi feita através de transiluminador (Bio-Rad GelDoc).

3.3 Análise estatística

Foi utilizada estatística descritiva para avaliação de idade, sexo, fototipo, diagnósticos para os exames de amostra clínica direta, por cultura e por PCR.

Foi aplicada a análise de estatística inferencial, por meio do teste de qui-quadrado, para avaliar se os exames eram concordantes entre si, e o índice Kappa (K)² para verificar se os critérios adotados entre os avaliadores eram tão precisos como se os diagnósticos de ambos fossem idênticos, com um mesmo critério de avaliação. Foram verificados, com o *software* IBM SPSS Statistics 23:

- os resultados de exame de amostra direta e de amostra de cultura para diagnóstico de TC;

² Esse indicador varia entre 0 e 1, sendo o valor máximo obtido apenas no caso em que todos os avaliadores classificam ou avaliam da mesma forma um atributo.

- os resultados quanto ao compromisso capilar (*ectotrix* ou *endotrix*) obtidos no exame de amostra clínica e o exame de culturas;
- os resultados obtidos nos exames de cultura e de PCR-sequenciação de TC.

Foi considerada como referência para tomada de decisão o p-valor, com 5% de significância. O p-valor é a probabilidade de obter resultados pelo menos tão extremos quanto os resultados efetivamente observados, sob a premissa de a hipótese nula ser correta.

Para verificar se havia uma distribuição normal na quantificação do ácido nucleico (NanoDrop), foi utilizado o teste Shapiro-Wilk, que não confirmou a normalidade estatística da amostra. Dessa forma, o teste de Mann-Whitney foi usado para verificar a similaridade entre os grupos com resultado positivo e negativo no PCR para TC. Foi aqui usado o *software* JMP.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização das amostras clínicas

Os resultados obtidos de 8 de agosto de 2018 a 11 de maio de 2020 envolveram 1.092 amostras coletadas na Clínica Dermatológica do Hospital de Santa Maria, Lisboa, das quais havia suspeita clínica de TC em 248 amostras, de *T. corporis* em 425, de onicomicose em 353, de escabiose em 36, de pitíriase versicolor em 12, de granuloma de Majocchi em 1 e 17 as amostras que não continham informações quanto à localização anatômica (Figura 8).

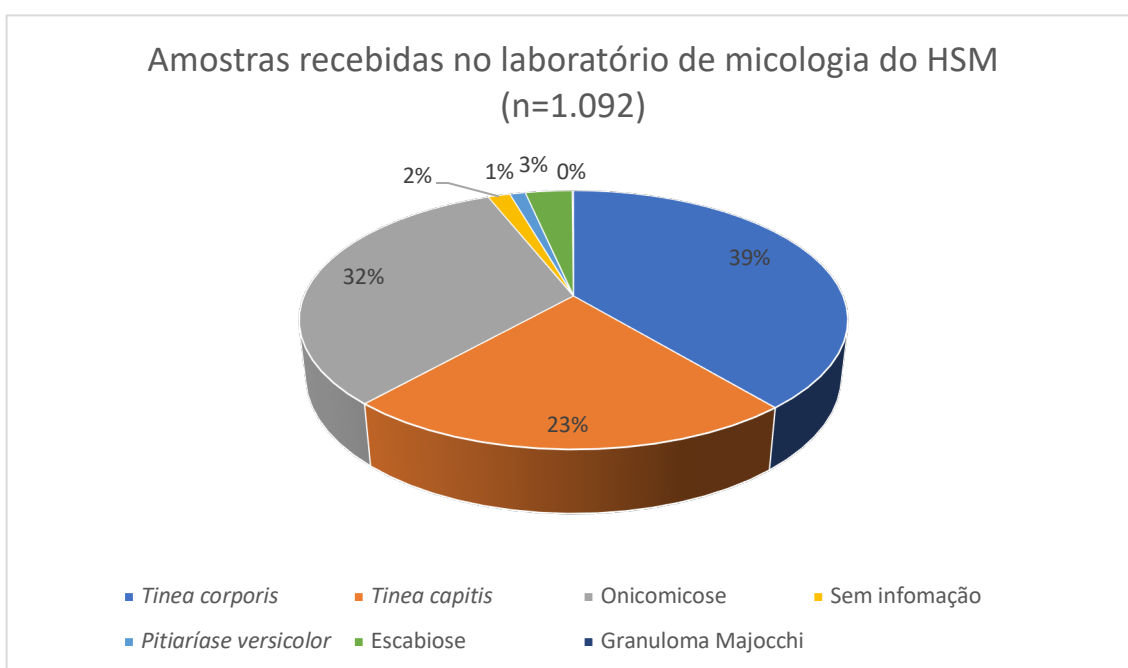


Figura 8 – Distribuição das amostras analisadas com diagnóstico presuntivo no laboratório de micologia do Hospital de Santa Maria, Lisboa, quanto à localização das lesões clínicas.

4.2 Caracterização da população-alvo

A idade média dos indivíduos com suspeita clínica de TC (n=248) foi 9,4 anos com desvio padrão de 11,8, porém esse valor médio desceu nos diagnósticos confirmados de TC (n=111) para 6,6 com desvio padrão de 7,7. Em relação ao sexo, 50,7% eram do sexo masculino e 49,3% do sexo feminino nas amostras suspeitas e, nas confirmadas, 65% masculino e 35% feminino.

O fototipo entre V e VI foi declarado em 75 amostras com diagnóstico presuntivo (30,2%); nas amostras com diagnóstico confirmado, foram 37 doentes com fototipo maior ou igual a V (33,3%), 33 confirmados pela cultura e 4 somente no exame direto.

Somente para um único doente foi declarada a existência de um animal doméstico (coelho).

4.3 Resultados dos exames micológicos, direto e de culturas, e sua correlação

A Figura 8 mostra que, das 1.092 amostras recebidas, 248 eram diagnósticos presuntivos de TC (22,7%). Foram 111 amostras positivas (44,8%) para os dermatófitos de TC, somando os resultados do exame direto – foram considerados positivos quando havia presença de filamentos septados, cadeias de artrosporos e/ou esporos agrupados – e cultivo micológico, com a identificação microscópica da espécie de dermatófito (Figura 9). O exame direto com KHO a 10% revelou 82 amostras positivas (33,1%) e 166 negativas (66,9%), já as culturas revelaram 102 amostras positivas (41,1%) e 146 negativas (58,9%): em comum, foram 73 exames positivos entre os dois métodos de diagnóstico. A Figura 10 sintetiza esses resultados encontrados.

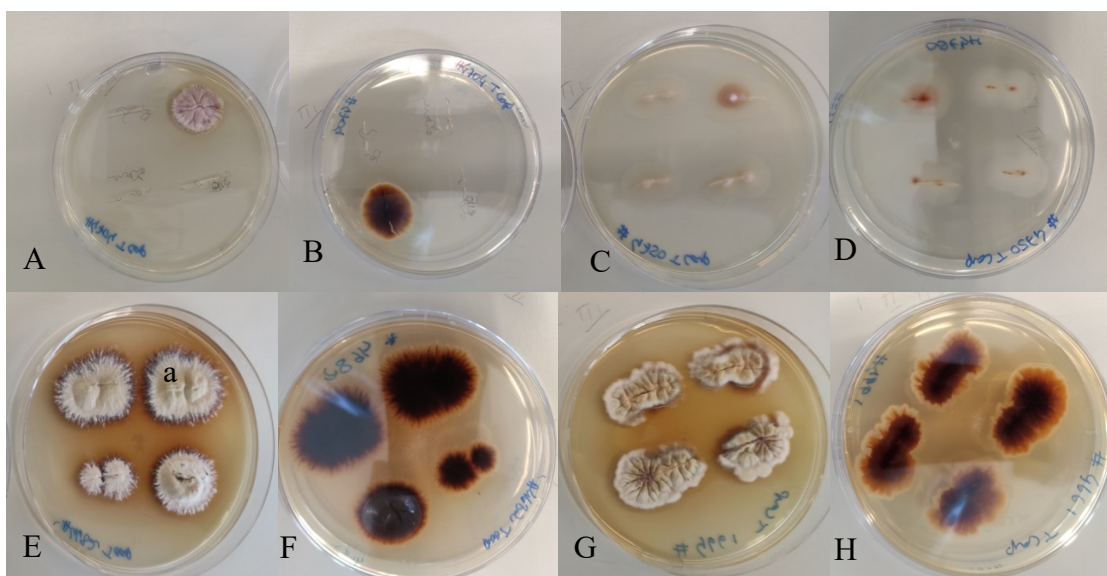


Figura 9 – Macroscopia de isolados em agar dextrose Sabouraud. (A) *T. soudanense*: anverso com micélio aéreo encarnado. (B) *T. soudanense*: reverso com coloração da colônia marrom-avermelhado. (C) *M. audouinii*: anverso com micélio aéreo escasso. (D) *M. audouinii*: reverso com o centro encarnado. (E) *T. tonsurans*: anverso micélio aéreo com aspeto de camurça. (F) *T. tonsurans*: reverso com coloração da colônia marrom-encarnado. (G) *T. soudanense*: anverso com micélio aéreo aveludado. (H) *T. soudanense*: reverso com coloração da colônia marrom-encarnado.

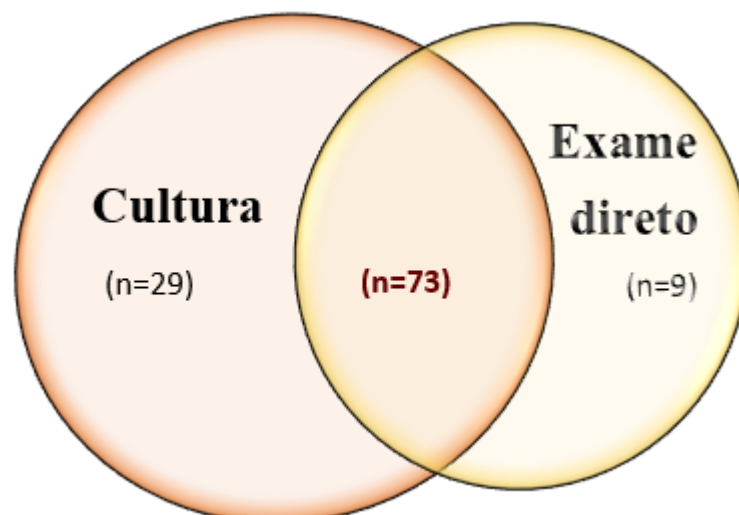


Figura 10 – Diagrama da apresentação dos exames positivos para o exame direto (n=82), positivo para a cultura (n=102) e concordantes entre si (n=73). Fonte: elaboração própria.

Entre as 102 positivas no exame de cultura, havia 48 de *M. audouinii* (47,0%), em 3 não foi possível diferenciar entre *M. audouinii* e *M. canis* (2,9%), 1 de *M. canis* (1,0%), 37 de *T. soudanense* (36,3%), 2 em que não se conseguiu diferenciar entre *T. soudanense* e *T. violaceum* (2,0%), 9 de *T. tonsurans* (8,8%) e 2 de *T. mentagrophytes* (2,0%) (Figura 11).

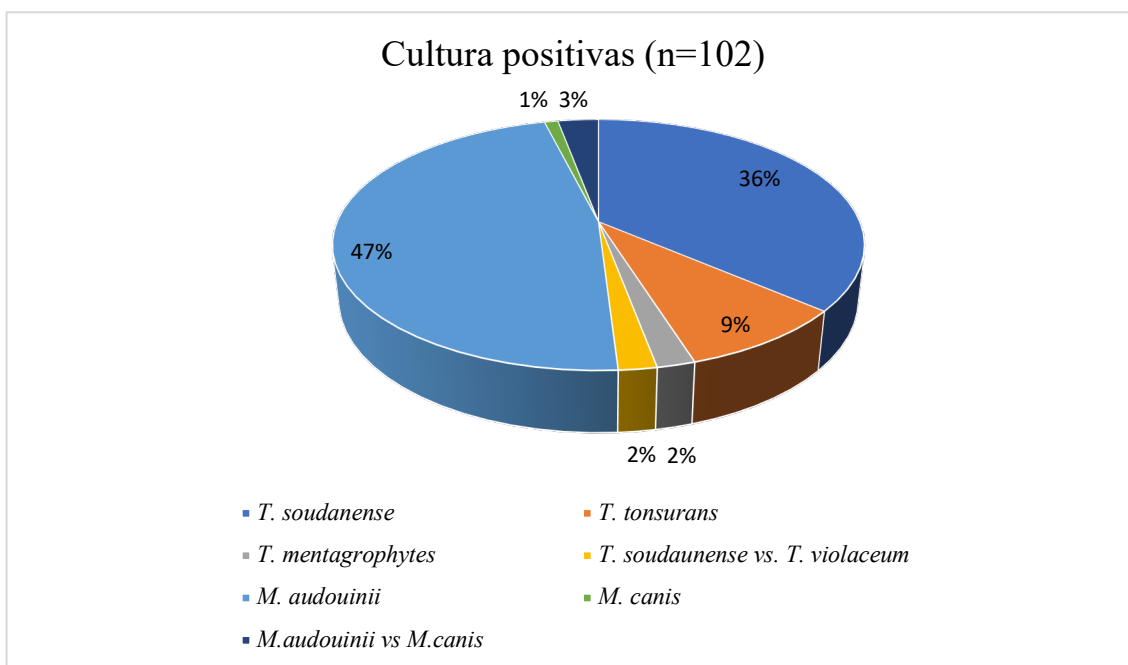


Figura 11 – Distribuição das amostras cultivadas.

Em relação à qualidade da colheita das amostras, a presença de cotos em 35 amostras era muito escassa e/ou inexistente, mas, delas, 7 foram positivas, sendo 5 amostras positivas

no exame direto (com a confirmação de uma delas em exame de cultura); outras 2 revelaram-se positivas exclusivamente na cultura.

Ao comparar a associação dos resultados positivos do exame direto com os resultados positivos da cultura, obteve-se uma probabilidade estatística de concordância altamente significativa. Foi analisado se os resultados de dois tipos de exames de diagnóstico de TC são concordantes entre si. Ambos os exames foram aplicados a 248 unidades amostrais. Desejava-se, por meio dos testes, diagnosticar a TC em cada unidade amostral e era esperado que o diagnóstico fosse o mesmo para todas as amostras. No entanto, apenas 210 das 248 amostras (84,6%) apresentaram o mesmo resultado – sim nos dois testes ou não nos dois testes. Os valores obtidos estão disponíveis na Tabela 2.

Tabela 2 – Contingência de casos de TC observados entre os exames direto em amostra clínica e cultura

		Cultura		Total
		Sim	Não	
Exame direto	Sim	73	9	82
	Não	29	137	166
Total		102	146	248

Fonte: Elaboração própria.

Para verificar o nível de concordância ou associação entre os dois experimentos, foi aplicado o teste qui-quadrado, que testou as seguintes hipóteses:

H_0 : os exames não têm associação entre si (são independentes)

H_1 : os exames têm associação entre si (são dependentes).

Aplicando o teste, foi obtido o p-valor $< 0,001$, menor do que a referência de 5%, ou seja, rejeita-se a hipótese nula. Os exames diretos e as culturas apresentam algum grau de associação significativa do ponto de vista estatístico. No entanto, é importante avaliar o grau de associação e, no caso, o grau de concordância entre eles. O índice Kappa foi usado para verificar o nível de concordância, obtendo $K = 0,674$ (p-valor $< 0,050$), o que indica que a taxa de concordância é classificada como “forte”, além de ser estatisticamente significativa (Landis & Koch, 1977). Portanto, o nível de associação e concordância entre os dois tipos de exame é forte e estatisticamente significativa ao nível de 5% de significância.

4.4 Correlação entre tipo de parasitismo capilar (*ectotrix*, *endotrix*) e identidade do dermatófito (gênero, espécie) causal

Quanto à forma de apresentação no exame direto 62 amostras puderam ser classificadas quanto ao envolvimento capilar. Apresentavam padrão *ectotrix* 33 amostras que em cultura resultaram em 19 diagnósticos de *M. audouinii*, 1 de *T. mentagrophytes*, 9 de *T. soudanense*, e 2 de *T. tonsurans*, sendo 1 negativo e 1 de saprófita. O padrão *endotrix* estava presente em 15 amostras, nomeadamente 7 de *M. audouinii*, 6 de *T. soudanense*, sendo 2 negativos. Finalmente, o padrão *ecto-endotrix* estava presente em 14 amostras (6 de *M. audouinii*, 7 de *T. soudanense*, sendo 1 negativo) (Tabela 3).

Tabela 3 – Padrão de envolvimento capilar

Envolvimento capilar \ Cultura	<i>Ectotrix</i>	<i>Endotrix</i>	<i>Ecto-endotrix</i>
<i>M. audouinii</i>	19	7	6
<i>T. soudanense</i>	9	6	7
<i>T. tonsurans</i>	2	0	0
<i>T. mentagrophytes</i>	1	0	0
Saprófita	1	0	0
Negativo	1	2	1

Fonte: elaboração própria.

Foi realizada a análise estatística com teste qui-quadrado e índice Kappa para a concordância de resultados entre cultura e padrão de envolvimento capilar obtido do teste de exame direto de amostra clínica, tendo como referência esperada a descrita por Fuller *et al.* (2014). Foi com esta finalidade possível testar 57 amostras, i.e. aquelas em que houve correspondência entre tipo de envolvimento capilar (*ectotrix*, *endotrix*, *ecto-endotrix*) e isolamento de dermatófito causador de TC. Era esperado que os dois tipos de exame classificassem de forma consistente e concordante as unidades amostrais, i.e. que para dado tipo de parasitismo capilar (ex. *endotrix*) fosse detetado um dermatófito reconhecidamente associado a esse tipo de parasitismo. Os valores obtidos estão disponíveis na Tabela 4, testando as seguintes hipóteses:

H₀: os exames não têm associação entre si (são independentes)

H₁: os exames têm associação entre si (são dependentes).

Tabela 4 – Contingência de resultados observados como padrão *ectotrix* e *endotrix* no exame direto de amostra clínica e cultura

		Cultura		Total
		Espécie associada com parasitismo tipo <i>Ectotrix</i>	Espécie associada com parasitismo tipo <i>Endotrix</i>	
Exame direto	<i>Ectotrix</i>	26	7	33
	<i>Endotrix</i>	11	13	24
Total		37	20	57

Fonte: Elaboração própria.

Foi obtido o p-valor de 0,010, menor do que a referência de 5%, ou seja, rejeita-se a hipótese nula. Os exames apresentam algum grau de associação significativa do ponto de vista estatístico. No entanto, apenas 39 das 57 amostras (68,4%) apresentaram concordância entre tipo de parasitismo capilar e espécie de dermatófito. Para avaliar o grau de concordância, foi calculado o valor do índice Kappa, obtendo-se $K = 0,337$ (p-valor $< 0,010$), o que indica que a taxa de concordância é classificada como “razoável” (Landis & Koch, 1977). Ou seja, o nível de associação e concordância entre os dois tipos de exame é estatisticamente significativo ao nível de 5% de significância, o que é considerado “razoável”.

4.5 Correlação entre fototipo cutâneo e identidade do dermatófito causal

Nas amostras com diagnóstico confirmado (n=111), havia 37 doentes com fototipo maior ou igual a V, sendo 33 confirmado pela cultura. Nesse grupo, os dermatófitos estavam distribuídos em (Figura 12): 48,5% *M. audouinii* (n=16), 9,1% *M. audouinii* vs. *M. canis* (n=3), 39,4% *T. soudanense* (n=13), 3,0% *T. soudanense* vs. *T. violaceum* (n=1).

No grupo do fototipo não declarado, o predomínio também se manteve em 46,3% *M. audouinii* (n=32) e 1,5% *M. canis* (n=1), seguido por 34,8% *T. soudanense* (n=24), 1,5% *T. soudanense* vs. *T. violaceum* (n=1), 13,0% *T. tonsurans* (n=9) e 2,9% de *T. mentagrophytes* (n=2). Porém vale ressaltar que este estudo retrospectivo e os doentes não foram sistematicamente identificado quanto o seu fototipo.

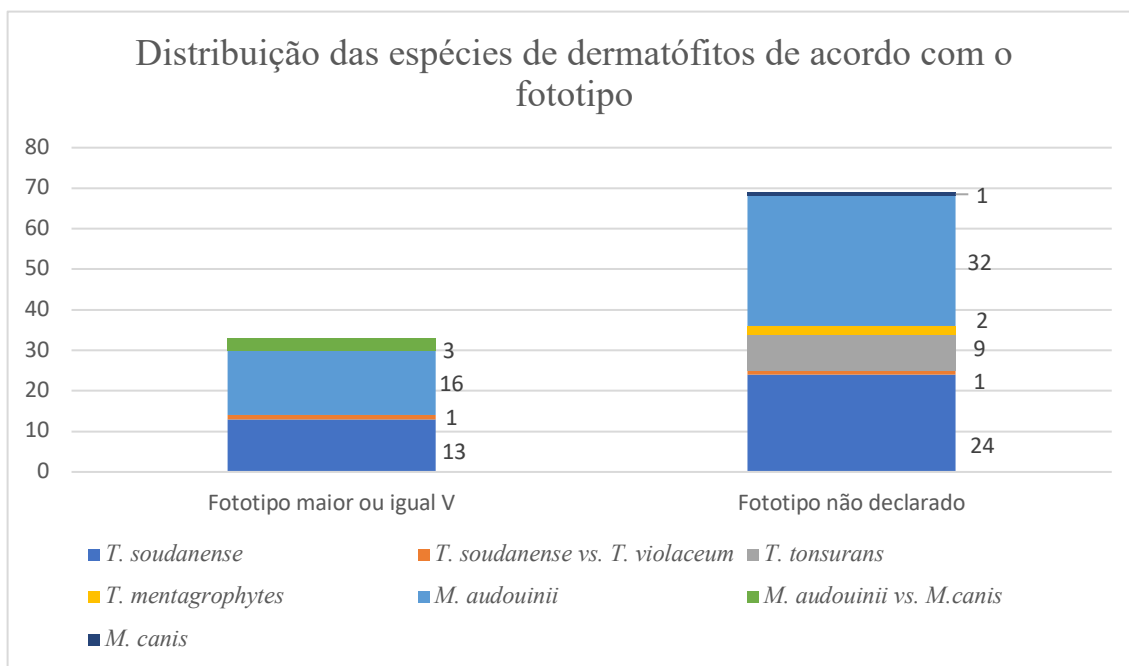


Figura 12 – Distribuição dos resultados das culturas de TC de acordo com o fototipo (n=102) sendo 33 pertencentes ao grupo V e VI.

4.6 Tecnologia de PCR-sequenciação

No âmbito deste trabalho de tese foi implementada a metodologia de PCR-sequenciação como tecnologia rápida, precisa, e atualmente de custo bastante acessível no diagnóstico laboratorial de casos de TC.

Especificamente, no contexto desta tese, PCR-sequenciação foi usado como método complementar de validação da acuidade do exame (macroscópico, microscópico) de culturas micológicas no diagnóstico de dermatófitos causadores de TC. Corresponde a passo preliminar para a sua subsequente implementação como método primário de diagnóstico daqueles dermatófitos em casos de TC.

4.6.1 Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de colónias cultivadas em meio sólido

Foram usadas 86 amostras de culturas micológicas de casos de TC, com isolamento de dermatófitos caracterizados quanto ao género e espécie, e 4 amostras de culturas de fungos saprófitas que serviram de controlo interno, totalizando 90 amostras de micélios.

Do total de 90 amostras, 45 foram amplificadas com sucesso, originando, como esperado, bandas únicas de ~600 pares de bases (pb) com os *primers* universais ITS1 e ITS4; em 45 amostras não foi obtida banda compatível com o amplicão (*amplicon*) esperado pelo que foram consideradas negativas (Figura 13).

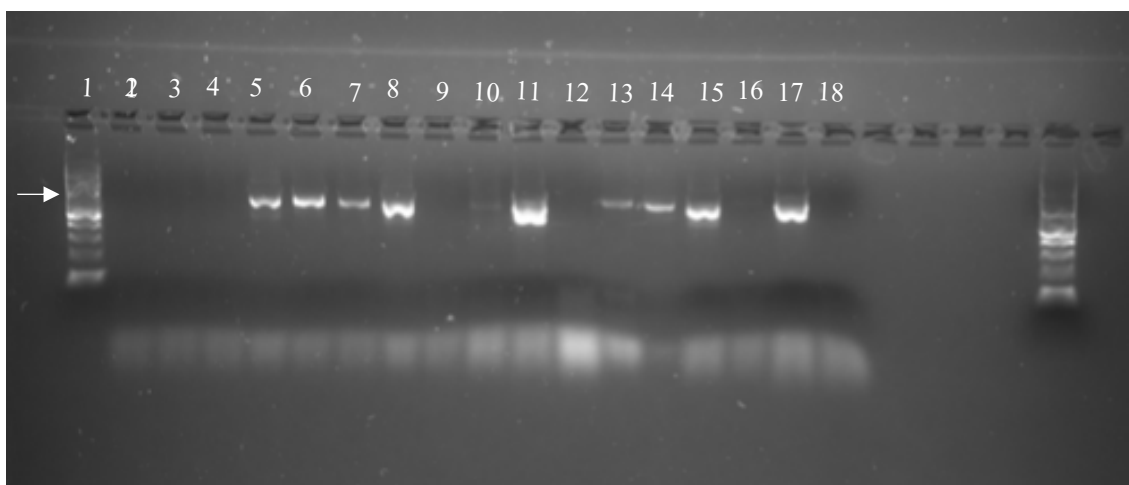


Figura 13 – Produtos de PCR de isolados clínicos de TC: *T. tonsurans* (poços: 6, 7 e 11), *T. soudanense* (poços 5, 8, 10, 13, 14 e 15), *M. audouinii* (poço 16), controlo positivo - *Epidermophyton* (poço 17) e controlo negativo – água ultra (18).

Dos 45 casos positivos, em 35 foi identificado por sequenciação automática seguida de análise bioinformática sumária um dermatófito com reconhecido potencial patogénico em TC. Os dermatófitos assim identificados correspondem a *T. soudanense* (n=19), *M. audouinii* (n=10), e *T. tonsurans* (n=6) (Figura 14). Em 6 casos não foi possível qualquer identificação por erros técnicos decorridos durante a reação de sequenciação, correspondendo os restantes 4 casos às espécies saprófitas incluídas como controlo de qualidade da sequenciação, nomeadamente *Aspergillus spp.* (n=1), *Cladosporium spp.* (n=1), *Penicillium spp.* (n=1) e *Rhodotorula spp.* (n=1). Dos 45 casos negativos, 62,2% das amostras correspondiam a culturas de *M. audouinii* (n=28), 29,0% de *T. soudanense* (n=13), 4,4% de *T. mentagrophytes* (n=2) e 4,4% de *T. tonsurans* (n=2).

Procedeu-se de seguida à correlação entre os diagnósticos de dermatófitos (género, espécie) efetuados por exames de culturas e os obtidos por PCR-sequenciação.

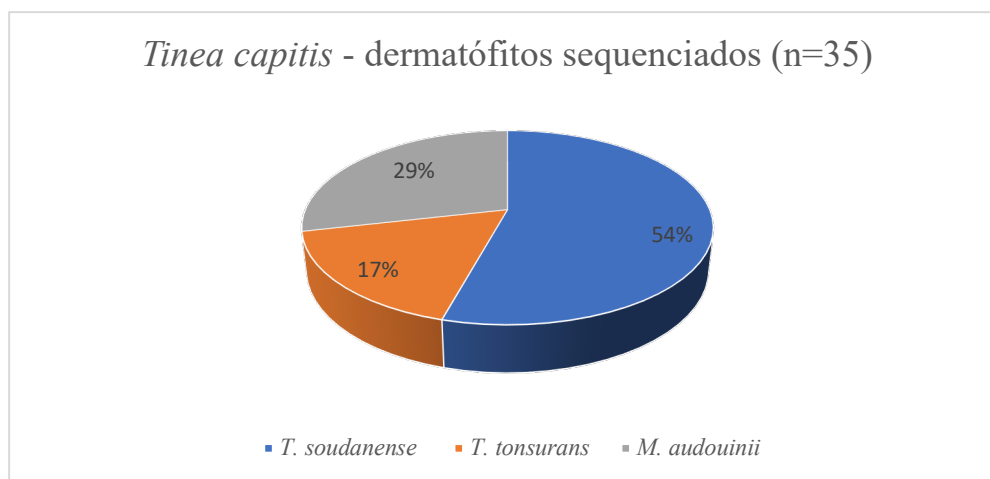


Figura 14 – Distribuição das amostras de dermatófitos sequenciados.

Foi verificada a concordância entre resultados positivos dos diagnósticos de TC por cultura e PCR-sequenciação. Dentre as 86 amostras positivas para cultura, apenas 35 (40,7%) também foram positivas pelo PCR-sequenciação³.

Com o objetivo de analisar a associação entre o exame de cultura e o PCR-sequenciação das espécies identificadas nas amostras, também foram realizados testes qui-quadrado e o cálculo do índice Kappa⁴. Os resultados por tipo de exame podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 – Contingência de resultados de exames de cultura e PCR-sequenciação

PCR-sequenciação \ Cultura	<i>M. audouinii</i>	<i>T. soudanense</i>	<i>T. tonsurans</i>	Total
<i>M. audouinii</i>	9	0	0	9
<i>T. soudanense</i>	1	19	1	21
<i>T. tonsurans</i>	0	0	5	5
Total	10	19	6	35

Fonte: elaboração própria.

Os mesmos diagnósticos eram esperados para cultura e PCR-sequenciação. Das 35 amostras de TC, apenas 31 delas apresentaram classificação concordante entre os dois tipos de exames (94,3%). O teste qui-quadrado e a análise do índice Kappa não são recomendados para serem aplicados nesse formato dos dados, uma vez que há muitos valores esperados que são menores do que 5, de modo que a Tabela 5 foi desmembrada em outras três tabelas para a aplicação desses testes, comparando os resultados de cultura e PCR-sequenciação:

- contingência de *M. audouinii*;
- contingência de *T. soudanense*;
- contingência de *T. tonsurans*;

A partir do rearranjo dos dados, foram feitos os testes os resultados das contingências estão expressos na Tabela 6.

³ Uma vez que o PCR foi realizado apenas para as amostras cuja cultura tivessem resultado positivo, não foi possível fazer um teste de concordância ou de independência entre a cultura e o PCR..

⁴ Para os casos em que foi possível estruturar uma tabela de contingência do tipo 2x2.

Tabela 6 – Resultado de qui-quadrado e índice Kappa para resultados de cultura e PCR-sequenciação

Cultura versus PCR	Qui-quadrado (p-valor)	Kappa	Concordância
<i>M. audouinii</i>	0,000	0,928	Quase perfeita
<i>T. soudanense</i>	0,000	0,884	Quase perfeita
<i>T. tonsurans</i>	0,000	0,892	Quase perfeita

Fonte: elaboração própria.

Como conclusão, só foi possível analisar a concordância dos exames de cultura e PCR-sequenciação para as espécies *M. audouinii*, *T. soudanense* e *T. tonsurans*. Para todos os três casos, os exames apresentam associação significativa ao nível de 5% e um grau de concordância elevado.

4.6.2 Quantificação de DNA a partir de colónias cultivadas em meio sólido

Em relação à quantificação do DNA (*nucleic acid* ng/ μ l) após a extração, se obteve média de 316,58 ng/ μ l com desvio padrão de 564,42 (Figura 15). Particularmente a relação $A_{260/280}$ apresentou uma média de 0,7419 com desvio padrão de 0,070. Constatou-se a não distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk ($p = 0,0011$), portanto seguiu-se para o teste não paramétrico de Mann Whitney para a relação de $A_{260/280}$, para os resultados de PCR positivo e negativo, tendo sido demonstrada a não correlação dos dados ($p=0,9136$).

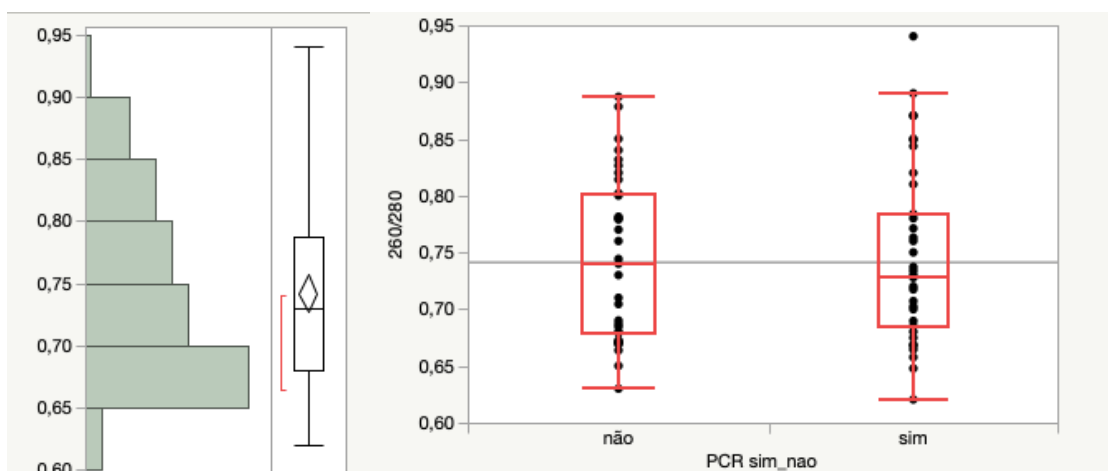


Figura 15 – A) Distribuição da quantificação de DNA na relação de 260/280. B) Comparação entre positivos e negativos.

4.6.3 Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de colónias cultivadas em meio líquido

Outro protocolo testado envolveu: 3 amostras positivas para o PCR da colônia de cultura em meio sólido (*M. audouinii*, *T. soudanense* e *T. tonsurans*); 3 amostras negativas para o PCR e positiva para a cultura (*T. soudanense*, *T. mentagrophytes* e *T. soudanense*). As

6 amostras foram recultivadas em meio líquido, e incubadas a 27 °C por 8 dias. Após a incubação, foram realizadas a extração e a ampliação. Nas colônias recultivadas a partir do meio sólido, quatro formaram colônia no meio líquido e duas não. Mesmo assim, todas as amostras foram submetidas ao PCR. E foram duas amostras positivas para meio sólido e meio líquido e, uma delas, que tinha dado resultado negativo para o meio sólido, foi positiva para meio líquido, e com o DNA mais puro $A_{260/280} = 2,5$, 1,25 e 1,21, com sequenciamento *Chaetomium globosum*, *C. globosum* e *T. tonsurans*, respectivamente (Figura 16).

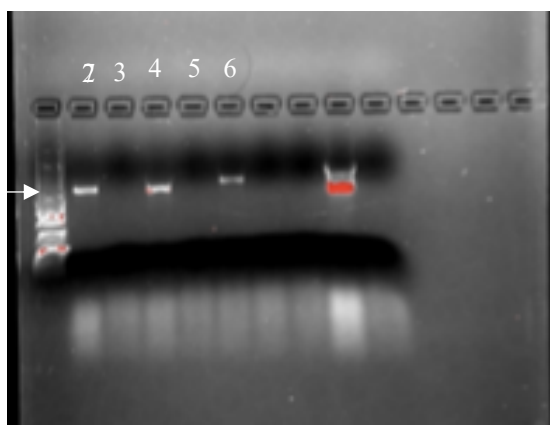


Figura 16 – Produtos de PCR de isolados em meio líquido de TC: *C. globosum* (poço 2 e 4) e *T. tonsurans* (poço 6) respectivamente.

4.6.4 Tecnologia de PCR-sequenciação a partir de amostras clínicas

Em relação aos PCR de amostras clínicas (n=35), todos foram negativos, mesmo os que foram positivos para o isolamento. Porém, o que se observou em mais de 90% das amostras foi a escassez de material e, ainda, muitos não possuíam cotos. Além disso, as amostras foram processadas em média 3 meses após serem recebidas no Laboratório de Micologia – esse atraso no processamento das amostras foi resultado da pandemia. Na tentativa de se obter resultados positivos, foram realizados dois protocolos diferentes, amostras diretas com concentrações de DNA variando de 1 a 5 µl e a concentração de BSA a 2% e 20%, porém sem efetividade. Após a extração do DNA, o ácido nucleico teve média 70,20 ng/ µl, com desvio padrão de 29,3, mais baixa se comparada às dosadas nas culturas, porém a pureza do DNA se manteve em torno de $A_{260/280}$ 0,71 ng/ µl com desvio padrão de 0,06, semelhante à da cultura.

4.6.5 Outros protocolos de PCR

Para todas as análises de PCR em que se obtiveram resultados negativos, os exames foram repetidos mais duas vezes e confirmou-se o mesmo resultado. Além disso, em quatro

amostras negativas foram tentados outros protocolos, com diminuição dos *primers* de 2 para 1 μ l e a quantidade de DNA nas concentrações de 1, 2 e 5 μ l – ainda assim, permaneceram negativos.

Outro teste realizado em amostras positivas para o PCR de *M. audouinii* e *T. soudanense* foi a alteração das concentrações de DNA (2 μ l, 4 μ l e 6 μ l) e o que se constatou é que, nas concentrações maiores para o *T. soudanense*, os resultados positivos negativaram (Figura 17).



Figura 17 – Produtos de PCR de regiões ITS1-ITS2 de isolados clínicos de TC: *M. audouinii* 2 μ l, 4 μ l e 6 μ l -positivos (poço 2, 3 e 4) e *T. soudanense* 2 μ l -positivo (poço 5), 4 μ l e 6 μ l negativo (poço 6 e 7), e controlo positivo nos dois últimos poços.

5 DISCUSSÃO

A TC é caracterizada pela infecção por dermatófito no couro cabeludo. Formas inflamatórias e/ ou médicas não familiarizados com essa doença podem levar a um diagnóstico presuntivo equivocado, o que resulta no atraso do diagnóstico e, como consequência, a alopecia cicatricial. O diagnóstico rápido e confiável é imprescindível para os doentes, que em sua maioria são crianças na fase escolar, com idade de 3 a 9 anos, e na fase pré-púbere. Os sinais clínicos dependem do agente causal, sistema imunitário do doente e tipo de invasão capilar. A perda de cabelo, eritema e descamação podem variar, porém a TC é considerada como a principal causa de alopecia em crianças (Cranwell e Sinclair, 2018; Sacheli *et al.*, 2016; Fuller *et al.*, 2014; Bennassar e Grimalt, 2010; Isa-Isa, Arenas e Isa, 2010; Nield, Keri e Kamat, 2006).

Em relação à predisposição por sexo é constatada uma variação. Estudos na Bélgica apontaram a relação masculino/ feminino de 0,51; na Etiópia, a proporção descrita foi masculino/ feminino de 3,0; em nosso levantamento, 1,86 (Pérez-Tanoira, 2017; Sacheli *et al.*, 2016).

A distribuição das espécies de dermatófitos está relacionada com a demografia e com a modernização e o aumento do deslocamento de pessoas. A Europa tem baixa prevalência de TC, porém, a França (em particular a cidade de Paris), seguida da Itália (Milão), Espanha (Málaga) e Grécia (Atenas) têm maior prevalência (Rodríguez-Cerdeira *et al.*, 2021). Seu perfil vem se alterando no mundo e, em particular, na Europa (Bontems *et al.*, 2020, Sacheli *et al.*, 2020; Ziegler *et al.*, 2016), com acréscimo de *M. audouinii*, *T. tonsurans*, *T. violaceum* e *T. soudanense*. Sacheli *et al.* (2020), em seu estudo na Bélgica, destacou a predominância de *M. audouinii*, seguida por *T. soudanense* e *T. tonsurans*, em 94% dos doentes provenientes do continente africano, mas outra publicação que a antecedeu investigou um surto de *M. audouinii* também na Bélgica, com a maioria dos casos em doentes de nacionalidade belga, seguida de africanos, não estabelecendo a origem do surto (Sacheli *et al.*, 2016). Na Suíça também se relata a predominância de TC em criança de origem africana, com a prevalência de *T. violaceum* e *T. soudanense* (Bontems *et al.*, 2020). Na Alemanha, foi descrito um aumento de *M. canis*, *M. audouinii*, *M. gypseum*, *T. violaceum*, *T. interdigitale* e *T. soudanense*, e um decréscimo de *T. tonsurans*, *T. rubrum* e *T. verrucosum* (Ziegler *et al.*, 2016).

Na África, na Etiópia, Péres-Tanoira (2017) diagnosticou, com maior frequência: *T. verrucosum* e *T. tonsurans*, seguido de *T. mentagrophytes*, *M. audouinii* e *T. soudanense*. Já no Uganda, a espécie mais encontrada na Clínica de Pele da Universidade de Ciência e Tecnologia de Mbarara (MUST) foi *T. violaceum*, seguida por *M. audouinii*, *T. soudanense* e *T. rubrum* (Wiegand *et al.*, 2017).

Na Ásia, um surto de *T. soudanense* com TC foi descrito em 30 crianças em um orfanato em Mianmar em 2020 (Norrenberg, Monod e Christen- Zaech, 2020).

Na América do Sul, no Brasil, um levantamento epidemiológico de TC realizado em São Paulo revelou a predominância de *M. canis* (52,6%), seguido de *T. tonsurans* (45,6%) e, com menor frequência, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*. Na apresentação clínica estava descrita a alopecia em 49,1% dos casos, com predominância de *M. canis* e *T. tonsurans*, seguida de tricofitose (35,1%), com predominância de *T. tonsurans* e *M. canis* (Veasey e Muzy, 2018).

Especificamente em Portugal, Rato *et al.* (2018) realizaram um levantamento epidemiológico e concluíram que *M. audouinii* foi mais frequentemente associado a TC (42,6% dos casos), seguido de *T. soudanense* (22,1%), *T. tonsurans* (10,8%) e *M. canis* (10,5%), porém na região norte do país, diferente da região central, o *M. canis* ultrapassou a ocorrência de *M. audouinii*. Outro levantamento realizado em Portugal foi no Serviço Dermatológico do Hospital de Capuchos, entre 2008 e 2012, envolvendo 935 amostras suspeitas de TC, sendo 59,3% positivas e 40,7% negativas. Dentre as positivas, 81,3% pertenciam a doentes da raça negra. A espécie mais isolada foi *M. audouinii* (57,9%), seguida de *T. soudanense* (28,8%), *M. canis* (2,3%), *Microsporum ferrugineum* (1,8%), *T. violaceum* (0,9%), *T. mentagrophytes* (0,7%) e *T. rubrum* (0,5%) (Campos *et al.*, 2014). Na raça negra houve predomínio de *M. audouinii*, seguido de *T. soudanense* (Campos *et al.*, 2014), assim como em nosso levantamento, porém a proporção do fototipo V e VI foi relativamente menor, com 33%, mas há de se ressaltar que nosso estudo é retrospectivo e os dados relacionados ao fototipo não foram sistematicamente anotados. Entre 2000 e 2003, um estudo realizado no Serviço de Dermatologia do Hospital Garcia de Orta também apontou *M. audouinii* como principal agente na raça negra e caucasiana (Serrano *et al.*, 2005). Ainda, estudos mais antigos na região norte de Portugal apontavam *M. audouinii* e *T. soudanense* em números inexpressivos, com *M. canis* dominante, porém a raça mais acometida era a caucasiana. Dentre as crianças com raça negra, *T. soudanense* foi o mais isolado (Lobo *et al.*, 2008; Pereira, Duarte e Sousa

Bastos, 2005; Cunha *et al.*, 2004; Machado *et al.*, 2002; Duarte e Macedo, 2000). Essa alteração nos agentes isolados pode ser explicada pelo acréscimo de imigrantes chegando principalmente do Brasil e África, totalizando em 2017 oficialmente 36.639, o que representou um aumento de 22% em relação a 2016 (Oliveira & Gomes, 2018).

Em nosso estudo, a espécie mais identificada com a cultura foi de *M. audouinii* (47,0%), seguida de *T. soudanense* (36,3%), *T. tonsurans* (8,8%), em 3 não foi possível diferenciar entre *M. audouinii* e *M. canis* (2,9%), 2 em que não se conseguiu diferenciar entre *T. soudanense* e *T. violaceum* (2,0%) e 2 de *T. mentagrophytes* (2,0%) e 1 de *M. canis* (1,0%). O exame direto é de extrema importância, além de fácil execução e custo baixo, e conta com boa sensibilidade e especificidade. Apesar de ser muito significativa a relação entre positivos/ negativos para o exame direto e o resultado da cultura, 9 amostras foram positivas somente no exame direto e negativas para a cultura, assim como um estudo em que 11 amostras foram positivas para exame direto e negativas para a cultura, o que demonstra a importância da associação do exame direto e da cultura (Pérez-Tanoira, 2017).

O diagnóstico de TC se inicia com o historial e sinais clínicos do doente e dermatoscopia. Os exames laboratoriais, como exame direto e cultura, confirmam a suspeita clínica, porém por vezes podem apresentar falsos negativos e/ou demorar quatro semanas para a confirmação do diagnóstico (Fuller *et al.*, 2014). O diagnóstico molecular tem como objetivo agilizar e simplificar os processos do diagnóstico e, ainda, aumentar a sensibilidade e especificidade do diagnóstico e validar a cultura. São diversas barreiras a vencer para que se consiga bons resultados para todas as etapas do PCR, desde a coleta até a sequenciação.

A coleta de amostras tem sido descrita como uma problemática, principalmente em relação à quantidade e qualidade diminutas ou escassas. Wisselink *et al.* (2011), ao implementarem a técnica de PCR em seu laboratório, constataram que 36,6% não puderam ser analisadas por essa metodologia por falta de material nas amostras. Santos, Coelho e Nappi (2002) relataram que algumas lesões de TC são pouco descamativas, o que explicaria a escassez da amostra, e também a importância de coletar amostras junto à raiz ou coto, já que o fungo está presente nessa área. Em nosso estudo, vimos muitas amostras com ausência de cotos, o que diminui a sensibilidade dos testes de diagnóstico.

Além da qualidade e quantidade de amostras, existem substâncias presentes tanto na amostra como introduzidas durante o processamento da amostra ou, ainda, durante a

extração do ácido nucleico, que são capazes de inibir a reação de PCR. Schrader *et al.* (2012) estudaram essas substâncias inibidoras da reação de PCR e seus mecanismos de ação, que diminuem a sensibilidade e também podem gerar resultados falsos negativos.

A melanina e a eumelanina são os inibidores presentes nos cabelos e pele, além do colágeno, presente nos tecidos, e hemoglobina, presente no sangue, que podem estar presentes nas crostas coletada da TC (Schrader *et al.*, 2012; Eckhart *et al.*, 2000; Yoshii, 1993). Esse processo ocorre pela ligação/ adsorção de ácido nucleico e enzimas, além da quelatação de íons metálicos (melanina e colágeno) (Schrader *et al.*, 2012). E ainda o DNA exogênico, através da competição com o modelo. Muitos protocolos visam diminuir seus efeitos e, assim, aumentar a sensibilidade e especificidade.

Em relação à extração do DNA, a queratina deve ser rompida mecanicamente (fragmentação e maceração da amostra) ou por digestão, para melhorar a *performance* da extração (Verrier e Monod, 2017). Em nosso experimento foi utilizada a forma mecânica.

A adição de albumina de soro bovino (BSA) e tratamentos térmicos são descritos como estratégias para remoção dos inibidores (Schrader *et al.*, 2012; Kreader, 1996). No protocolo utilizado, em nosso estudo, tanto o BSA quanto o tratamento térmico estavam presentes e, nas amostras em que os resultados foram negativos, utilizamos concentrações diferentes de BSA; entretanto, não houve diferença nos resultados.

Outro ponto chave é a escolha de iniciadores: existe uma gama de iniciadores (*primers*) para os dermatófitos nas regiões 18S SSU, ITS1-5,8S-ITS2 e 28S LSU. O ITS pode ser usado sozinho ou em conjunto com outros genes codificadores para a identificação da espécie, e foi escolhido como marcador oficial do código de barras de DNA para os fungos (Eberhardt, 2010). Foi utilizado como base um estudo realizado por um consórcio multinacional de micologistas que se reuniram para avaliar as regiões de DNA (SSU, LSU, ITS e RPB1), que considerou o ITS com maior possibilidade de identificação bem-sucedida para uma gama ampla de fungos, além da facilidade no processamento do PCR (Schoch *et al.*, 2012). Esses iniciadores foram utilizados em todas as nossas amostras. Ramaraj (2016); Ahmadi *et al.* (2015) e Brillowska-Dabrowska, Saunte e Arendrup (2007) utilizaram com sucesso os iniciadores ITS1 e ITS4, também por nós usados em nosso protocolo.

Norrenberg, Monod e Christen- Zaech (2020) utilizaram *primers* universais LSU1 (5'-CATAGCGMACAAGTAGAGTG-3') e LSU2 (5'-GTCCGTGTTTCAAGACGGG-3'),

não detetando nenhum *amplicon* nos géis de agarose após a eletroforese. Ao substituir os iniciadores por D003 (5'-GTAGAGTGTCGAAAGGTTA-3') e D004 (5'-GACGGGCCGCTTACGGCCAT-3'), um produto de PCR aninhado de 250 pb em quantidades substanciais, sendo 100% idênticas ao DNA ribossomal de *T. soudanense*.

Ahmadi *et al.* (2015) constataram uma incongruência nos resultados de dermatófitos analisados por métodos convencionais morfológicos quando comparados aos resultados moleculares -PCR-RFLP. Dos 94 casos isolados identificados como *T. rubrum* por testes moleculares, 80,8% foram identificados pela morfologia como outras espécies: *T. interdigitale* (75,5%) *E. floccosum* (2,1%) e *M. canis*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans* (1,1% cada). E ainda 10 cepas que não foram identificadas no método morfológico foram identificadas como *T. interdigitale* (n=8), *E. floccosum* (n=2) com o método molecular. Em nossas amostras, a incongruência foi precisamente entre positivos e negativos, porém a relação entre a classificação fenotípica e genotípica foi altamente significativa. Em um estudo realizado no Uganda, a cultura também se mostrou superior ao PCR-Elisa – a comparação entre eles revelou sensibilidade de 0,84 e especificidade de 0,85 (Wiegand *et al.*, 2017). Nossos resultados apontaram que 40,7% das amostras submetidas ao PCR foram positivas, com a maioria *T. soudanense*, seguido de *M. audouinii* e *T. tonsurans*, uma inversão na proporção encontrada no cultivo. Uma das justificativas seria a maior dificuldade na detecção de *M. audouinii*, pelo facto de a colônia ser muito plana e o micélio desta espécie ser vegetativo e não aéreo, como *T. soudanense* (Weeks, Moser e Elewski, 2003). Em 62,2% das amostras com o PCR-sequenciação negativo em nosso estudo eram de *M. audouinii*, o que levaria à maior presença de agarose contaminante e, com isso, maior dificuldade na extração do DNA.

Outro motivo para o número alto de negativos para o PCR através de colônias em meio sólido ocorreu pelo tempo que decorreu entre a incubação e a realização do método molecular, em média 6 meses: a quantificação de DNA nas colônias cultivadas em meio sólido, revelaram uma baixa pureza de DNA ($A_{260/280}=0,7419$). Tentamos recultivar as culturas que estavam com qualidade comprometida, porém conseguimos resultados em poucas amostras. Estudos recomendam a aplicação de métodos moleculares após 2 a 3 semanas de incubação em meios sólidos e 8 a 10 dias em meio líquido (Brillowska-Dabrowska, Saunte e Arendrup, 2007).

Sacheli *et al.* (2016) estudaram retrospectivamente *M. audouinii* na Bélgica. Inicialmente, 122 amostras foram selecionadas e subcultivadas em agar Malte a 30 °C, após a confirmação foram transferidas para meio líquido Sabouraud e cultivadas por 7 a 10 dias a 30 °C antes da extração do DNA e obtiveram um resultado positivo em 116 amostras. Com a aplicação do diagnóstico molecular a partir de amostras cultivadas em meio líquido, nossos resultados foram melhores, principalmente na pureza do DNA da amostra. Quando utilizamos colônias cultivadas em meio líquido, a pureza do nosso DNA aumentou, com média $A_{260/280} = 1,653$ comparado a média de $A_{260/280} = 0,7419$ para as amostras processadas a partir de colônias cultivadas em meio sólido, mas nossa relação com os isolados na cultura e o sequenciamento foi baixa: somente 1 de 3 teve a mesma identificação, os outros dois foram sequenciados por *C. globosum* (saprófito) e na cultura foram identificados como *T. soudanense* e *M. audouinii*.

Já nas amostras clínicas, a possibilidade dos resultados negativos poderá estar na quantidade de material em cada amostra, uma problemática frequente no laboratório, 35 amostras eram muito escassas e/ou inexistentes, e após o processamento dos exames convencionais realizados no laboratório, a reserva de material nas amostras eram pequenas, a quantificação de ácido nucleico em média foi 70,20 ng/ μ l, muito menor encontrada nas culturas com uma baixa pureza $A_{260/280} = 0,7$.

6 CONCLUSÃO

A TC é uma das dermatofitoses mais descritas em crianças, tendo a alopecia cicatricial como seqüela do tratamento tardio, e os agentes antropofílicos se mostram como uma crescente. A emigração de africanos mudou o perfil de agentes relacionados à TC na Europa, incluindo Portugal.

Os agentes isolados em nosso estudo estão em conformidade com as últimas publicações no país na região de Lisboa, com predominância de *M. audouinii* e *T. soudanense*, porém não houve diferença substancial entre as fototipos. Isso pode estar relacionado à transmissão sustentada entre as crianças, faixa etária predominante na amostra, principalmente no ambiente escolar, o que justificaria o aumento de *M. audouinii* independente do fototipo raça. Estudos com o objetivo de verificar especificamente esse ponto são recomendados, uma vez que há deficiências de registro do fototipo na amostra selecionada.

O exame direto de TC se mostrou significativamente concordante com a cultura micológica para a confirmação do diagnóstico. O exame de PCR-sequenciação e a identificação microscópica pela cultura micológica também se mostraram estatisticamente concordantes para a identificação das espécies. A diferença obtida em algumas amostras indica que o uso dos três tipos de exames pode ser benéfico para o diagnóstico de TC.

O diagnóstico precoce de TC é uma urgência para os doentes pediátricos, a fim de evitar seqüelas da doença. A padronização de métodos moleculares é necessária para utilização na sua rotina, existem vários protocolos descritos e aprovados. Além da padronização de diagnóstico molecular, exige-se a padronização na coleta das amostras clínicas, evitando a escassez de material e, com isso, aumentando a sensibilidade do teste molecular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelhamid A E, Swidan Z M, Lotfy R A, Fathi M S, Soltan M Y (2021) Evaluation of the antifungal activity of tazarotene 0,1% gel in comparison to tioconazole 28% solution treating onychomycosis: a clinical, microbiological and in vitro study. **Microbes Infect** 2(1):152-60.
- Ahmadi B, Mirhendi H, Shidfar M R, Nouripour-Sisakht S, Jalalizand N, Geramishoar M, Shokoohi G R (2015) A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. **J Mycol Med** 25(1):29-35.
- Araújo A J G, Bastos O M, Souza M A J, Oliveira J C (2003) Onicomicoses por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **An Bras Dermatol** 78(4):445-55.
- Bar J, Samulov L, Sprecher E, Mashiah J (2019) Griseofulvin vs terbinafina for pediatric *tinea capitis*: When and for how long. **Mycoses** 62(10): 949-953.
- Bennassar A, Grimalt R (2010) Management of tinea capitis in childhood. **Clin Cosmet Investig Dermatol** 3:89-98.
- Bennett J E, Dolin R, Blaser M J. Principles and practice of infectious diseases. **Elsevier sci.** 2014.
- Bergman A, Casadevall A (2010) Mammalian endothermy optimally restricts fungi and metabolic costs. **mBio** 1: e00212-10.
- Binder B, Lackner H K, Poessl B D, Propst E, Weger W, Smolle J, Ginter-Hanselmayer G (2011) Prevalence of tinea capitis in Southeastern Austria between 1985 and 2008: up-to-date picture of the current situation. **Mycoses** 2011; 54: 243-7.
- Binder B, Richtig E, Weger W, Gunter-Hanselmayer G (2009) Tinea capitis in early infancy treated with itraconazole: a pilot study. **IEADV** 23:1161-3.
- Bonifaz A (2012) **Basic medical mycology**, 4th ed. Mexico: McGrawHill, p. 93-128, 600p.
- Bontems O, Fratti M, Salamin K, Guenova E, Monod M (2020) Epidemiology of dermatophytoses in Switzerland according to. A survey of dermatophytes isolated in Lausanne between 2001 and 2018. **J Fungi** 6(95) 3-8.
- Brillowska-Dabrowska, A; Saunte, D M; Arendrup, M C (2007) Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum*. **J Clin Microbiol** 45(4):1200-4.
- Brasileiro A, Campos S, Cabete J, Galhardas C, Lencastre A, Serrão V (2016) Trichoscopy as an additional tool for the differential diagnosis of *tinea capitis*: a prospective clinical study. **Br J Dermatol** 175: 208-9.
- Campos S, Lestre S, Galhardas C, Apetato M (2014) Tinhas do couro cabeludo -estudo retrospectivo de 5 anos (2008-2012) no Hospital Santo António dos Capuchos. **Revista SPDV** 72(3)333-40.
- Chang P, Rodas C (2012) Skin lesions in histoplasmosis. **Clin Dermatol** 30(6):592-598.
- Cranwell W, Sinclair R (2018) Common causes of paediatric alopecia **AJGP** 47(10).
- Cunha A P, Barros A M, Alves S, Pereira M, Santos P, Mota A, Azevedo F, Resende C (2004) Micoses cutâneas superficiais em crianças – revisão de 5 anos. **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 62(3):371.
- Dastghaib L, Azizzadeh M, Jafari P (2005) Therapeutic options for the treatment of *tinea capitis*: griseofulvin versus fluconazole. **J Dermatolog Treat** 16(1):43-6.
- Donghi, D.; Hauser, V., Bosshard, P P (2011) *Microsporum audouinii tinea capitis* in a Swiss school: assessment and management of patients and asymptomatic carriers. **Med Mycol J** 49(3):324-328.
- Duarte M L, Macedo C, Estrada I, Basto A S (2000) Panorama epidemiológico das dermatofitoses no distrito de Braga: revisão de 15 anos (1983-1998). **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 58 (1):55-61.
- Eberhardt U (2010) A constructive step towards selecting a DNA barcode for fungi. **New Phytol** 187:265-8.
- Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E (2000) Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. **Biochem Biophys Res Comm** 271:726-30.
- Elewski B E, Cáceres H W, SeLeon L, Shimy S E, Hunter J A, Korotkiy N, Rachesky I J, Bal V S, Todd G, Wraith L, Cai B, Tavakkol A, Bakshi R, Nyirady J, Friedlander S F (2008) Terbinafine hydrochloride

oral granules versus oral griseofulvin suspension in children with *tinea capitis*: results of two randomized, investigator-blinded, multicenter, international, controlled trials. **J Am Acad Dermatol** 59(1):41-54.

Elewski B E (2000) *Tinea capitis*: a current perspective. **J Am Acad Dermatol** 42:1-20.

Fernandes S, Amaro C, Marins M L, Inácio J, Araújo T, Vieira R, Silvestre M J, Cardoso J (2013) Kerion caused by *Microsporum audouinii* in a child. **Med Mycol Case Rep** 2:52-4.

Frías-De-León M G, Matinez-Herrera E, Atoche-Diéguez C E, González-Cespón J L, Uribe B, Arenas R, Rodríguez-Cerdeira C (2020) Molecular identification of isolates of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. **IJMS** 17(1):45-52.

Fuller L C, Barton R C, Mustapa M F M, Proudfoot L E, Punjabi S P, Higgins E M (2014) British Association of Dermatologists' guidelines for the management of *tinea capitis* 2014. **Br J Dermatol** 174:454-463.

Gianni C, Cerri A, Crosti C (2000) Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases. **Mycoses** 43(1-2):29-33.

Godoy P, Nunes E, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fischman O (2004) Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia** 157:287-290.

Graser Y, Kuijpers A F, Presber W, Hoog G S (2000) Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **J Clin Microbiol** 38:3329-36.

Gu X, Hua Y H, Zhang Y D, Bao D, Lv J, Hu H F (2021) The pathogenesis of *Aspergillus fumigatus*, host defense mechanisms, and the development of AFMP4 antigen as a vaccine. **Pol J Microbiol** 70(1):3-11.

Gupta A K, Dlova N, Taborda P, Morar N, Taborda V, Lynde C W, Konnikov N, Borges M, Raboobee M, Summerbell R C, Adam P, Hofstader S L R, Aboobaker J (2000) Once weekly fluconazole is effective in children in the treatment of *tinea capitis*: a prospective, multicentre study. **BJD** 142:965-8.

Hamer E C, Moore C B, Denning D M (2006) Comparison of two fluorescent whiteners, Calcofluor and Blankophor, for the detection of fungal elements in clinical specimens in the diagnostic laboratory. **Clin Microbiol Infect** 7:87-97.

Haroon T S, Hussain J, Aman S, Nagi A H, Ahmad I, Zahid M, Alvi K H, Iqbal N, Khan K A (1995) A randomized double-blind comparative study of terbinafine and griseofulvin in *tinea capitis*. **J Dermat Treatment** 6:67-9.

Hay R J (2017) *Tinea capitis*: current status. **Mycopathologia** 182(1):87-93.

Ilkit M, Demirhindi H (2008) Asymptomatic dermatophyte scalp carriage: laboratory diagnosis, epidemiology and management. **Mycopathologia** 165:61-71.

Isa-Isa R, Arenas R, Isa M (2010) Inflammatory *tinea capitis*: kerion, dermatophytic granuloma, and mycetoma. **Clin Dermatol** 28:133-6.

Kreader C A (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein. **Appl Environ Microbiol** 62:1102-06.

Kohler J R, Casadevall A, Perfect J (2015) The spectrum of fungi that infect humans. **CSH** 1-2.

Kumar P, Saran R K, Gondal R, Malhotra V (2005) Smear morphology of cryptococcosis presenting as a subcutaneous swelling in healthy adults: a report of three cases. **Cytopathology** 16:143-6.

Landis, J. R., & Koch, G. G (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics** 133(1) 59-174.

Lemsaddek A (2008) **Estudo de dermatófito por métodos moleculares**: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Tese doutorado em Biologia. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa-Lisboa.

Lobo I, Velho G, Machado S, Lopes V, Ramos H, Selores M (2008) Micoses superficiais na consulta de dermatologia pediátrica do Hospital Geral de Santo António – revisão de 11 anos. **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 66(1):53-7.

López-Jodra O, Torres-Rodríguez J M (1999) Unusual fungal species causing onychomycosis. **Rev Iberoam Micol** 16(S): S11-5.

- Machado S, Velho G, Selores M, Lopes V, Amorim M L, Amorim J, Massa A (2002) Micoses superficiais na consulta de dermatologia pediátrica do Hospital Geral de Santo António – revisão de 4 anos. **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 60(1):59-63.
- Mayer P, Nenoff P, Reinel D, Abeck D, Brasch J, Daeschlein G, Effendy I, Ginter-Hanselmayer G, Graser Y, Hipler U, Hoger P, Kolb-Maurer A, Ott H, Schaller M, Zidane M (2020) S1 guidelines: *tinea capitis* **JDDG** 013-033.
- Medeiros A A, Marty S D, Tosh F E, Chin T D Y (1966). Erythema nodosum and erythema multiforme as clinical manifestations of histoplasmosis in a community outbreak. **N Engl J Med** 274:415-420.
- Memisoglu H R, Erboz S, Akkaya S, Akan T, Aksungur VL, Ünal I, Karakas M (1999) Comparative study of the efficacy and tolerability of 4 weeks of terbinafine therapy with 8 weeks of griseofulvin therapy in children with tinea capitis. **J Dermatol Treat** 10:189-95.
- Metin A, Dilek N, Demirseven D D (2015) Fungal infections of the folds (intertriginous areas). **Clin Dermatol** 33(4):437-47.
- Motamedi M, Lari M S, Pakshir K, Zomorodian K (2019) Comparing real-time PCR and Calcofluor-white whit conventional methods for rapid detection of dermatophytes: a cross-sectional study. **J Dermatol Treat** 161:84-86.
- Motamedi M, Mirhendi H, Zomorodian K, Khodadadi H, Kharazi M, Ghasemi Z, Shidfar M R, Makimura K (2017) Clinical evaluation of β -tubulin real-time PCR for rapid diagnosis of dermatophytosis, a comparison with mycological methods. **Mycoses** 60(10): 692-6.
- Moubasher A H, Abdel-Sater M A, Soliman Z (2017) Incidence and biodiversity of yeasts, dermatophytes and non-dermatophytes in superficial skin infections in Assiut- Egypt. **MYCMED** 663:0-14.
- Nenoff P, Kruger C, Ginter-Hanselmayer, Tietz H J (2014) Mycology-an update. Part1: Dermatormycoses: Causative agents, epidemiology and pathogenesis. **JDDG** 188-209.
- Nield LS, Keri JE, Kamat D (2006) Alopecia in the general pediatric clinic: Who to treat, who to refer. **Clin Pediatr (Phila)** 45(7):605-12.
- Ninet B, Jan L, Bontems O, Léchenne B, Jousson O, Panizzon R, Lew D, Monod M (2003) Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. **J Clin Microbiol** 41: 826-830, 10.1128/jcm.41.2.826-830.2003.
- Norrenberg S, Monod M, Christen-Zaech S (2020) Outbreak of *Trichophyton soudanense* causing tinea capitis in an orphanage in Myanmar. **J Mycol Med** 30(4):1-3.
- Nucci M, Anaissie E (2007) Fusarium infection in immunocompromised patients. **Clin Microbiol Rev** 20:695-704.
- Oliveira C R, Gomes N (2018) Indicadores de imigrantes relatório estatístico anula 2018. 1 ed Biblioteca Nacional de Portugal. ISBN 978-989-685-096-8.8 p. 352. Disponível em: <https://www.om.acm.gov.pt/documents/58428/383402/Relat%C3%B3rio+Estat%C3%ADstico+Anual+2018+%E2%80%93+Indicadores+de+Integra%C3%A7%C3%A3o+de+Imigrantes.pdf/00de4541-b1ad-42ed-8ce9-33056321ecdb>.
- Oliveira L C L, Arantes A A, Caiuby M J (1999) Utilidade da investigação rotineira de infecção fúngica pela broncoscopia em pacientes infectados ou não pelo HIV em um hospital geral, referência para SIDA. **RSBMT** 32(30);255-261.
- Pereira T, Duarte M L, Sousa Basto A (2005) Dermatofitias no distrito de Braga: revisão de 22 anos (1983-2004). **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 63(4):50-62.
- Pérez-Tanoira P, Mrin I, Berbegal L, Prieto-Pérez L, Tisiano G, Cuadros J, Górfolas M, Ramos J M (2017) Mycological profile of tinea capitis in schoolchildren in rural Southern Ethiopia. **Med Mycol J** 55(3):262-268.
- Queiroz E P, Santana J C, Barbosa L M S, Maia C S (2018) Relação entre a criptococose e indivíduos portadores do HIV. **AJOHAR** 1:2.
- Ramaraj V, Vijayaraman R S, Rangarajan S, Kindo A J (2016) Incidence and prevalence of dermatophytosis in and around Chennai, Tamilnadu, India. **Int J Res Med Sci** 4(3):695-700.
- Rato M, Costin A, Furtado C, Souza C, Toscano C, Veríssimo C, Trindade F, Almeifa F T, Velha G C, Catorze C, Raposa I, Selada J, Ferreira J A, Batista J, Santos L, Serejo M, Silva M, Apetato M, Sanches M,

- Costa-Silva M, Filipe P L, Santos P, Fonseca P D, Mascarenhas R, Bajanca R, Lopes V, Lewis V, Duarte ML, Galharas C, Anes M (2018) Epidemiologia das infeções fúngicas superficiais em Portugal: revisão de 3 anos (2014-2016) **Revista SPDV** 76(3):269-78.
- Robert R, Pihet M (2008) Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. **Mycopathologia** 166:295–306.
- Robert V, Casadevall A (2009) Vertebrate endothermy restricts mosy fungo as potential pathogens. **JID** 200:1.623-6.
- Rodríguez-Cerdeira C, Martínez-Herrera E, Szepietowski J C, Pinto-Almazán R, Frías-De-León M G, Espinosa-Hernández V W, Chávez-Gutiérrez E, García-Salazar E, Vega-Sánchez D C, Arenas R, Saunte D M (2021) Asystematic review of worldwide data on tinea capitis: analysis of the last 20 years. **JEADV** 35(4):844-83.
- Rodrigues J J S, Silva R C, Siqueira M M (2006) **Técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico**. In: Rosseti M L, Silva C M D, Rodrigues J J S. Doenças infecciosas diagnóstico molecular. Guanabara: Koogan p. 16-40.
- Rothman S, Smiljanic A, Shapuro A L, Weitkamp A W (1947) The spontaneous cure of *tinea capitis* in puberty. **J Invest Dermatol** 8:81-98.
- Sacheli R, Harag S, Dehavay F, Séverine E, Rousseaux D, Adjetey A, Seidel L, Laffneur K, Lagrou K, Hayette M P (2020) Belgian national survey on *tinea capitis*: epidemiological consideration and highlight of terbinafine-resistant *T. mentragrophytes* with a mutation on SQLE Gene. **J Fungi** 6(195): 3-14.
- Sacheli R, Adjetey C, Darfouf R, Melin P, Arrese J, Hayette (2016) A one-year survey of *Microsporum audouinii* infections in Belgium: epidemiological and genotypic characterization. **Parasitology** 22(3):285.10e-16.
- Santos J I, Coelho M P P, Nappi B P (2002) Diagnostico laboratorial das dermatofitoses. **RBAC** 34(1):3-6.
- Schechtman R C, Silva N D V, Quaresma M V, Bernardes-Filho F, Buçard A M, Sodr e C T (2015) Dermatoscopic findings as a complementary tool in the differential diagnosis of the etiological agent of *tinea capitis*. **An Bras Dermatol** 90(3 Suplemento 1): S13-5.
- Schoch C, Seifert K A, Huhndorf S, Robert V, Spouge J L, Levesque C A, Chen W (2012) Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proc Natl Acad Sci U S A** 109(16):6241-6.
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, John R (2012) PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. **J Appl Microbiol** 113:1.014-26.
- Shiraki Y, Hiruma M, Kano R, Miyamoto C, Ikeda S (2006) Case of *tinea capitis* caused by *Trichophyton mentagrophytes* (molecular type *Arthroderma benhamiae*): prevalence of new zoonotic fungal infection in Japan. **J Dermatol** 33(7): 504-6.
- Serrano P, Furtado C, Anes I, Costa I (2005) Micoses superficiais numa consulta de Dermatologia pediátrica – revisão de 3 anos. **Trab Soc Port Dermatol Venereol** 63(3):341-8.
- Stolmeier D A, Stratman H, McIntee T J, Stratman E J (2018) Utility of laboratory test result monitoring in patients taking oral terbinafine or griseofulvin for dermatophyte infections. **JAMA** 154(12):1.409-16.
- Sunita K, Bichitrananda S, Swati J (2021) Epidemiological and microbiological study of onychomycosis. **JCDR** 15(3):15-8.
- Talapko J, Juzbasic M, Mattijevic T, Pustijanc E, Bekic S, Kotris I, Skrlec I (2021) Candida albicans- The virulence factors and clinical manifestations of infection. **JFungi** 7(79):1-19.
- Tavares-Bello E, Sabino R, Simões H, Veríssimo C, Ussene E (2021) *Tinea corporis* caused by *Trichophyton Benhanmiae* transmitted by a dog: first case report in Portugal. **Gazmed** 8(1) jan-mar.
- Uhrlass S, Kruger C, Nenoff P (2015) *Microsporum canis*: Current data on the prevalence of the zoophilic dermatophyte in central Germany. **Hautarzt** 66:855-62.
- Vandersmissen G, Meuleman L, Tits G, Verhaeghe A, Peetermans W E (1996) Cutaneous cryptococcosis in corticosteroid-treated patients without Aids. **Acta Clinica Belgica** 51(2):111-7.

- Veasey J V, Muzy, G S C (2018) *Tinea capitis*: correlation of clinical presentations to agents identified in mycological culture. **An Bras Dermatol** 53(3):465-78.
- Verrier J, Monod M (2017) Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. **Mycopathologia** 182(1-2):193-202.
- Weeks J, Moser S S, Elewski B E (2003) Superficial cutaneous fungal infections. In: Dismukes W E, Pappas P G, Sobel J D. **Med Mycol** Oxford: Oxford University Press, 367-89.
- White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-22. Doi: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- Wiegand C, Mugisha P, Mulyowa G K, Elsner P, Hipler U, Graser Y, UhrlaB S, Nenoff P (2017) Identification of the causative dermatophyte of *tinea capitis* in children attending Mbarara Regional Referral Hospital in Uganda by PCR-ELISA and comparison with conventional mycological diagnostic methods. **Med Mycol** 55:660-8.
- Wisselink G J, van Zanten E, Kooistra-Smid A M (2011) Trapped in keratin; a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. **J Microbiol Methods** 85:62-6.
- Xiujiao X, Xu Ai'e (2005) Two cases of cutaneous cryptococcosis. **Mycoses** 48:238-41.
- Yoshii Y, Tamura K, Taniguchi T, Akiyama, Ishiyama I (1993) Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. **Nihon Hoigaku Zasshi** 47:323-9.
- Zhan P, Dukik K, Li D, Sun J, Stielow J B, Ende B G, Brankovics B, Menken S B J, Mei H, Bao W, Lv G, Liu W, Hoog G S (2018) Phylogeny of dermatophytes with genomic character evaluation of clinically distinct *Thichophyton rubum* and *T. violadeum*. **Stud Mycol** 89:153-75.
- Ziegler W, Lempert S, Goebeler M, Kolb-Maurer A (2016) *Tinea capitis*: Erregerspektrum und Epidemiologie im zeitlichen Wandel. **J Dtsch Dermatol Ges** 14:818-26.

ANEXOS**I - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA PESQUISA DE DERMATÓFITOS**
Adaptado de Brillowska-Dabrowska *et al.* (2007)**PROTOCOLO DE EXECUÇÃO**

1. Fragmentar finamente a amostra com um bisturi.
2. Adicionar 100 µl de tampão de extração (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM Tris-Cl, pH 9,5).

Reagentes necessários

- a. KCl 1 M.
- b. HCO₃ em pó, *molecular biology grade*.
- c. Trizma base em pó.

Preparação para 100 ml

Transferir 50 ml de H₂O destilada (dd) ultrapura para um gobelé de 200 ml. Dissolver 12,11 g de Trizma base com um agitador magnético. Adicionar 250 µl de KCl 1M. Transferir a solução para um balão volumétrico de 100 ml e perfazer até 90% do volume com H₂O ultrapura RNase e DNase-free. Ajustar o pH a 9,5 com HCl a 37%. Perfazer até 100 ml com H₂O ultrapura RNase e DNase-free.

3. Incubar por 10 min a 95 °C em bloco térmico.
4. Adicionar 100 µl de tampão anti-inibição (2% albumina sérica bovina, BSA) e vortexar durante 15 sec.

Reagentes necessários

- a. Solução stock de BSA a 20%.

Preparação para 10 ml

Transferir 9 ml de H₂O ultrapura RNase e DNase-free para uma proveta de 10 ml. Adicionar 1 ml de solução *stock* de BSA a 20% e homogeneizar.

5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min e recolher sobrenadante para novo tubo.

II - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE CULTURAS DE DERMATÓFITOS

Adaptado de Brillowska-Dabrowska *et al.* (2007)

PROTOCOLO DE EXECUÇÃO

Eliminação
da
agarose

1. Remover um fragmento de colônia com cerca de 20x20x20 mm. Retirar o máximo de agarose da base da colônia com um bisturi.
2. Seccionar o micélio e transferir os fragmentos para um tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Por cada 100 µl de micélio, adicionar 1 ml de H₂O dd e vortexar durante 15 sec.
4. Colocar o tubo em bloco térmico a 95 °C durante 10 min; vortexar durante 15 sec.
5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 min; desprezar o sobrenadante.
6. Adicionar 1 ml de H₂O dd e vortexar durante 15 sec.
7. Colocar o tubo em bloco térmico a 95 °C durante 5 min; vortexar durante 15 sec.
8. Centrifugar a 14.000 rpm durante 1 min e desprezar o sobrenadante.
9. Repetir os passos 6, 7 e 8.

Freeze-thaw

10. Incubar o tubo a -20 °C durante 4 min.
11. Incubar o tubo a temperatura ambiente durante 3 min.
12. Repetir os passos 10 e 11 duas vezes.

Lise celular

13. Adicionar 100 µl de tampão de extração (60 mM NaHCO₃, 250 mM KCl, 50 mM Tris-Cl, pH 9,5)
14. Incubar 10 min a 95 °C em bloco térmico.
15. Adicionar 100 µl de tampão anti-inibição (2% BSA) e vortexar durante 15 sec.
16. Centrifugar a 14.000 rpm durante 2 min e recolher sobrenadante para novo tubo.

III - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE DERMATÓFITOS A PARTIR DE AMOSTRAS CULTIVADAS EM MEIO LÍQUIDO COM 8 DIAS DE CULTIVO DE DNA DE DERMATÓFITOS

PROTOCOLO DE EXECUÇÃO

1. Cultivar amostras em 2 ml de Sabouraud líquido com cloranfenicol e cycloheximedi.
2. Incubar a 27 °C por 8 dias.
3. Ressuspender os *pellets* em 500 µl de lise *buffer* na temperatura ambiente por 10 min.
 - a. 400 mM Tris HCl pH 8
 - b. 60 mM EDTA pH 8
 - c. 150 mM NaCl
4. Adicionar 150 µl acetato de potássio pH 4,8 vortex e centrifugar 12.000 rpm 1 min.
5. Transferir o sobrenadante para um novo tubo com volume igual de álcool isopropano.
6. Centrifugar 12.000 rpm por 5 min, retirar o sobrenadante.
7. Lavar o *pellet* de DNA com álcool 70% 500 µl.
8. O *pellet* lavado é dissolvido em 50 µl TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) *buffer*.

IV - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO POR PCR DE DNA DE DERMATÓFITOS

PROTOCOLO DE EXECUÇÃO

Diluição do DNA

1. Homogeneizar a solução de DNA e quantificá-la utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000;
2. Diluir as soluções de DNA para uma concentração entre 50-100 ng/μl.
3. Num tubo Eppendorf de 1,5 ml, misturar os reagentes nas seguintes proporções para o número de reações a efetuar.

Preparação da *master mix*

COMPONENTE	VOLUME – 1 REAÇÃO
Água ultrapura	19 μl
SIGMA ReadyMix Taq PCR Reaction Mix <i>with</i> MgCl ₂	25 μl
<i>Primer forward</i>	2 μl
<i>Primer reverse</i>	2 μl
DNA template (≈50 ng/μl)	2 μl
VOLUME FINAL	50 μl

4. Definir os parâmetros da reação de PCR.

Programação do termociclador

PASSO	TEMPERATURA	TEMPO	Nº DE CICLOS
Desnaturação	95 °C	1'	34
Hibridação de <i>primers</i>	55 °C	1'	
Extensão	72 °C	1'	
Extensão final	72 °C	10'	1
<i>Hold</i>	4 °C		∞

5. Conservar os produtos de PCR a -20 °C.
6. Dissolver 1 g de agarose *electrophoresis-grade* em 50 ml de tampão TBE 1x frio; homogeneizar.
7. Aquecer a mistura no micro-ondas até a ebulição; homogeneizar.
8. Deixar arrefecer até a temperatura estar suportável ao tacto.
9. Na *hotte*, adicionar 2,5 μl de EtBr de uma solução a 10 mg/ml (concentração de EtBr no gel → 0,5 μg/ml); homogeneizar.
10. Na *hotte*, verter o gel lentamente para o molde; deixar solidificar.

Preparação do gel de agarose a 2,0%

Preparação das
amostras para a
eletroforese

11. Diluir 2 μ l do produto de PCR de cada amostra e dos controlos positivo e negativo em 8 μ l de H₂O ultrapura e misturar com 2 μ l de *gel-loading buffer*; homogeneizar.
12. Diluir 2 μ l de marcador de peso molecular **GRS 100 bp** em 3 μ l de H₂O e misturar com 2 μ l de *gel-loading buffer*; homogeneizar.

Preparação e
execução da
eletroforese

13. Encher a tina de eletroforese com tampão TBE 1x recém-preparado a partir da solução *stock*; colocar o gel de agarose na tina.
14. Carregar 7 μ l da mistura de marcador de peso molecular **GRS 100 bp** no primeiro poço do gel.
15. Carregar 12 μ l de cada amostra e dos controlos positivo e negativo nos poços seguintes.
16. Correr a eletroforese a 100 V durante 30 min.
17. Colocar o gel no transiluminador UV para visualizar os resultados.