

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da virulência *in vitro* de isolados clínicos e
ambientais de fungos dermatófitos**

Mário Mendes Bonci

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA *IN VITRO* DE ISOLADOS CLÍNICOS E
AMBIENTAIS DE FUNGOS DERMATÓFITOS**

MÁRIO MENDES BONCI

Sob a Orientação do Professor
Francisco de Assis Baroni

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
Abril de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B697a Bonci, Mário Mendes, 1989-
Avaliação da virulência in vitro de isolados
clínicos e ambientais de fungos dermatófitos / Mário
Mendes Bonci. - 2019.
69 f. : il.

Orientador: Francisco de Assis Baroni.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas),
2019.

1. Dermatofitose. 2. Dermatopatia. 3. Tinea. 4.
Patogenicidade. 5. Micologia ambiental. I. Baroni,
Francisco de Assis, 1958-, orient. II Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e
Ciências Clínicas) III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

MÁRIO MENDES BONCI

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26/04/2019



FRANCISCO DE ASSIS BARONI (Ph. D) UFRRJ
(presidente)



GISELA LARA DA COSTA (Ph. D) FIOCRUZ



SERGIO GASPAR DE CAMPOS (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

A minha Família que sempre incentiva e acredita no meu sonho da pesquisa e ensino em Medicina Veterinária.

A todos os Professores e Pesquisadores brasileiros que mesmo diante de tanta dificuldade dedicam parte de suas vidas a propagar o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai **Sebastião Luís Bonci**, minha mãe **Márcia Aparecida Mendes Ribeiro Bonci**, aos meus irmãos **João Luís Mendes Bonci** e **Camila Mendes Bonci**, meus avós **Darcisio Bonci**, **Ana Vieira Bonci** (*in memoriam*), **João Mendes Ribeiro Júnior**, **Ruth Mendes Ribeiro** (*in memoriam*) e a toda minha família. Vocês permitem que meus sonhos nunca sejam impossíveis.

Aos meus **amigos**, seja onde estiverem. Sempre ao meu lado em todos os momentos, no choro e nas risadas, fizeram a caminhada até aqui ser muito prazerosa. Estaremos sempre juntos.

À **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, que desde o primeiro momento em que vi, me encantou. Me acolheu e me formou o homem que sou hoje. Será sempre o local onde quero estar.

A todos os **animais**, que me cativaram desde a infância e despertaram o sonho de ser Médico Veterinário.

Ao **Prof. Francisco de Assis Baroni**, meu orientador neste projeto, sempre à disposição para ensinar e tornar nosso trabalho mais agradável. Muito obrigado por todos os ensinamentos e momentos, bons ou ruins, que tenhamos passado por esses 2 anos de pesquisa e outros anos de estágios, monitorias e residência. Foi, e é um exemplo para todos os alunos e também grande amigo.

Ao **Prof. Sergio Gaspar de Campos** e a **Prof^ª. Ângela Oliveira**, que durante todo o tempo que passei no DMIV, também despertaram a paixão pela microbiologia. É admirável o modo como encaram o trabalho e a dedicação que possuem para transmitir o conhecimento. Agradeço também, a todos os outros **Professores** e **Funcionários** do DMIV, cada um teve sua participação especial durante minha formação, e hoje vejo vocês como uma grande família da qual tenho orgulho de fazer parte.

Ao **Prof. Wagner de Souza Tassinari**, que muito solícito, auxiliou e ajudou nas análises estatísticas deste projeto.

Aos **pós-graduandos**, em especial **Mário Tatsuo Makita**, e **estagiários** do DMIV, que sempre estiveram à disposição para qualquer trabalho. Sem dúvida, quero vocês sempre próximos a mim, são pessoas muito especiais.

Aos residentes e ex-residentes **Daniel Santos Rabelo**, **Reinaldo Augusto Ferreira Victor**, **Dayanne Araújo de Melo**, **Mário Tatsuo Makita**, **Marisol Alvim Gomez**, **Águida Aparecida de Oliveira**, **Márcia Gardênia dos Santos Jansen** e **Daniel Paiva Barros de Abreu**, juntos ajudamos a construir um ambiente de trabalho muito bom e nos tornamos praticamente irmãos. Com muita paciência e trabalho chegamos onde estamos hoje e devo muito a vocês. Sempre seremos uma equipe!

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Obrigado a todos!

RESUMO

BONCI, Mário Mendes. **Avaliação da virulência *in vitro* de isolados clínicos e ambientais de fungos dermatófitos.** 2019. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Os dermatófitos constituem grupo de fungos que requerem queratina para crescimento, colonizando a pele e anexos de animais e pessoas. Embora não sejam patógenos obrigatórios, *Microsporum gypseum*, *M. canis* e *Trichophyton* spp. relacionam-se a infecções em animais, causando classicamente lesões circulares na pele. Embora as dermatofitoses por dermatófitos geofílicos ocorram em menor grau, *M. gypseum* é a principal espécie envolvida e estes quadros devem ser considerados. Dentre os fatores que fazem com que os dermatófitos, tenham capacidade de infecção para animais, destacam-se enzimas como DNase, gelatinase, lipase, queratinase, elastase e colagenase, que foram avaliadas neste trabalho. O hábito dos animais domésticos permanecerem em contato íntimo com a terra, em quintais, vias públicas e parques, justifica o estudo de sua patogenicidade e a diferenciação do perfil enzimático de isolados clínicos e ambientais de dermatófitos, o que pode colaborar para estratégias de controle e prevenção da dermatofitose. Nossa pesquisa teve como objetivos o isolamento clínico e ambiental de fungos dermatófitos, avaliando a produção de DNase, lipase, gelatinase, queratinase, elastase e colagenase, enzimas relacionadas à virulência dos mesmos e a comparação da capacidade de produção dessas enzimas relacionadas à patogenicidade entre as cepas clínicas e ambientais. As cepas ambientais foram obtidas através da técnica descrita por Vanbreuseghem (1952), que emprega pelos estéreis de equinos misturados ao solo umedecido, sendo utilizadas amostras de solo oriundas de diferentes locais do Brasil. As amostras clínicas foram oriundas de pelos e crostas de animais enviadas ao Serviço de Diagnóstico Microbiológico Veterinário/UFRRJ e semeadas em meio Mycosel®. A avaliação enzimática dos dermatófitos foi feita por leituras de absorbância em espectrofotômetro (colagenase, elastase e queratinase), formação de halo de degradação em placas (DNase e lipase) e liquefação em tubos (gelatinase). Dentre os 30 isolados clínicos estão *M. canis* (11), *M. gypseum* (7), *M. nanum* (2), *T. mentagrophytes* (4) e *Trichophyton* sp. (6). e dentre os 30 isolados ambientais estão *M. gypseum* (25), *M. nanum* (1) e *Trichophyton* sp. (4). Não houve diferença significativa estatisticamente na produção de queratinase, elastase, lipase e gelatinase entre os grupos de isolados clínicos e ambientais, sendo a maior parte dos fungos produtora de todas estas enzimas. Houve diferença significativa estatisticamente entre os grupos na produção de colagenase e DNase, com destaque para a ausência de produção de DNase pela maioria dos isolados ambientais. Assim, conclui-se que os dermatófitos oriundos de amostras clínicas e do solo são capazes de produzir queratinase, elastase, colagenase, DNase, lipase e gelatinase, enzimas relacionadas a diferentes etapas do processo da infecção dermatofítica em animais e pessoas.

Palavras-chave: Dermatofitose. Dermatopatia. *Tinea*. Patogenicidade. Micologia ambiental.

ABSTRACT

BONCI, Mário Mendes. **Evaluation of *in vitro* virulence of clinical and environmental isolates of dermatophyte fungi.** 2019. 56f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia Animal). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Dermatophytes are a fungi group that require keratin for growth, colonizing the skin and appendages of animals and people. Although not obligatory pathogens, *Microsporum gypseum*, *M. canis*, and *Trichophyton* spp. are related to infections in animals, usually associated with circular lesions on the skin. Dermatophytosis by geophilic dermatophytes occurs to a lesser extent, having *M. gypseum* as the main etiologic agent involved. Among the factors linked to the ability of dermatophytes to infect animals, we highlight enzymes such as DNase, gelatinase, lipase, keratinase, elastase, and collagenase, which were evaluated in the present study. The behavior of domestic animals to be in close contact with the ground, in backyards, public roads, and parks justify the study of geophilic dermatophytes virulence factors and the changes on the enzymatic production between clinical and environmental isolates, which may contribute to control strategies and prevention of dermatophytosis. The main goal of this study was to evaluate the production capacity of enzymes related to the pathogenicity of dermatophytes (DNase, lipase, gelatinase, keratinase, elastase, and collagenase), among environmental and clinical isolates. The environmental strains were obtained by the technique described by Vanbreuseghem (1952), which uses pre-sterilized equines hair mixed with the moist soil, using soil samples from different Brazilian locations. The clinical specimens were obtained from animal hairs and crusts sent to the Veterinary Microbiological Diagnostic Service / UFRRJ and isolated in Mycosel[®] medium. The enzymatic evaluation of the dermatophytes was performed by spectrophotometry absorbance (collagenase, elastase, and keratinase), enzymatic degradation in Petri dishes (DNase and lipase) and liquefaction in tubes (gelatinase). In a total of 30 clinical isolates, *M. canis* (11), *M. gypseum* (7), *M. nanum* (2), *T. mentagrophytes* (4) and *Trichophyton* sp. (6), were identified. Among the 30 environmental isolates are *M. gypseum* (25), *M. nanum* (1) and *Trichophyton* sp. (4). There was no statistically significant difference in the production of keratinase, elastase, lipase, and gelatinase between the clinical and environmental groups, with the synthesis of all the enzymes for most evaluated isolates. There was a statistically significant difference between the groups in the production of collagenase and DNase, with emphasis on the absence of DNase production by most of the environmental isolates. Thus, dermatophytes from clinical and soil samples are able to produce keratinase, elastase, collagenase, DNase, lipase and gelatinase, enzymes related to different stages of the dermatophytic infection in animals and humans.

Key words: Dermatophytosis. Dermatopathy. *Tinea*. Pathogenicity. Environmental mycology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dermatófitos	1
1.1.1 Dermatófitos zoofílicos de importância veterinária	2
1.1.2 Dermatófitos geofílicos de importância veterinária	3
1.2 Dermatofitose	3
1.3 Fatores de Virulência	6
1.4 Objetivos.....	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	9
2.1 Delineamento Experimental	9
2.2 Isolamento de Cepas Clínicas	9
2.3 Isolamento de Cepas Ambientais	10
2.4 Identificação Morfológica das Cepas	10
2.5 Preservação das Cepas.....	11
2.6 Avaliação da Atividade Enzimática	11
2.6.1 Queratinase	11
2.6.2 Elastase	12
2.6.3 Colagenase	12
2.6.4 DNase	13
2.6.5 Lipase	13
2.6.6 Gelatinase	13
2.6.4 Análise estatística.....	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Isolamento e Identificação de Cepas Clínicas	15
3.2 Isolamento e Identificação de Cepas Ambientais	22
3.3 Preservação das Cepas.....	25
3.4 Avaliação da Atividade Enzimática	26
3.4.1 Queratinase	26
3.4.2 Elastase	30
3.4.3 Colagenase	33
3.4.4 DNase	36
3.4.5 Lipase	40
3.4.6 Gelatinase	43

4 CONCLUSÕES	47
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
6 ANEXOS	56

LISTA DE ABREVIACOES E SIMBOLOS

%	percentagem;
®	marca registrada;
°C	graus Celsius;
µL	microlitro;
B.O.D.	demanda bioquímica de oxignio;
C	isolado clínico;
CaCl ₂	cloreto de cálcio;
DNA	desoxirribonuclease;
DTM	dermatophyte test medium
EDTA	cido etilenodiamino tetra-acético;
g	grama;
HCl	cido clorídrico;
KOH	hidróxido de potássio;
L	litro;
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight;
MgSO ₄	sulfato de magnésio;
mL	mililitro;
mM	milimolar;
mmol	milimol;
N	normal;
NaOH	hidróxido de sódio;
nm	nanmetro;
p	nível descritivo;
PCR	reação em cadeia da polimerase;
pH	potencial Hidrogeniônico;
rpm	rotações por minuto;
S	isolado ambiental;
SRD	sem raça definida;
U.C.	unidade de colagenase;
U.E.	unidade de elastase;
U.K	unidade de queratinase;
UFMT	Universidade Federal do Mato Grosso;
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco;
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;
UNESP	Universidade Estadual Paulista;
var.	variedade;
α	nível de significância;

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Detalhes da origem das cepas de dermatófitos isoladas de amostras clínicas.....	21
Tabela 2 – Detalhes da origem das cepas de dermatófitos isoladas de amostras de solo	25
Tabela 3 – Atividade da queratinase por isolados clínicos e ambientais	29
Tabela 4 – Estatística descritiva da atividade da queratinase por isolados clínicos e ambientais	29
Tabela 5 – Atividade da elastase por isolados clínicos e ambientais.....	32
Tabela 6 – Estatística descritiva da atividade da elastase por isolados clínicos e ambientais	32
Tabela 7 – Atividade da colagenase por isolados clínicos e ambientais.....	35
Tabela 8 – Estatística descritiva da atividade da colagenase por isolados clínicos e ambientais	35
Tabela 9 – Atividade da DNase por isolados clínicos e ambientais	38
Tabela 10 – Estatística descritiva da atividade da DNase por isolados clínicos e ambientais	38
Tabela 11 – Atividade da lipase por isolados clínicos e ambientais.....	42
Tabela 12 – Estatística descritiva da atividade da lipase por isolados clínicos e ambientais..	42
Tabela 13 – Atividade da gelatinase por isolados clínicos e ambientais	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas de <i>Microsporium gypseum</i> em câmara de Neubauer espelhada (200X)	11
Figura 2 – Estruturas de <i>Microsporium nanum</i> em câmara de Neubauer espelhada (200X)...	12
Figura 3 – Colônia de <i>Microsporium gypseum</i> após 15 dias de cultivo	16
Figura 4 – Macroconídios de <i>Microsporium gypseum</i> – Lactofenol-azul de algodão (400X).	16
Figura 5 – Colônia de <i>Microsporium canis</i> após 15 dias de cultivo.....	17
Figura 6 – Macroconídios de <i>Microsporium canis</i> – Lactofenol-azul de algodão (400X).....	17
Figura 7 – Colônia de <i>Microsporium nanum</i> após 15 dias de cultivo	18
Figura 8 – Macroconídios de <i>Microsporium nanum</i> – Lactofenol-azul de algodão (400X) ...	19
Figura 9 – Colônia de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> após 15 dias de cultivo	20
Figura 10 – Macroconídios e microconídios de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> – Lactofenol-azul de algodão (400X)	20
Figura 11 – Amostra de terra em técnica descrita por Vanbreuseghem (1952) – após 5 dias	22
Figura 12 – Amostra de terra em técnica descrita por Vanbreuseghem (1952) – após 15 dias	23
Figura 13 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – U.K., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente	30
Figura 14 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – U.E., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente	33
Figura 15 – Cepa de dermatófito crescendo em busca de substrato - elastina	33
Figura 16 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – U.C., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente	36
Figura 17 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – PzDNase, cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente	39
Figura 18 – Cepa de <i>Trichophyton</i> sp. produtora de DNase	39
Figura 19 – Cepa de <i>Trichophyton</i> sp. produtora de DNase	40
Figura 20 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – PzLipase, cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente	43
Figura 21 – Cepa de <i>Microsporium canis</i> produtora de lipase.....	43
Figura 22 – Diferentes padrões de ação da gelatinase produzida por dermatófitos	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dermatofitos

Os dermatofitos são fungos queratinofílicos e queratinolíticos e devido principalmente a estas características, são aptos a desenvolver a dermatofitose, zoonose altamente contagiosa, que é muito presente na rotina clínica da medicina veterinária e da medicina humana. Estes fungos estão dispersos no solo e também colonizam os anexos queratinizados dos seres vivos, mesmo sem causar doença (SIMPANYA, 2000; KONEMAN, 2008; PONTES et al., 2013).

Estão alocados na divisão Ascomycota, no sub-filo Pezizomycotina, do reino Fungi, pertencendo à classe dos Eurotiomycetes, ordem Onygenales e dentro da família Arthrodermataceae (DE HOOG et al., 2000).

Recentemente, nova classificação foi proposta aos micro-organismos deste grupo, situando-os em gêneros e complexos diferentes dos já conhecidos: *Arthroderma*, *Microsporium*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia* e *Lophophyton*. De importância veterinária, o gênero *Microsporium*, agora, possui três espécies, destacando-se *M. canis*, principal agente envolvido em infecções de cães e gatos. O gênero *Trichophyton* está dividido em 16 espécies, incluindo *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*. O gênero *Nannizzia* possui 9 espécies, englobando as novas classificações para *M. gypseum* e *M. nanum*, agora *N. gypsea* e *N. nana*, respectivamente. Além disso, dois novos gêneros foram incluídos no grupo, *Guarromyces* e *Paraphyton* (DE HOOG et al., 2017). Considerando as terminologias ainda utilizadas nos livros de clínica médica e veterinária, para efeitos práticos, neste trabalho estamos considerando classificação proposta até o momento.

Os microconídios e macroconídios são observados apenas em culturas e não em estado parasitário. A forma infectante é composta por hifas e arthroconídios, que se disseminam centrifugamente em direção a partes ainda queratinizadas da pele e anexos, em busca de substrato (QUINN et al., 2005; MARKEY et al. 2013).

Com base nos habitats, os fungos dermatofitos possuem espécies ainda divididas e classificadas de acordo com seu local de colonização preferencial em: zoofílicas, geofílicas e antropofílicas.

Os chamados zoofílicos incluem *M. canis*, *M. persicolor*, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. eriotrephon*, entre outros. Embora exista essa predisposição a hospedeiros específicos, as espécies também podem causar doenças em outros indivíduos (HUNGERFORD et al., 1998; QUINN et al., 2005). Há situações em que causam infecções subclínicas nos hospedeiros específicos, levando a quadros clínicos mais aparentes, em situações de imunossupressão (MARKEY et al., 2013).

Dermatofitos antropofílicos são comumente isolados do homem, podendo sofrer influência de fatores étnicos, ambientais, culturais, incluindo a vestimenta, entre outros. As principais espécies são *Epidermophyton floccosum*, *M. audouinii* e *T. rubrum*. Os fungos deste grupo possuem atividade seletiva por diferentes tipos de queratina (ZAITZ et al., 1998; QUINN et al., 2005). Costumam causar infecções leves, ou mesmo crônicas em pessoas, e são poucos os relatos de dermatofitos antropofílicos causando doenças em animais (TERRENI et al., 1985).

Entre os geofílicos, *M. gypseum* e *M. nanum* são os principais representantes e mais relacionados a lesões em animais. Estes micro-organismos são encontrados livres no solo e são distribuídos de acordo com as características físico-químicas da localidade, como pH, temperatura e umidade (JOKLIK et al., 1983; ZAITZ et al., 1998). Os animais, e mesmo os humanos, podem adquirir infecção por esses fungos, ao entrarem em contato direto com a terra, ou pelo contato com outro animal infectado (QUINN et al., 2005).

A espécie geofílica *M. gypseum* é especialmente descrita como causadora de dermatofitose em animais, estando relacionada, principalmente, a animais de produção, como

equinos e suínos, mas também cães e gatos (PASCOE E CONNO, 1974; CARLOTTI E BENSIGNOR, 1999). No Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, o diagnóstico da dermatofitose por *M. gypseum* em animais de companhia possui prevalência significativa quando comparada a outros estudos de casuística. Assim, justifica-se o estudo da virulência dos dermatófitos geofílicos, comparando sua patogenicidade com a dos isolados clínicos.

1.1.1 Dermatófitos zoofílicos de importância veterinária

Dentre as principais espécies de afinidade com animais estão *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. verrucosum*. Estudos apontam a prevalência de até 100% de isolados de *M. canis* mesmo em felinos assintomáticos (ALBANO et al., 2013; DE HOOG et al., 2000).

M. canis vem sendo descrito como o principal agente causador da dermatofitose em pacientes, principalmente cães e gatos, de hospitais veterinários de diversas localidades. Devido ao contato íntimo entre animais e tutores, este fungo também possui considerável frequência em infecções em pessoas, principalmente crianças (CAFARCHIA et al., 2006; ALLIZOND et al., 2015; BROSH-NISSIMOV et al., 2018).

Atualmente, são descritas duas variedades desta espécie: *M. canis* var. *equinum* e *M. canis* var. *distortum*. A primeira possui macroconídios similares ao *M. canis* propriamente dito, e é causa rara de dermatofitoses em equinos relatadas na Austrália, América do Norte e Europa, sendo ainda mais raras as infecções em outras espécies e pessoas. A segunda apresenta macroconídios de formato irregular e está relacionada à dermatofitose em cães, gatos e outros animais na América do Norte, Nova Zelândia e Austrália. Pesquisas relacionadas no Brasil ainda não diferenciaram estas variedades da espécie no país (DE HOOG et al., 2000; KIDD et al. 2017).

Com relação às características macromorfológicas e micromorfológicas de *M. canis*, as colônias do mesmo caracterizam-se por pigmentação amarelo-limão em seu reverso. A superfície é branca e o crescimento ocorre entre 3 e 5 dias. Microscopicamente observa-se macroconídios fusiformes de parede e septos espessos, apresentando entre 5 e 15 células. Os microconídios são piriformes a clavados, mas são raros (KONEMAN et al., 2008).

A espécie *Trichophyton mentagrophytes* faz parte de um Complexo, sendo *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* a variedade zoofílica prevalente em medicina veterinária. Possui vasta lista de hospedeiros, como roedores, principalmente porquinhos-da-Índia e ratos, cangurus, equinos e ovinos (DE HOOG et al., 2000).

As lesões causadas por esta espécie costumam causar reações inflamatórias mais severas do que as promovidas por outros dermatófitos, sendo comum seu envolvimento em apresentações atípicas da doença, como invasão de camadas mais profundas da pele (VERMOUT et al., 2008; CAFARCHIA et al. 2012).

Com relação às características macro e micromorfológicas desta espécie, as colônias podem apresentar aspecto algodinoso, ou pulverulento, tendo crescimento relativamente rápido, entre 3 e 5 dias. A porção reversa da colônia apresenta coloração amarela ou vermelha, tendendo ao marrom escuro. À microscopia observam-se microconídios esféricos, ocasionalmente clavados e de parede lisa, e em menor número, macroconídios alongados (formato de lápis), com paredes lisas e delgadas, possuindo em alguns casos apêndice terminal (DE HOOG et al., 2000; KONEMAN et al., 2008).

A espécie *Trichophyton verrucosum* está presente no gado bovino e ovino, principalmente em criações, e em humanos, costuma causar lesões altamente inflamatórias, geralmente em criadores que entram em contato com estes animais. Ao microscópio, as hifas são largas e irregulares, apresentando muitas terminações. Uma peculiaridade da espécie é a

formação de cadeias de clamidoconídios. Os macroconídios são raros, mas quando são produzidos apresentam formato de cauda. Nos cultivos, o aparecimento da colônia é lento, podendo demorar até 14 dias, sendo esta, pequena, aveludada, com centro elevado e de coloração branca a creme (DE HOOG et al., 2000; KONEMAN et al., 2008; KIDD et al., 2017).

1.1.2 Dermatofitos geofílicos de importância veterinária

Dentre as principais espécies de dermatofitos geofílicos que causam doenças em animais, encontram-se *Microsporium gypseum* e *M. nanum* (PASCOE E CONNOLE, 1974; CARLOTTI E BENSIGNOR, 1999; KONEMAN et al., 2008).

M. gypseum também faz parte de um Complexo e está amplamente disperso no solo com material queratinizado, sendo um dos principais agentes da dermatofitose em animais e humanos, principalmente naqueles indivíduos que tem contato direto com a terra, como animais de produção e trabalhadores rurais (REZAEI-MATEHKOLAEI et al. 2017).

O *M. gypseum* apresenta colônia branca, que se torna ocre a castanha e pulverulenta com o passar dos dias. Geralmente as partes pulverulentas são as mais ricas em macroconídios. A porção reversa da colônia costuma ter pigmento que varia do amarelo ao vermelho.

Seus macroconídios verrucosos e elipsoides aparecem, geralmente, em grande quantidade, sendo semelhantes aos de *M. canis*, mas com extremidades arredondadas e porção proximal truncada, com parede e septos delgados, tendo entre quatro e seis células. O crescimento ocorre entre 3 e 5 dias. Os microconídios podem estar presentes, mas estes não facilitam a identificação do fungo (DE HOOG et al., 2000; KONEMAN et al., 2008; KIDD et al., 2017).

M. nanum é, atualmente, classificado como geofílico e zoofílico, estando presente em solos de criatórios de suínos. As lesões nestes animais costumam ser crônicas e as reações inflamatórias brandas, sendo raros os relatos em outras espécies e humanos (KIDD et al., 2017).

Os macroconídios de *M. nanum* possuem a particularidade de serem equinulados, de paredes delgadas, arredondados em uma das extremidades e possuem entre uma e três células, sendo que na maioria das vezes verificamos apenas duas células. Microconídios clavados aparecem em algumas situações e auxiliam na diferenciação de outros fungos de micromorfologia semelhante, como as espécies de *Chrysosporium* (KIDD et al. 2017).

As colônias são de cor creme, planas, lisas a pulverulentas e os pigmentos estão presentes na maioria das vezes, variando de alaranjado escuro à vermelho escuro em seu reverso. Demoram entre 3 e 5 dias para se desenvolver (KONEMAN et al., 2008).

1.2 Dermatofitose

A dermatofitose é micose superficial de caráter zoonótico, que pode atuar em ambos os sentidos de transmissão, mesmo sendo raros os relatos de infecção de animais após o contato com humanos com dermatofitose. Embora as lesões tenham a tendência de se restringir à superfície cutânea, quadros de infecção dermatofítica subcutânea, principalmente em felinos da raça Persa e cães Yorkshire Terrier, são comumente relatados. Existem ainda casos de micetomas, rinite e estomatite relacionados à presença de dermatofitos (TERRENI et al., 1985; VERMOUT et al., 2008; MORIELLO et al., 2017; ZIGLIOLI et al., 2017).

Para o desenvolvimento da doença, diversos fatores podem ser levados em consideração, como: contato com material ou superfície infectante, frequência de exposição, presença de lesão traumática prévia, estresse, presença de outras enfermidades, umidade e temperatura do ambiente (MORIELLO et al., 2017).

São conhecidas três etapas na infecção dermatofítica: adesão, germinação e penetração no estrato córneo. A adesão dos arthroconídios, que são as formas infectantes dos dermatofitos,

à superfície leva até 12 horas após o primeiro contato com o fungo. Nesta etapa estão envolvidas subtilisinas, principalmente Sub3, encontradas como principal fator de virulência em modelo felino de infecção por *M. canis*. A Sub3 é protease altamente queratinolítica produzida por fungos. Ressalta-se que a produção dessas substâncias se inicia após duas horas do primeiro contato com os arthroconídios (TABART et al., 2007; MONODI, 2008; VERMOUT et al., 2008).

A etapa de germinação ocorre, em geral, após 24 horas do contato com o fungo. Consiste basicamente no desenvolvimento de hifas pelos arthroconínios e na fragmentação dessas hifas em novos arthroconídios, fechando-se assim, um ciclo que mantém a infecção dermatofítica no hospedeiro (VERMOUT et al., 2008).

A invasão do estrato córneo, propriamente dita, começa dentro de três dias. Sabe-se da produção de diversas endoproteases e serinas, como as fungolisinas e as subtilisinas, mas sabe-se pouco sobre a ação de outras enzimas, como lipase, gelatinase, DNase e elastase. Porém, a produção dessas substâncias nesta etapa da dermatofitose, evidencia seu papel na lise e absorção de constituintes da superfície córnea pelos dermatófitos (VERMOUT et al., 2008; URIBE E CARDONA-CASTRO, 2013).

O aparecimento de lesões acontece entre uma e três semanas após a adesão do fungo. Estas lesões são classicamente alopecias, arredondadas, podendo ter prurido, ou não, e as bordas podem conter pontos inflamatórios elevados, em alguns casos. O surgimento costuma ocorrer, principalmente, na face do animal, podendo ser lesões localizadas e únicas, mas que podem disseminar-se por todo o corpo, a exemplo do que ocorre em animais imunossuprimidos ou não tratados (MORIELLO et al., 2017).

As técnicas de diagnóstico da dermatofitose variam desde os métodos utilizados pelos médicos veterinários clínicos, como o uso da lâmpada de Wood e o uso do dermoscópico, aos exames laboratoriais, como cultura fúngica e reação em cadeia da polimerase (PCR). Na rotina dermatológica, a lâmpada de Wood indica, através da fluorescência dos pelos, as melhores áreas para coletar-se amostras para microscopia direta e cultura fúngica, áreas que podem não ser identificadas sem a utilização desta ferramenta. Ressalte-se ainda, que as crostas de lesões podem mascarar pelos infectados, recomendando-se a retirada destas antes do exame de fluorescência. Quando obtém-se resultados positivos no exame de lâmpada de Wood e na microscopia direta, o tratamento da dermatofitose pode ser iniciado, mesmo antes dos resultados da cultura fúngica serem fornecidos (NEWBURY & MORIELLO, 2014).

A microscopia direta dos pelos e crostas é realizada tanto pelos clínicos, quanto pelos microbiologistas. Tradicionalmente, utiliza-se tratamento das amostras com soluções clarificantes, KOH e NaOH, em concentrações de 15 a 20%, facilitando a visualização de arthroconídios e outras estruturas fúngicas (AHMADI et al., 2015). Outros examinadores recomendam a utilização de KOH na concentração de 10% misturado ao azul de metileno, destacando os arthroconídios e facilitando os exames (KHALED et al., 2015), e alguns substituem o azul de metileno por dimetilsulfóxido (DMSO), potencializando a ação clarificante do KOH (MIRANDA & SILVA, 2005). Newbury & Moriello (2014) recomendam a utilização de óleo mineral, descartando o uso de soluções clarificantes durante a microscopia direta dos pelos. Soluções de maior custo podem ser empregadas, como a utilização de agentes fluorescentes, como Calcofluor-white® e Blankophor® (FRYMUS et al., 2013).

Para muitos clínicos, quando a anamnese e os exames prévios levantam alta suspeita de dermatofitose, o resultado da cultura fúngica não é essencial para o início do tratamento (NEWBURY & MORIELLO, 2014). A cultura fúngica, no entanto, é o método mais barato e prático de obter-se a confirmação do agente envolvido na infecção. Para Frymus et al. (2013) a cultura em agar Sabouraud-dextrose ainda é o “método ouro” para diagnóstico das dermatofitoses, por tratar-se de técnica de boa sensibilidade e possibilitar identificar os gêneros e espécies. O isolamento também pode ser realizado em meios específicos para dermatófitos,

como DTM[®], sendo a identificação do fungo baseada em alterações na cor do meio de cultivo, prática comum em diagnóstico microbiológico veterinário. Alguns laboratórios utilizam meios seletivos para fungos patogênicos, como agar Mycobiotic[®] e Mycosel[®] (AHMADI et al., 2015).

Vale ressaltar que após desenvolvimento da cultura, deve-se realizar a microscopia das colônias, nunca baseando-se apenas em suas características macromorfológicas.

As colônias de *Microsporum* spp. apresentam crescimento mais rápido e, a formação de macroconídios em abundância facilita a identificação das espécies. Já as colônias de *Trichophyton* spp. possuem crescimento lento, acima de 7 dias. Estas são, em sua maioria, brancas, algodonosas a aveludadas, podendo produzir pigmentos, como verifica-se nos desenvolvimentos de *T. rubrum*. Os microconídios podem estar ausentes e os macroconídios podem ser raros. A observação das hifas e arranjos de clamidoconídios auxiliam, em alguns casos, na identificação do gênero (DE HOOG et al., 2000; KONEMAN et al., 2008).

Deve-se ter muita cautela na avaliação das colônias e na microscopia destas, já que muitos fungos dimórficos, também podem infectar tecidos cutâneos e possuir características semelhantes às dos dermatófitos. Além disso, fungos saprófitas não-patogênicos podem ser isolados das superfícies queratinizadas. O diagnóstico errôneo pode acarretar em complicações clínicas severas (KONEMAN et al., 2008).

Atualmente, técnicas avançadas tem sido utilizadas para o diagnóstico, como reação em cadeia da polimerase (PCR) e Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF), que utiliza espectrometria de massa para análise dos micro-organismos (ERHARD et al., 2007; BEIFUSS et al., 2011; KONDORI et al., 2013). Algumas destas técnicas possuem a vantagem de identificar os dermatófitos diretamente das amostras, como a PCR, em até 24 horas (BEIFUSS et al., 2011). No entanto, estas práticas ainda são pouco utilizadas na rotina de diagnóstico em medicina veterinária devido aos custos ainda elevados.

Pesquisas mais recentes tem utilizado a dermoscopia ou microscopia de epiluminescência para a caracterização de lesões de dermatófitos, tendo bons resultados no diagnóstico quando utilizado em conjunto com a cultura de dermatófitos (DONG et al., 2016).

Em animais imunocompetentes, as lesões causadas por dermatófitos costumam regredir espontaneamente, aproximadamente em 1 ou 3 meses, mesmo sem a utilização de fármacos (FRYMUS et al., 2013). O tratamento tópico é sempre necessário, pois é a única maneira de combater estruturas fúngicas presentes na superfície da pele e pelos, enquanto drogas sistêmicas atingem apenas os fungos nos folículos pilosos (MORIELLO, 2014).

O tratamento tópico baseia-se, na maioria dos casos, em shampoos compostos por miconazol, enilconazol, ou cetoconazol e clorexidina (NEWBURY et al., 2011; FRYMUS et al., 2013). Pesquisas mais recentes tem testado formulações tópicas de econazol e terbinafina no tratamento de dermatofitoses em gatos. A terbinafina destaca-se por não causar irritação na pele dos animais e por gerar resultados clínicos melhores do que os antifúngicos azólicos (IVASKIENE et al., 2016). Em animais de pelo longo e com infecções generalizadas, recomenda-se o corte dos pelos, facilitando a ação dos antifúngicos e diminuindo a disseminação de estruturas fúngicas para o ambiente, pessoas e outros animais (FRYMUS et al., 2013).

Sistemicamente, as drogas mais utilizadas são itraconazol, terbinafina, griseofulvina e cetoconazol (FRYMUS et al., 2013; NARDONI et al., 2013; MORIELLO, 2014). Os protocolos de tratamento por via oral variam entre 2 e 7 semanas, lembrando que essas drogas podem causar efeitos adversos nos animais e devem ser escolhidas de acordo com as particularidades de cada indivíduo (FRYMUS et al., 2013).

Visando casos severos, ou recorrentes de dermatofitose, foram desenvolvidas vacinas tanto para tratamento, quanto para a prevenção da doença. Os resultados quanto ao tratamento, porém, tem se mostrado melhores quando comparados à ação preventiva das vacinas, que ainda

é discutida por clínicos e pesquisadores (WESTHOFF et al., 2010; WESTHOFF et al., 2017). Westhoff et al. (2017) verificaram, em relação a vacinas inativadas de dermatófitos, a melhor terapia, não observando efeitos indesejáveis em pacientes tratados, e que foram posteriormente curados.

Devido ao elevado número de intolerância a alguns fármacos, ao alto custo de drogas no mercado e ao crescimento de produtos medicinais naturais, terapias alternativas para a dermatofitose tem sido estudadas. Dentre estas alternativas estão o própolis e componentes de alguns vegetais, como saponinas, alcalóides, taninos, quinonas, flavonóides, cumarinas e lignanas, que podem ser extraídos de araucárias e plantas do gênero *Baccharis*, por exemplo (LOPES et al., 2017). Capoci et al. (2015) alcançaram satisfatória ação fungicida e fungistática *in vitro* da citronela, sendo terapia promissora pra a dermatofitose em felinos e controle dos fungos no ambiente.

Quando o animal infectado vive sem companhia de outros animais, a desinfecção do ambiente é considerada desnecessária. Mas, no caso de surtos e grupos maiores de animais no mesmo ambiente, a desinfecção dos cômodos é necessária. A maioria dos desinfetantes vendidos como fungicidas não possui ação contra artroconídios de dermatófitos. Então recomenda-se a utilização de substâncias com enxofre, cloro e enilconazol para a limpeza de superfícies e controle do fungo no ambiente (MANCIANTI et al., 2003; FRYMUS et al., 2013).

1.3 Fatores de Virulência

A capacidade de se instalar em porções do tecido córneo, invadir esses tecidos e causar doença, está relacionada à produção de enzimas pelos dermatófitos. Naturalmente, pode haver variações na quantidade e especificidade das enzimas produzidas pelos fungos em diferentes situações, como: dermatófitos isolados do solo, dermatófitos de animais assintomáticos, dermatófitos de animais com dermatofitose e, mesmo, o estágio em que se encontra a doença (VERMOUT et al., 2008; SHARMA et al., 2012; URIBE E CARDONA-CASTRO, 2013).

Desta forma, diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de entender melhor a ação dessas enzimas, permitindo compreender melhor a patogenicidade dos dermatófitos e a patogenia da dermatofitose. Dentre as principais enzimas estudadas estão a queratinase, elastase, colagenase, lipase, gelatinase, e ainda com poucos dados, a DNase (VIANI et al., 2001; DA SILVA et al., 2005; GIUDICE et al., 2012; SHARIFZADEH et al., 2016).

Diversas técnicas para detecção e quantificação dessas enzimas foram desenvolvidas durante os anos. Dentre elas estão a formação de halos de degradação de substrato em placas de Petri, espectrofotometria, cromatografia, imunoensaios, entre outros. Nas pesquisas com dermatófitos, prevalecem o uso de espectrofotômetro e formação de halos de degradação em meios com substrato (HANKIN E ANAGNOSTAKIS, 1975; MUHSIN et al., 1997; GERCEKER et al., 2009; ELAVARASHI et al. 2017)

Uma das maneiras de se tentar inibir a dermatofitose seria por meio do controle da produção enzimática por parte dos fungos. Meevootison e Niederpruem (1979) já buscavam inibidores para os fatores de virulência de cepas de *Trichophyton rubrum*, obtendo resultados promissores *in vitro*. Este mesmo trabalho e Kotrajaras (1965) já reforçavam a influência direta do pH na ação dessas enzimas, sendo este um ponto chave para futuras pesquisas.

A enzima mais estudada em dermatófitos, certamente é a queratinase, sendo a queratina o substrato que define o grupo a que pertence estes fungos. A queratina é uma macromolécula insolúvel, com propriedades físico-químicas específicas, sendo componente de tecidos cornificados da epiderme, enquanto em porções ditas “vivas”, são classificadas como pré-queratinas, ou citoqueratinas (MONODI, 2008; VERMOUT et al., 2008).

A queratinase é enzima extracelular, que possui capacidade de degradar tanto queratinas macias, quanto queratinas duras. A maioria das queratinases produzidas por dermatófitos são

classificadas como metaloproteinasas, ou seja, dependem de íons metálicos para realizar catálise. O processo de ação desta enzima é dividido em duas etapas: a primeira consiste em alcalinizar a superfície queratinizada, permitindo o ambiente ótimo de atuação (desaminação) e a segunda é a queratinólise, onde a dissulfeto redutase e a queratinase trabalham em sinergismo, destruindo pontes dissulfeto e permitindo a liberação de moléculas de queratina, gerando conseqüentemente peptídeos e aminoácidos capazes de suprir as necessidades dos fungos (VERMOUT et al., 2008; CORTEZI, 2009). Assim, esta enzima tem fator primordial nos primeiros estágios da dermatofitose, permitindo a utilização de substrato e disseminação das estruturas fúngicas pela epiderme.

Outro constituinte da pele e de estruturas mais profundas do organismo, como vasos e ligamentos, é a elastina. A produção da elastase vem sendo relacionada à intensidade das reações inflamatórias e à existência de lesões em pessoas, coelhos e outros animais, principalmente em dermatofitose causada por *T. mentagrophytes*, considerada espécie forte produtora desta enzima. (RIPPON E VARADI, 1968; LÓPEZ-MARTÍNEZ et al., 1994; MUHSIN et al., 1997; CAFARCHIA et al., 2012).

Por esta relação com a resposta inflamatória e o desenvolvimento das lesões dermatofíticas, há muito tempo já se busca a possibilidade de inativação da elastase, como a utilização de agentes quelantes, alteração de pH e baixas concentrações de glicose. Na prática clínica, porém, esses métodos ainda não se mostram eficientes no controle da dermatofitose (MEEVOOTISOM E NIEDERPRUEM, 1979; APODACA E MCKERROW, 1990).

Outro substrato em potencial para os dermatófitos é o colágeno, um dos elementos de maior abundância nos organismos vivos, constituído da matriz extracelular e dando suporte às células. Existem diversos tipos de colágeno no organismo, sendo o do tipo I presente na pele, tendões e ossos, e, portanto, de maior importância em pesquisas sobre dermatófitos. São poucas as pesquisas que buscam a produção de collagenase por dermatófitos, sendo mais comuns os trabalhos com degradação da gelatina, produto da hidrólise parcial do colágeno (RIPPON, 1968; IBRAHIM-GRANET et al., 1996; VIANI et al., 2007).

A desoxirribonuclease (DNase) é a enzima responsável por clivar as ligações fosfodiéster presentes na molécula de DNA. Em humanos, a produção de DNase por dermatófitos é diretamente proporcional à intensidade de resposta inflamatória do paciente. Assim, em amostras provenientes de pacientes com dermatofitose crônica, espera-se altas taxas de atividade de DNase, enquanto em casos agudos de dermatofitose a expressão desta enzima tende a ser menor. Autores relatam dificuldades em testes de produção da DNase, principalmente durante a leitura de resultados e, por isso, novas técnicas como as que utilizam corridas em gel de agarose tem sido avaliadas para facilitar estas pesquisas (VIANI et al., 2001; GERCEKER et al., 2009; CAFARCHIA et al., 2012).

Outra enzima importante nos estágios iniciais da dermatofitose é a lipase. A superfície dos tecidos queratinizados possui camada lipídica, que deve ser rompida dando acesso direto à queratina. Assim, é uma das enzimas mais estudadas acerca da patogenicidade dos dermatófitos (HELLGREM E VINCENT, 1981; VIANI et al., 2001). Embora seja produzida por praticamente todos os dermatófitos, a lipase não é descrita como estando diretamente relacionada ao aparecimento das lesões, sendo produzida tanto por fungos isolados de animais sintomáticos, assintomáticos e também do ambiente (CAFARCHIA et al. 2012; ELAVARASHI et al., 2017).

A gelatinase também é enzima amplamente estudada em dermatófitos, sendo a gelatina produto da hidrólise parcial do colágeno, estando presente em grande quantidade no organismo de animais e pessoas. Esta proteína vem se mostrando como forte influenciador no desenvolvimento de dermatófitos, seja contribuindo para o crescimento em meios de cultura, seja inibindo quando presente em altas concentrações (JACOBS E LORINCZ, 1957). Sharma

et al. (2017) mostraram ser, os dermatófitos, fortes produtores de gelatinase frente a outros grupos de fungos, podendo esta, também ser uma enzima que caracteriza o grupo.

Desta forma, entender melhor a ação e a capacidade dos dermatófitos, de origem clínica ou ambientais, em produzir esses fatores de virulência pode ajudar a elucidar os mecanismos que estes fungos utilizam para causar dermatofitose em animais e pessoas, bem como compreender melhor sua sobrevivência em substratos livres no ambiente.

1.4 Objetivos

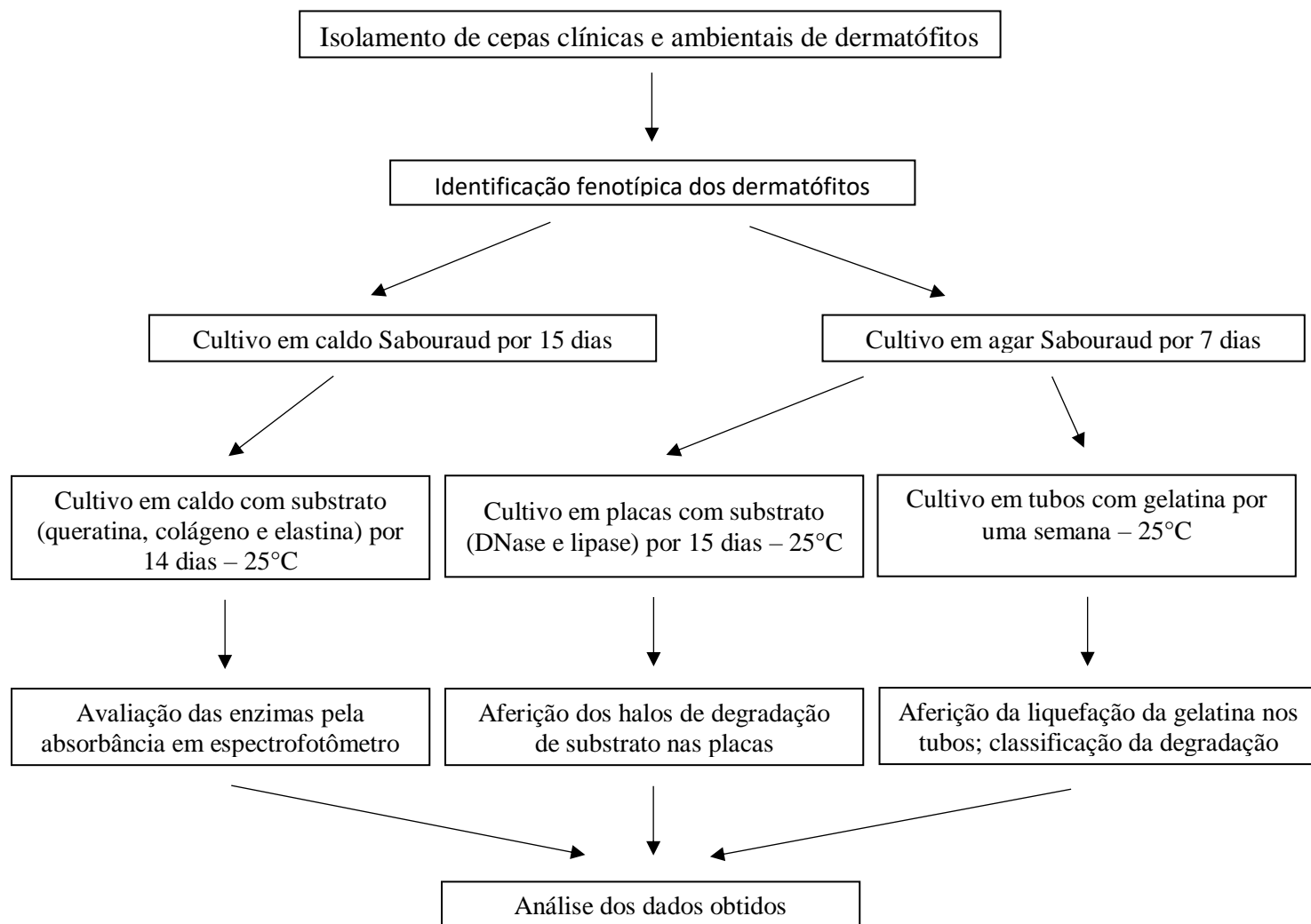
- Isolamento de dermatófitos de amostras clínicas e ambientais.

- Avaliar a produção de queratinase, elastase, colagenase, DNase, lipase e gelatinase, enzimas relacionadas à virulência de dermatófitos, pelos isolados clínicos e ambientais.

- Comparar a capacidade de produção de enzimas relacionadas à patogenicidade entre as cepas clínicas e ambientais.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento Experimental



2.2 Isolamento de Cepas Clínicas

Os pelos, coletados por avulsão, de animais com lesões de dermatofitose atendidos no Hospital Veterinário da UFRRJ, foram semeados em Agar seletivo para fungos patogênicos[®] (Merck[®]) e incubados a 25°C por até 15 dias. Foram utilizadas 30 amostras obtidas através do serviço de Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ. A coleta, armazenamento e transporte de amostras teve orientação através de palestra realizada pelos residentes do Diagnóstico Microbiológico Veterinário para os outros residentes do Hospital Veterinário da UFRRJ.

O projeto foi protocolado sob o CEUA nº 1395270617, sob a responsabilidade de Francisco de Assis Baroni e equipe; Mário Mendes Bonci; Mário Tatsuo Makita; Daniel Paiva Barros de Abreu; Sergio Gaspar de Campos; Márcia Gardênia dos Santos Jansen - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da

Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 24/11/2017.

2.3 Isolamento de Cepas Ambientais

Foram utilizadas 30 amostras ambientais de dermatófitos. Amostras de solo foram coletadas de diferentes localidades do Brasil, sendo armazenadas em sacos plásticos e enviadas pessoalmente, ou por serviço postal ao Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais do Instituto de Veterinária da UFRRJ. Os fungos foram obtidos de acordo com técnica descrita por Vanbreuseghem (1952), onde quantidade de terra suficiente foi colocada em placas de Petri de vidro até que seu fundo fosse completamente coberto. Posteriormente, pelos estéreis de equino foram misturados ao solo umedecido, servindo como iscas aos dermatófitos. O surgimento das colônias ocorreu em até 15 dias após o processamento inicial.

2.4 Identificação Morfológica das Cepas

Os fungos isolados, de origem clínica e ambiental, foram semeados em agar Fungobiotic® (Himedia®) contido em placas de Petri. As amostras de dermatófitos foram identificadas através da macromorfologia pela técnica da colônia gigante, onde o desenvolvimento de um inóculo central do fungo na placa de Petri permite a observação completa das características da colônia, e por observação da micromorfologia, considerando-se formato dos macroconídios, número de células do mesmo, parede etc.

As colônias de *Micorsporum canis* foram identificadas pela pigmentação amarelo-limão em seu reverso. A superfície é branca e o crescimento ocorreu entre 3 e 5 dias. Microscopicamente, observou-se macroconídios fusiformes de parede e septos espessos, apresentando entre 5 e 15 células. Os microconídios são piriformes a clavados, mas são raros.

Trichophyton mentagrophytes foi identificado pela colônia de aspecto algodinoso, ou pulverulento, tendo crescimento relativamente rápido, entre 3 e 5 dias. A porção reversa da colônia apresenta coloração amarela ou vermelha, tendendo ao marrom escuro. À microscopia observou-se microconídios esféricos, ocasionalmente clavados e de parede lisa, e em menor número, macroconídios alongados (formato de lápis), com paredes lisas e delgadas, possuindo em alguns casos apêndice terminal.

Microsporium gypseum apresentou colônia branca, que se tornou ocre a castanha e pulverulenta com o passar dos dias, sendo a porção reversa de pigmento que varia do amarelo ao vermelho. Os macroconídios são verrucosos e elipsoides, geralmente, em grande quantidade, com extremidades arredondadas e porção proximal truncada, com parede e septos delgados, tendo entre quatro e seis células. O crescimento ocorre entre 3 e 5 dias. Os microconídios são raros.

M. nanum possui macroconídios equinulados, de paredes delgadas, arredondados em uma das extremidades e possuem entre uma e três células, sendo que na maioria das vezes verificamos apenas duas células. Microconídios clavados aparecem em algumas situações. As colônias demoraram entre 3 e 5 dias para se desenvolver e são de cor creme, planas, lisas a pulverulentas e os pigmentos variando de alaranjado escuro à vermelho escuro em seu reverso. (DE HOOG et al., 2000; KONEMAN et al., 2008; KIDD et al. 2017).

As colônias que apresentavam aspecto algodinoso a pulverulento, de superfície branca a creme e de pigmentos variados em seu reverso, com macroconídios e microconídios característicos do gênero *Trichophyton*, não permitindo distinção entre espécies, foram classificadas apenas como *Trichophyton* sp.

2.5 Preservação das Cepas

As amostras foram mantidas por repiques contínuos em tubos contendo agar Fungobiotic® (Himedia®) por todo o período de experimentos. As amostras permanecem na coleção em tubos com agar Fungobiotic® (Himedia®), para diminuir o surgimento de microorganismos contaminantes, acrescidos de óleo mineral (Proquimios®) para futuras análises.

2.6 Avaliação da Atividade Enzimática

2.6.1 Queratinase

Cada isolado de fungo dermatófito foi inoculado em 5 mL de caldo Sabouraud dextrose, sendo incubados a 25°C por 15 dias (Meio estático). Passado esse período, uma solução de 500 µL contendo 10⁶ estruturas fúngicas (contagem em câmara de Neubauer) (Figura 1 e Figura 2) foi transferida para 50 mL de meio com queratina oriunda de chifre bovino (adição em 1L de água destilada: 6g de MgSO₄; 1 mL de Protovit®; 0,111g de CaCl₂; 3g de chifre bovino em pó) (SIESENOP & BÖHM, 1995), sendo esta a fonte exclusiva de nitrogênio e carbono, estimulando, desta forma, a produção de queratinase. As cepas permaneceram incubadas a 25°C por 14 dias na ausência de luz (Meio estático).

Após este período, o sobrenadante dos tubos foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, e para 1 mL deste, foram adicionados 2 mL de solução (pH 8,0) 200 mM de tris-HCl, 100 mM de CaCl₂ e 10 mg de Keratin Azure (SIGMA®). A degradação da queratina foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm, após o material ser incubado por 24 horas em banho-Maria a 37°C (Meio estático) e novamente centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos (DA SILVA et al., 2005; VIANI et al., 2001).

Foi considerado como uma unidade de queratinase (UK), um incremento de 0,01 da leitura de absorbância em relação ao controle, constituído apenas da solução tampão e a Keratin Azure (SIGMA®) (APODACA et al., 1990).

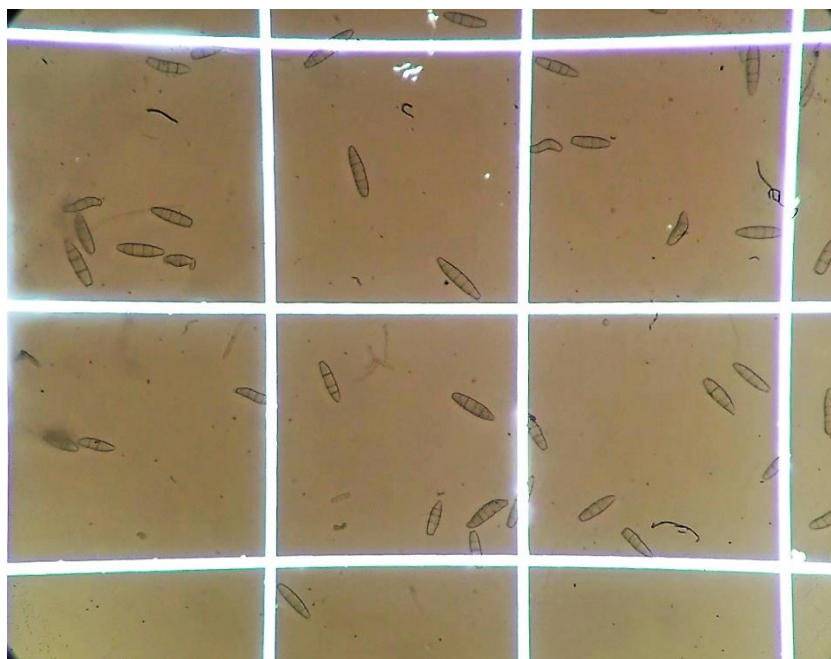


Figura 1 – Estruturas de *Microsporum gypseum* em câmara de Neubauer espelhada (200X)

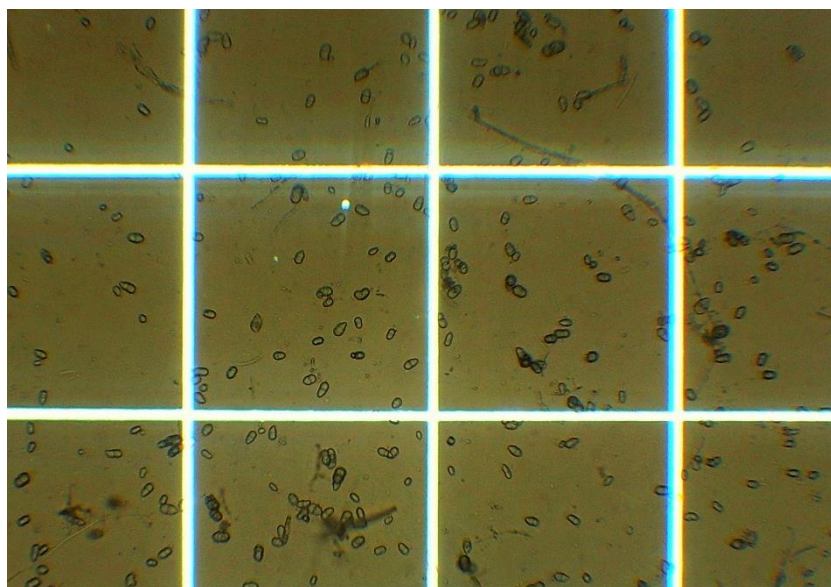


Figura 2 – Estruturas de *Microsporium nanum* em câmara de Neubauer espelhada (200X)

2.6.2 Elastase

Cada isolado de fungo dermatófito foi inoculado em 5 mL de caldo Sabouraud dextrose, sendo incubados a 25°C por 15 dias (Meio estático). Passado esse período, uma solução de 500 µL contendo 10⁶ estruturas fúngicas (contagem em câmara de Neubauer) foi transferida para 50 mL de meio contendo elastina (adição em 1L de água destilada: 6g de MgSO₄; 1mL de Protovit®; 0,111g de CaCl₂; 3g de elastina) (SIESENOP & BÖHM, 1995), sendo esta a fonte exclusiva de nitrogênio e carbono, estimulando, desta forma, a produção de elastase. As cepas permaneceram incubadas a 25°C por 14 dias na ausência de luz (Meio estático).

Após este período, o sobrenadante dos tubos foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, e para 2 mL deste, foram adicionados 2 mL de tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e 20 mg de Elastin Congo-Red (SIGMA®). Este conjunto foi incubado por 2 horas a 37°C (Meio estático) e novamente centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos (DA SILVA et al., 2005; VIANI et al., 2001).

A degradação da elastina foi quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 495 nm. Considerou-se como uma unidade de elastase (UE), um incremento de 0,1 da leitura de absorbância em relação ao controle (tampão fosfato 10 mM de pH 7,0 e 20 mg de Elastin Congo-Red (SIGMA®)) (RUST et al., 1994; KOTHARY et al., 1984).

2.6.3 Colagenase

Cada isolado de fungo dermatófito foi inoculado em 5 mL de caldo Sabouraud dextrose, sendo incubados a 25°C por 15 dias (Meio estático). Passado esse período, uma solução de 500 µL contendo 10⁶ estruturas fúngicas foi transferida para 50 mL de meio contendo colágeno tipo I (SIGMA®) (adição em 1L de água destilada: 6g de MgSO₄; 1mL de Protovit®; 0,111g de CaCl₂; 3g de colágeno tipo I (SIGMA®)) (SIESENOP & BÖHM, 1995), sendo esta a fonte exclusiva de nitrogênio e carbono, estimulando, desta forma, a produção de colagenase. As cepas permaneceram incubadas a 25°C por 14 dias na ausência de luz (Meio estático).

Após este período, o sobrenadante dos tubos foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos, e para 0,2 mL deste, foi adicionada uma suspensão de 0,2 mL contendo 1,0 mmol/L de peptídeo sintético [PZ-Pro-Leu-Gly-Pro-d-Arg], preparada com 0,1 mol/L de tampão tris-HCl (pH 7,2) e 1,6 mL de tampão Tris HCl. Este conjunto foi incubado por uma hora a 37°C

(Meio estático) e novamente centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos (DA SILVA et al., 2005; VIANI et al., 2001).

A degradação do peptídeo e a produção de PZ-Pro-Leu foram mensuradas em espectrofotômetro no comprimento de onda 320 nm. O incremento de 0,1 em absorvância em relação ao controle (0,4 mL do tampão utilizado e 0,2 mL do substrato) foi considerado uma unidade de colagenase (UC) (CHAKRABORTY E CHANDRA, 1986; SÖDERLING E PAUNIO, 1981).

2.6.4 DNase

Os isolados de dermatófitos foram cultivados por 7 dias em agar Sabouraud dextrose a 25°C, antes de serem transferidos para as placas de detecção de atividade da DNase.

O inóculo foi obtido com alça descartável estéril em volume de 1µL, sendo depositado no centro da placa de Petri contendo agar para teste de DNase (pH 7,3). As placas ficaram incubadas a 25°C por 15 dias.

A produção de DNase foi considerada positiva quando houve formação de halo de degradação ao redor da colônia. Nesta técnica, às vezes é necessária a adição de solução de ácido clorídrico 5N como revelador do halo.

A atividade enzimática (PzD) dos isolados foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato.

2.6.5 Lipase

Os isolados de dermatófitos foram cultivados por 7 dias em agar Sabouraud dextrose a 25°C, antes de serem transferidos para as placas de detecção de atividade da lipase.

O inóculo foi obtido com alça descartável estéril em volume de 1µL, sendo depositado no centro da placa de Petri contendo meio para detecção de lipase (adição em 1L de água destilada: 10g de peptona; 5g de NaCl; 0,1g de CaCl₂; 20g de agar; 10 mL de Tween 20 – pH 5,5). As placas ficaram incubadas a 25°C por 15 dias.

A produção de lipase foi considerada positiva quando houve formação de halo de degradação, ou precipitação de sais ao redor da colônia.

A atividade enzimática (PzL) dos isolados foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de degradação do substrato.

2.6.6 Gelatinase

Os isolados de dermatófitos foram cultivados por 7 dias em agar Sabouraud dextrose a 25°C, antes de serem transferidos para os tubos de detecção de atividade da gelatinase.

O inóculo foi obtido com alça descartável estéril em volume de 1µL, sendo depositado em tubo contendo 5 mL de meio para detecção de gelatinase (adição em 1L de água destilada: 5g de peptona; 3g de extrato de carne; 120g de gelatina – pH 7,1). Os tubos ficaram incubados a 25°C por uma semana.

A produção de gelatinase foi considerada positiva quando houve liquefação do meio contendo substrato. Após o período de incubação, os tubos foram colocados em temperatura de refrigeração por dez minutos para evitar leituras positivas falsas e um isolado de *Staphylococcus aureus* foi utilizado como controle positivo.

2.6.7 Análise estatística

Para a análise descritiva quantitativa e qualitativa dos dados sobre produção de enzimas pelos dermatófitos, foi utilizado o software BioEstat 5.0, bem como para obter os gráficos de distribuição do tipo Box-Plot com médias e desvios. A normalidade dos dados foi aferida pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as enzimas com variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$) e para variáveis qualitativas o teste binomial para duas proporções ($\alpha=0,05$).

*As fórmulas de meios de cultura e soluções estão no Anexo A.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Isolamento e Identificação de Cepas Clínicas

Como mostra a Tabela 1, o gênero *Microsporium* (20/30-66,66%) prevaleceu nos isolamentos clínicos de animais quando comparado ao gênero *Trichophyton* (10/30-33,33%). A espécie *Microsporium canis* (11/30-36,66%) foi a prevalente, seguindo a tendência de outras casuísticas, como a de Proverbio et al. (2014), que isolaram *M. canis* de 86,7% de 15 felinos de rua com dermatofitose. Em estudo realizado na UNESP de Botucatu, no estado de São Paulo, por Palumbo et al. (2010), com 136 animais (cães e gatos) com dermatofitose, 94,1% das culturas foram positivas para *Microsporium* spp., sendo 79,7% destes isolados, correspondentes a *M. canis*. Neves et al. (2011) isolaram *M. canis* de 96,78% de 279 animais com dermatofitose, todos pacientes atendidos no Hospital Veterinário da UFMT.

Allizond et al. (2015) isolaram dermatófitos de animais com sinais clínicos de dermatofitose na cidade de Turim na Itália, obtendo dados semelhantes aos de nosso trabalho, onde também prevaleceu *M. canis*, seguido por *Microsporium gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Este trabalho realizado na Itália ainda revela considerável presença de isolamentos de fungos considerados saprófitas, como *Alternaria* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* spp., entre outros. O crescimento rápido destes fungos, quando comparado aos dermatófitos, pode prejudicar o diagnóstico da dermatofitose na cultura fúngica, pois estes saprófitas tendem a tomar toda a superfície do meio de cultura, dificultando o desenvolvimento dos dermatófitos, ou prejudicando a visualização de colônias pelo examinador.

Embora ocorram variações consideráveis na prevalência, o gênero *Microsporium*, e especificamente *M. canis*, mostra-se como o principal agente da dermatofitose nos animais de companhia, de acordo com estes estudos e com o nosso.

Em outro estudo realizado por Cardoso et al. (2011) no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte do Paraná, a dermatofitose foi uma das dermatopatias mais frequentes, sendo todas causadas por *M. canis* e *M. gypseum*. Dentre os fatores que podem contribuir para a alta taxa de diagnósticos de dermatofitose por *M. canis* e *M. gypseum*, está o fato dessas espécies serem facilmente identificadas na cultura fúngica, seja por características macro, ou micromorfológicas, onde aspectos bem característicos como pigmentos de colônias e formato de macroconídios, bem como o fato destes elementos, na maioria das vezes, estarem sempre presentes (Figura 3, Figura 4, Figura 5 e Figura 6).

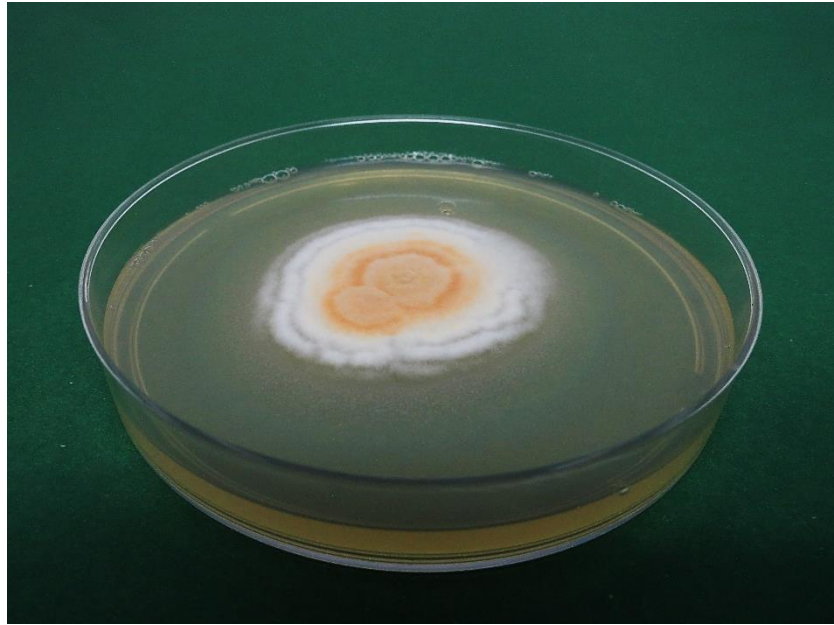


Figura 3 – Colônia de *Microsporium gypseum* após 15 dias de cultivo

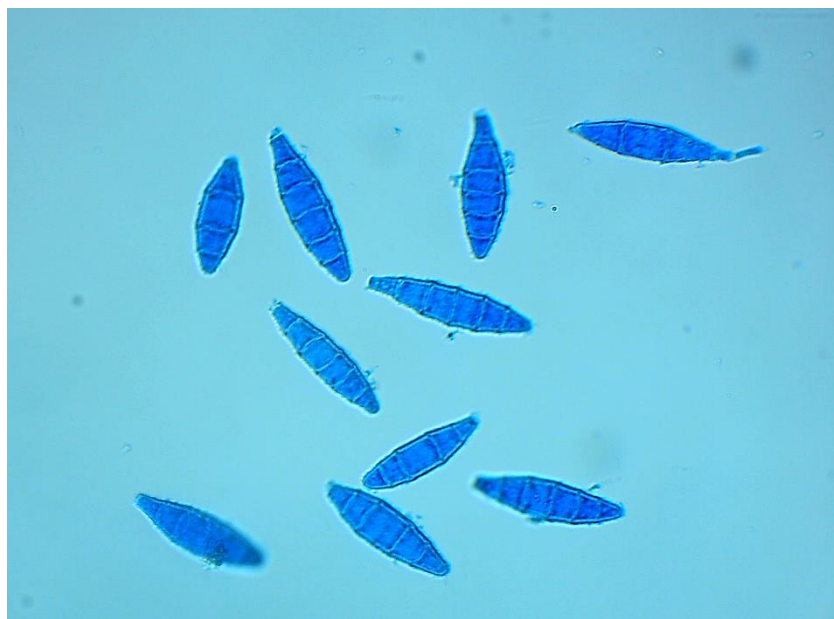


Figura 4 – Macroconídios de *Microsporium gypseum* –
Lactofenol-azul de algodão (400X)

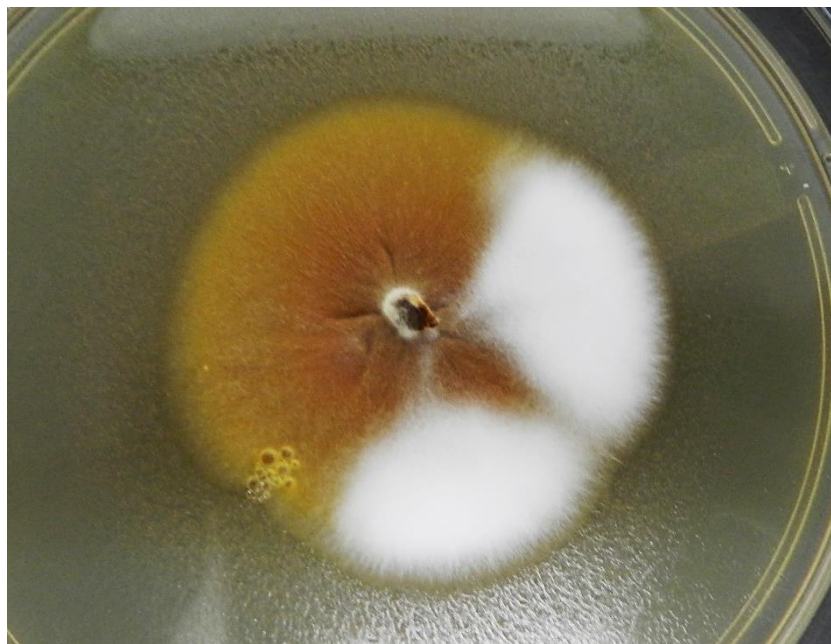


Figura 5 – Colônia de *Microsporium canis* após 15 dias de cultivo



Figura 6 – Macroconídios de *Microsporium canis* – Lactofenol-azul de algodão (400X)

Outro fator a ser considerado no alto índice de isolamento de *M. canis*, é o fato desta espécie ser carregada por animais sem sinais clínicos da dermatofitose, podendo gerar laudos falso-positivos para dermatofitose por esta espécie. Isto significa que em muitas situações esta espécie pode estar presente junto aos pelos e ser isolada nos exames laboratoriais sem que esteja envolvida propriamente no processo clínico. Na UFMT, Lima et al. (2016) analisaram amostras de 50 gatos clinicamente saudáveis, isolando *Microsporium* spp. de 18% dos animais. Ferreira et al. (2014) avaliaram a presença de fungos em gatos sem dermatoses em Porto Alegre-RS, e *M. canis* foi o dermatófito mais isolado, seguido por *M. gypseum*. Ilhan et al. (2016) avaliaram a presença de dermatófitos em gatos da raça Van, na Turquia, sendo *T. terrestre* o fungo mais isolado, seguido por *M. gypseum*, *M. nanum* e *T. mentagrophytes*, não sendo isoladas colônias de *M. canis*. Neste estudo indica-se as características dos felinos da raça, clima, e solo para justificar a ausência de *M. canis* na casuística. Embora possa ser encontrado em muitos animais

assintomáticos para dermatofitose, fatores ambientais e dos hospedeiros também devem ser levados em consideração durante a interpretação do exame micológico.

Embora seja espécie geofílica, a considerável presença do *Microsporum gypseum* (7/30-23,33%) em nossa pesquisa evidencia a importância clínica que esta espécie possui na medicina veterinária. Nardoni et al. (2013) concordam, em seus dados, com a prevalência baixa, mas sempre presente de casos de dermatofitose por *M. gypseum* em animais de companhia. Pascoe e Connole (1974), já associavam o contato íntimo de equinos com solos arenosos da Austrália e com os altos índices de dermatofitose causadas por este fungo no país. A característica arenosa do solo, o clima com ventos que produz a dispersão de poeira, e grande quantidade de criações animais em ambientes rurais, podem explicar o elevado número de isolados de *M. gypseum* na UFRRJ, no município de Seropédica-RJ, onde foi realizado nosso estudo. O contato direto com a terra facilita a adesão do fungo ao hospedeiro, o que pode tornar os animais de nossa região mais susceptíveis à dermatofitose por esta espécie.

Outra espécie presente, embora em menor número, em nosso trabalho é *Microsporum nanum* (2/30-6,66%) (Figura 7 e Figura 8), que se mostra ausente na maioria das casuísticas publicadas. Assim como *M. gypseum*, esta espécie também está relacionada ao solo, e por isso sua presença pode ser justificada nesses casos de dermatofitose em nossa região.



Figura 7 – Colônia de *Microsporum nanum* após 15 dias de cultivo



Figura 8 – Macroconídios de *Microsporium nanum* – Lactofenol-azul de algodão (400X)

A identificação das espécies do gênero *Trichophyton* torna-se difícil, ou demorada no diagnóstico microbiológico, pois na maioria das vezes estes dermatófitos produzem apenas estruturas comuns a outros grupos de fungos, não permitindo sua distinção em nível de espécie, ou mesmo de gênero, o que pode levar a falsos resultados negativos de cultura micológica para dermatofitose. Dabas et al. (2017) realizaram a identificação de dermatófitos de pacientes humanos de Nova Déli, na Índia, utilizando o isolamento em meio de cultura e posteriormente a identificação pela técnica da PCR. Seus resultados mostraram maior capacidade das técnicas moleculares em identificar as dermatofitoses causadas por *Trichophyton* spp. Todas as culturas identificadas macro e microscopicamente como *T. mentagrophytes*, foram posteriormente identificadas como sendo *T. interdigitale* (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*). *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. violaceum*, entre outros, também foram identificados pela PCR pelos autores indianos.

Por não fazer parte ainda da rotina do diagnóstico da dermatofitose em animais, a falta de técnicas moleculares pode levar a essa menor ocorrência do gênero *Trichophyton* nas casuísticas da medicina veterinária.

Em levantamento da casuística de dermatofitose em animais de companhia realizado na Índia por Debnath et al. (2014), todos os isolados foram classificados como *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, dados semelhantes ao de nosso trabalho, onde a identificação foi feita apenas fenotipicamente. Então, existe grande possibilidade de que técnicas moleculares possam levar a diferentes resultados em casuísticas realizadas apenas por identificações fenotípicas dos fungos.

O relevante número de isolados de *Trichophyton mentagrophytes* (Figura 9 e Figura 10) e *Trichophyton verrucosum* em estudos de casuística pode ocorrer pelo mesmo motivo da alta frequência das espécies de *Microsporium*, que é a produção de macro e microconídeos característicos, ou de outras estruturas peculiares, como clamidoconídios dispostos em cadeias. Em estudo mencionado anteriormente neste texto, Palumbo et al. (2010) identificaram apenas uma amostra de *Trichophyton mentagrophytes*, sendo os outros sete isolados de *Trichophyton* classificados apenas em nível de gênero. Esta pesquisa possivelmente também esbarrou nos mesmos obstáculos que tivemos durante nossa identificação fenotípica, onde seis dos dez isolados de *Trichophyton* foram classificados como *Trichophyton* sp.

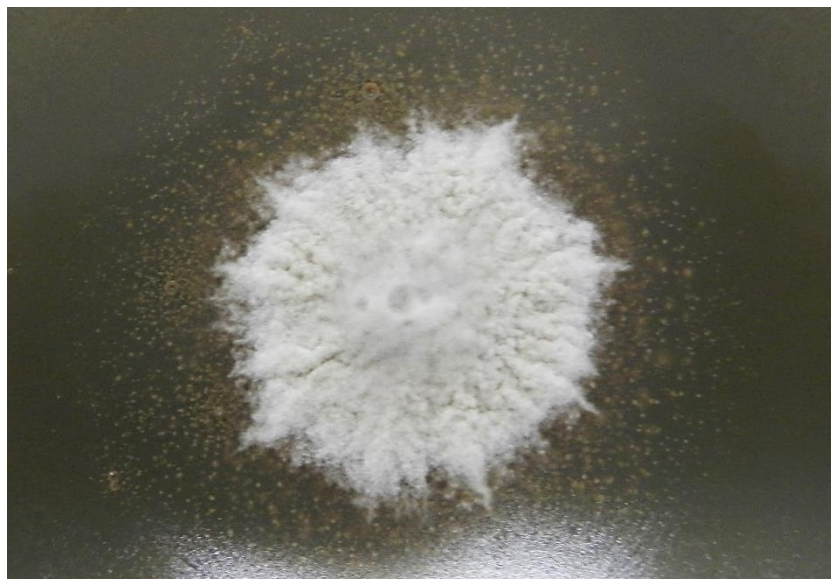


Figura 9 – Colônia de *Trichophyton mentagrophytes* após 15 dias de cultivo



Figura 10 – Macroconídios e microconídios de *Trichophyton mentagrophytes* – Lactofenol-azul de algodão (400X)

O cultivo de pelos e raspados de pele em Agar seletivo para fungos patogênicos® (Merck®) mostrou-se eficiente no isolamento de dermatófitos pelo Serviço de Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ. Embora possa requerer maior período para o diagnóstico, e possa haver dificuldades na identificação das espécies, esta técnica ainda é confiável e relativamente barata para o diagnóstico da dermatofitose em animais.

Alguns fatores podem prejudicar o isolamento dos dermatófitos, como coleta de amostra em local inadequado, sendo recomendável a avulsão de pelos e raspados nas bordas das lesões, onde há maior probabilidade da ocorrência de estruturas fúngicas viáveis. A quantidade da amostra também é fator a ser considerado, sendo o ideal uma quantidade suficiente para realização da microscopia direta e para cultura micológica, ou seja, quanto maior o volume de pelos e raspados, maior é a chance de detecção do dermatófito. O uso prévio de antifúngicos pelo paciente também pode inibir o desenvolvimento *in vitro* dos dermatófitos, sendo

recomendada a coleta 15 dias após tratamentos tópicos e até 30 dias após tratamentos sistêmicos (MORIELLO et al. 2017). O Serviço de Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ e os outros serviços do Programa de Residência do Hospital Veterinário da UFRRJ estão sempre se atualizando e prezam pela excelência no trabalho, levando a coletas e processamentos adequados das amostras dos animais.

Além das técnicas que envolvem a PCR para a identificação da espécie, a espectrometria de massa ou identificação proteômica tem sido utilizado para essa classificação. Erhard et al. 2008 utilizaram o MALDI-TOF para chegar à espécie de isolados de dermatófitos em humanos e obtiveram resultados confiáveis quando comparados à PCR, indicando estas técnicas para uso em rotina laboratorial. Embora ainda tenha altos custos, estas técnicas de maior confiabilidade tendem a fazer parte do diagnóstico veterinário, sendo a PCR já presente, e acredita-se que em um futuro próximo, o MALDI-TOF.

Tabela 1 – Detalhes da origem das cepas de dermatófitos isoladas de amostras clínicas

Amostra	Espécie	Dados das amostras clínicas				Isolado
		Raça	Sexo	Idade	M.D.	
C1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Pinscher	F	1 ano	-	<i>Microsporum canis</i>
C2	<i>Felis catus</i>	SRD	M	1 ano	-	<i>Microsporum canis</i>
C3	<i>Felis catus</i>	Persa	M	7 meses	+	<i>Microsporum canis</i>
C4	<i>Felis catus</i>	SRD	M	3 meses	-	<i>Microsporum canis</i>
C5	<i>Canis lupus familiaris</i>	Pug	F	1 ano	-	<i>Microsporum canis</i>
C6	<i>Felis catus</i>	SRD	M	5 anos	-	<i>Microsporum canis</i>
C7	<i>Felis catus</i>	SRD	F	1 mês	-	<i>Microsporum canis</i>
C8	<i>Canis lupus familiaris</i>	Chow-chow	M	1 mês	+	<i>Microsporum canis</i>
C9	<i>Felis catus</i>	SRD	M	2 anos	+	<i>Microsporum canis</i>
C10	<i>Felis catus</i>	SRD	M	3 meses	+	<i>Microsporum canis</i>
C11	<i>Felis catus</i>	SRD	M	3 anos	-	<i>Microsporum canis</i>
C12	<i>Canis lupus familiaris</i>	Beagle	F	2 anos	+	<i>Microsporum gypseum</i>
C13	<i>Canis lupus familiaris</i>	Dálmata	M	8 anos	-	<i>Microsporum gypseum</i>
C14	<i>Canis lupus familiaris</i>	Dálmata	M	8 anos	-	<i>Microsporum gypseum</i>
C15	<i>Felis catus</i>	SRD	M	3 anos	-	<i>Microsporum gypseum</i>
C16	<i>Felis catus</i>	SRD	M	6 anos	+	<i>Microsporum gypseum</i>
C17	<i>Canis lupus familiaris</i>	Dachsund	M	13 anos	-	<i>Microsporum gypseum</i>
C18	<i>Canis lupus familiaris</i>	Pit Bull	M	2 anos	+	<i>Microsporum gypseum</i>
C19	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	F	5 anos	-	<i>Microsporum nanum</i>
C20	<i>Canis lupus familiaris</i>	Shih-Tzu	F	5 anos	-	<i>Microsporum nanum</i>
C21	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Nova Zelândia	M	-	+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
C22	<i>Canis lupus familiaris</i>	Yorkshire	M	3 anos	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
C23	<i>Canis lupus familiaris</i>	Yorkshire	M	7 anos	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
C24	<i>Cavia porcellus</i>	-	M	2 anos	-	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
C25	<i>Canis lupus familiaris</i>	Pit Bull	F	5 anos	+	<i>Trichophyton</i> sp.
C26	<i>Felis catus</i>	SRD	F	-	+	<i>Trichophyton</i> sp.
C27	<i>Canis lupus familiaris</i>	Yorkshire	M	9 anos	-	<i>Trichophyton</i> sp.
C28	<i>Felis catus</i>	Exótico	F	5 meses	-	<i>Trichophyton</i> sp.
C29	<i>Canis lupus familiaris</i>	SRD	F	3 meses	-	<i>Trichophyton</i> sp.
C30	<i>Felis catus</i>	Persa	F	1 ano	-	<i>Trichophyton</i> sp.

*C1: isolado clínico número 1; SRD: animal sem raça definida; F: fêmea; M: macho; M.D.: microscopia direta; +: positivo; -: negativo.

3.2 Isolamento e Identificação de Cepas Ambientais

Durante nosso estudo foram colhidas 34 amostras de solo, sendo que de quatro não foram isolados fungos dermatófitos, são elas: Búzios-RJ (amostra 4), Campo Grande-MS, Fortaleza-CE e Brasília-DF (Parque da cidade). Os dados dos dermatófitos obtidos das outras amostras estão na Tabela 2.

O fato de não ocorrer o isolamento pode ser explicado por características do solo, como baixa carga de material queratinizado, como justificado por Deshmuck et al. (2016), que isolaram não só dermatófitos, mas outros fungos queratinofílicos em solo indiano, como *Keratinophyton* spp., *Ctenomyces* spp., entre outros. Propriedades como atividade de água, pH, e componentes estruturais também podem estar envolvidos na presença dos dermatófitos no solo e podem ser estudados para elucidar essa possível correlação, como feito por Pontes et al. (2013), que evidenciaram o desenvolvimento de dermatófitos em solo com ampla faixa de diferença de pH, com a predileção por solos ácidos por *M. gypseum*. Kornilowicz-Kowalska e Bohacz (2002) concluíram que o pH é um componente influenciador na presença de fungos queratinolíticos no solo.

A técnica descrita por Vanbreuseghem (1952) mostrou-se eficaz no isolamento dos fungos (Figura 11 e Figura 12). Fica a ressalva para o tipo de pelo equino utilizado para o isolamento, onde pelos claros dificultavam a visualização das colônias, que em geral, também possuem coloração clara. Assim, recomenda-se utilizar pelos escuros de equinos, sendo que em nosso trabalho foram todos cortados da crina dos animais. Algumas amostras eram de solos extremamente secos, que demandaram maior quantidade de água para umidificação após a primeira manipulação, mas os 30 isolados foram obtidos em no máximo 15 dias de cultivo. Kornilowicz-Kowalska e Bohacz (2002) utilizaram penas de galinha como isca para fungos queratinolíticos do solo, em uma adaptação da técnica de Vanbreuseghem (1952), e também obtiveram o desenvolvimento de dermatófitos.



Figura 11 – Amostra de terra em técnica descrita por Vanbreuseghem (1952) – após 5 dias



Figura 12 – Amostra de terra em técnica descrita por Vanbreuseghem (1952) – após 15 dias

Como esperado, o dermatófito prevalente em nossas amostras foi *Microsporum gypseum* (25/30-83,33%). Este foi o dermatófito mais encontrado em pesquisa feita em parque da Índia por Deshmuck et al. (2016), sendo os outros dermatófitos encontrados todos do gênero *Trichophyton*. Dados semelhantes foram obtidos por Lee et al. (2011) em pesquisa sobre fungos queratinofílicos em praias da Coreia do Sul, onde prevaleceu *M. gypseum* entre os dermatófitos. Giudice (2008) obteve taxa de isolamento de *M. gypseum* em 19,2% das 692 amostras de solo brasileiro analisadas em sua pesquisa, em que posteriormente avaliaria a produção enzimática dos fungos. Shaqra et al. (2012) isolaram fungos de regiões da Jordânia e também obtiveram *M. gypseum* como dermatófito prevalente, seguido por *T. mentagrophytes* e *T. terrestre*. Estes dados mostram a ampla distribuição no solo de *M. gypseum* por diversas regiões do mundo e corroboram com os resultados por nós verificados.

Porém, em pesquisa sobre distribuição de dermatófitos em solos de diferentes regiões do estado da Paraíba-Brasil, Pontes et al. (2013) obtiveram *Trichophyton terrestre* como o dermatófito prevalente, justificando esse fato por esta espécie estar presente principalmente em areias de praia, que fizeram parte de boa parcela das amostras colhidas em seu experimento.

Kornilowicz-Kowalska e Bohacz (2002) obtiveram *Trichophyton ajelloi* como dermatófito prevalente em sua pesquisa. Kidd et al. (2017) descrevem esse fungo como de pouca importância tanto na dermatofitose de humanos, como de animais. O fato de terem utilizado penas de galinhas em substituição aos pelos equinos pode explicar esse resultado tão diferente aos de outras pesquisas semelhantes, considerando as diferenças existentes entre as queratinas constituintes dos pelos e das penas.

Sharma et al. (2012) utilizaram cabelos e unhas de pessoas e penas de galinhas como isca, obtendo um maior número de espécies de dermatófitos quando comparado ao nosso trabalho, como *M. canis* e *Trichophyton rubrum*, sendo esta segunda uma espécie relacionada à dermatofitose em humanos. Estes dados corroboram com a correlação que pode haver entre o tipo de queratina que constitui a isca e a espécie de dermatófito isolada.

Em nosso experimento houve predileção pela coleta de solo em locais onde havia a presença de animais, sejam cães e gatos, ou animais de produção, como coelhos, equinos, bovinos e suínos. Esta correlação entre animais, solo e *M. gypseum* pode ser levada em consideração, dado ao fato deste fungo estar frequentemente presente na dermatofitose destes

animais e pelo fato de também ser isolado do solo onde esses animais residem. Em areias de praia, como no trabalho de Pontes et al. (2013), a presença desses animais é pouco frequente, o que pode influenciar nos dermatófitos isolados destes locais, sendo *T. terrestre* um fungo raramente envolvido na dermatofitose de animais. Um outro fator que pode influenciar é o fato das amostras de solo por nós trabalhadas sofrerem menos lixiviação que as areias de praia, pois estas estão em contato constante com a água, dependendo da movimentação das marés.

Corroborando com essa suposta presença de animais e a influência dos dermatófitos encontrados no ambiente, Mancianti et al. (2003) isolaram *Microsporum canis* de todas os ambientes onde habitavam felinos com dermatofitose. Além de causar a dermatofitose, o *M. canis* é também carregado por felinos assintomáticos, o que pode explicar essa disseminação do fungo no ambiente. Nenhuma amostra de *M. canis* foi recuperada de nossas amostras.

Apenas um isolado de *Microsporum nanum* foi obtido de amostra de solo em nossa pesquisa. A amostra colhida no município de Lavrinhas-SP estava em terreno de criatório de galinhas. Embora seja um fungo geofílico (o que torna normal seu isolamento do solo) que está relacionado à dermatofitose em suínos, a presença deste fungo pode ser justificada pela proximidade do galinheiro, onde ocorreu a coleta, à uma criação de porcos. São poucos os trabalhos onde houve o isolamento deste fungo tanto do solo, quanto de animais. Em sua pesquisa na Jordânia, Shaqra et al. (2012) obtiveram apenas 3 isolados de *M. nanum* entre 42 isolados de dermatófitos do solo, seguindo essa baixa tendência de recuperação desse fungo.

Rezaei-Matehkolaei et al. (2017) também confirmam essa correlação entre a presença de animais e o isolamento de fungos do solo, quando em sua pesquisa obtiveram maior taxa de isolamento de dermatófitos em solo de criatórios de animais quando comparado ao solo de áreas urbanas com baixa taxa populacional de animais.

Na identificação morfológica feita por nós, não ocorreram dificuldades na classificação dos fungos, já que *M. gypseum* e *M. nanum* apresentam macroconídios e colônias que facilitam a classificação. Já a identificação das espécies do gênero *Trichophyton* tiveram os mesmos entraves dos isolados clínicos, onde os fungos apresentaram apenas estruturas que permitiram sua classificação no nível máximo de gênero.

Porém, Rezaei-Matehkolaei et al. (2017) não consideram a identificação macro e micromorfológica como eficaz para classificar os dermatófitos do solo. A diferenciação entre *M. gypseum*, *M. incurvatum* e *M. fulvum* só foi realmente conseguida com o auxílio de técnicas moleculares de sequenciamento molecular, devido à semelhança de seus macroconídios. Assim, na identificação fenotípica, estes pesquisadores optaram por classificar esses dermatófitos como pertencentes ao Complexo *Microsporum gypseum*, onde após análises moleculares foram todos identificados como sendo *M. fulvum*, não havendo nenhum isolado de *M. gypseum* propriamente dito.

Desta forma, a utilização de técnicas moleculares pode alterar algumas classificações dos dermatófitos isolados do solo em nosso trabalho, bem como, novas classificações como as propostas por de Hoog et al. (2017), que sugerem novos gêneros e espécies para este grupo.

Embora a dimensão de nosso território dificulte a obtenção de amostras para avaliação mais concreta sobre as regiões brasileiras, nossas amostras visaram fornecer dados acerca dos dermatófitos de localidades mais distintas possíveis e com características de solo também diferentes. Mesmo supondo diferentes constituições e parâmetros físico-químicos das amostras do solo, houve pouca diferença nos isolados de dermatófitos obtidos, sendo *M. gypseum* presente em diversas regiões do Brasil, como Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Isto também mostra a capacidade do *M. gypseum* sobreviver nas mais diversas situações.

Tabela 2 – Detalhes da origem das cepas de dermatófitos isoladas de amostras de solo

Dados das amostras de solo		
Amostra	Local	Isolado
S1	Viçosa-MG	<i>Microsporum gypseum</i>
S2	São João Del Rei-MG	<i>Microsporum gypseum</i>
S3	Lavrinhas-SP (curral p/ bovinos)	<i>Microsporum gypseum</i>
S4	São Luís-MA	<i>Microsporum gypseum</i>
S5	Tibau do Sul-RN	<i>Microsporum gypseum</i>
S6	Seropédica-RJ (HVGA-UFRRJ)	<i>Microsporum gypseum</i>
S7	Seropédica-RJ (Suinocultura-UFRRJ)	<i>Microsporum gypseum</i>
S8	Seropédica-RJ (Cunicultura-CTUR I)	<i>Microsporum gypseum</i>
S9	Búzios-RJ (amostra 1)	<i>Microsporum gypseum</i>
S10	Búzios-RJ (amostra 2)	<i>Microsporum gypseum</i>
S11	Seropédica-RJ (Travessa 16)	<i>Microsporum gypseum</i>
S12	Lavrinhas-SP (Canil)	<i>Microsporum gypseum</i>
S13	Seropédica-RJ (Cunicultura-CTUR II)	<i>Microsporum gypseum</i>
S14	Seropédica-RJ (Caprinocultura-UFRRJ)	<i>Microsporum gypseum</i>
S15	Seropédica-RJ (Bovinocultura-UFRRJ)	<i>Microsporum gypseum</i>
S16	Manaus-AM (tribo Dessana)	<i>Microsporum gypseum</i>
S17	Jataí-GO	<i>Microsporum gypseum</i>
S18	Vitória-ES (amostra 1)	<i>Microsporum gypseum</i>
S19	Lavrinhas-SP (horta)	<i>Microsporum gypseum</i>
S20	Cruzeiro-SP (jardim)	<i>Microsporum gypseum</i>
S21	Vitória-ES (amostra 2)	<i>Microsporum gypseum</i>
S22	Vitória-ES (amostra 3)	<i>Microsporum gypseum</i>
S23	Vitória-ES (amostra 4)	<i>Microsporum gypseum</i>
S24	Brasília-DF (área residencial)	<i>Microsporum gypseum</i>
S25	Engenheiro Navarro-MG (urbano)	<i>Microsporum gypseum</i>
S26	Lavrinhas-SP (galinheiro)	<i>Microsporum nanum</i>
S27	Búzios-RJ (amostra 3)	<i>Trichophyton</i> sp.
S28	Rio de Janeiro-RJ (Padre Miguel)	<i>Trichophyton</i> sp.
S29	Seropédica-RJ (Cunicultura-UFRRJ)	<i>Trichophyton</i> sp.
S30	Engenheiro Navarro-MG (área rural)	<i>Trichophyton</i> sp.

*S1: isolado ambiental número 1.

3.3 Preservação das Cepas

Durante o período da nossa pesquisa, a preservação por repiques seriados em tubos contendo agar Fungobiotic® (Himedia®) se mostrou eficiente. Em média, os repiques eram feitos a cada 30 dias, sendo que sempre que possível esse período era estendido. O fato de tentar diminuir o número de repiques se dá pela perda de virulência pelo fungo quando mantido *in vitro* por muitos repiques em sequência, o que poderia influenciar nos dados obtidos em nosso trabalho.

De Moura Braz et al. (2009) utilizaram isolados de *Acremonium* spp. armazenados em óleo mineral entre 1964 e 2005 na micoteca da UFPE e obtiveram taxa de recuperação de 83,9% dos fungos, bem como, constataram a produção de enzimas como protease, gelatinase, entre outras, por todos eles.

O critério utilizado para a realização de um novo repique foi o ressecamento do meio de cultura nos tubos, o que consequentemente evidenciava a falta de substratos para suprir os dermatófitos. Para reduzir a velocidade deste ressecamento, frascos com água eram colocados dentro da estufa B.O.D. visando aumentar a umidade do ambiente.

Embora seja um método trabalhoso e de custo relativamente alto, estes repiques seriados mostraram-se eficientes durante a pesquisa feita em curto período de tempo (dois anos). Cavalcanti (2010) em avaliação da micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, concluiu que repiques seriados não são um método eficaz na manutenção de fungos por longos períodos de tempo, já que alteram características fenotípicas e a viabilidade das estruturas.

Para a manutenção por períodos prolongados, como feita após o término deste projeto, visando pesquisas futuras, os dermatófitos estão mantidos em tubos contendo agar Fungobiotic® (Himedia®) encobertos por óleo mineral, de onde se espera recuperar os fungos após meses de armazenamento. Visualmente, até o momento é clara a melhor manutenção do meio de cultura sob o óleo mineral, permanecendo praticamente intacto após a montagem da coleção micológica. Consequentemente, as colônias também permanecem praticamente intactas.

Buscando saber qual o período máximo que os dermatófitos permanecem viáveis sob óleo mineral, repiques serão feitos a cada dois meses para verificar a viabilidade dos fungos, para que então, a coleção seja completamente repicada e renovada.

Bezerra et al. (2018) em fornecimento de dados sobre a Micoteca da UFPE, um exemplo de coleção bem-sucedida, dizem que todas as amostras do acervo estão estocadas em óleo mineral e sempre em ao menos outro método, como liofilização, água destilada e ultracongelamento a -80°C.

Amorim et al. (2016) em estudo na micoteca da Universidade Estadual de Feira de Santana, consideraram o método de Castellani (água destilada) mais seguro em relação à conservação em óleo mineral, já que apresentou menor número de contaminações durante as recuperações. Mas, também ressaltam que em óleo mineral o fungo tende a permanecer viável por mais tempo.

Visando métodos economicamente viáveis e práticos, a preservação em água destilada se apresenta como um bom segundo método a ser utilizado na preservação de nossas amostras.

3.4 Avaliação da Atividade Enzimática

3.4.1 Queratinase

Como mostrado nas Tabelas 3 e 4, todos os isolados de dermatófitos, seja de origem clínica ou do solo, foram produtores de queratinase. Porém, não há diferença significativa estatisticamente na produção de queratinase entre os grupos analisados, sendo $p=0,4598$ ($\alpha=0,05$) (Mann-Whitney).

O fato da queratina ser um substrato capaz de ser degradado por todos os fungos do grupo dos dermatófitos explica esses dados. Além disso, há o fato do solo ser rico reservatório de queratina residual dos seres vivos, o que leva a essa semelhança entre a U.K. produzida pelos grupos de isolados clínicos e ambientais.

A queratina faz parte, principalmente, da camada mais superficial da epiderme, região avascularizada e que apresenta constante descamação. A presença dos dermatófitos com produção de queratinase no solo, também é explicada por estas características, mostrando que um hospedeiro vivo não é essencial para a sobrevivência do fungo e que este encontra substratos facilmente na natureza.

Algumas amostras tiveram a produção consideravelmente acima da média dos grupos, como C6, C12 e S1. Excluindo possíveis erros em técnicas laboratoriais, o teste enzimático foi

repetido com essas amostras, obtendo-se novamente esses mesmos dados díspares. Isto mostra o alto potencial de produção de queratinase desses isolados quando comparado aos outros, sendo um *M. canis* e dois *M. gypseum*. A amostra de solo S1 com a produção de 8,5 U.K. pode ser oriunda de localidade com alta concentração de queratina, o que explicaria esse pico produtivo. Estatisticamente a retirada destes *outliers*, melhor visualizados no gráfico da Figura 13, dos cálculos não alterou o resultado da comparação entre os grupos, também justificando sua permanência nos dados da pesquisa.

Cafarchia et al. (2012) utilizaram formação de halos de degradação em placas com substrato para detectar a queratinase de dermatófitos de coelhos com e sem lesões de dermatofitose. Todas as amostras utilizadas, que eram de *M. canis* e *T. mentagrophytes*, foram produtoras de queratinase, mostrando não haver correlação entre a produção desta enzima e o aparecimento de lesões da dermatofitose. Nesta pesquisa, altos índices de queratinase foram detectados em *M. canis* isolados de animais assintomáticos, fato justificado pelo possível estágio inicial da dermatofitose no momento da coleta das amostras, momento em que ainda não apresenta sinais clínicos no paciente. Animais com dermatofitose por *T. mentagrophytes* não apresentaram índices tão elevados de queratinase, mesmo em animais com lesões, o que foi explicado pelo fato dos coelhos serem hospedeiros naturais deste dermatófito, situação em que existe grande adaptação entre o fungo e o animal.

Gnat et al. (2018) em análise de enzimas produzidas por dermatófitos verificaram a produção de queratinase por todos os isolados, sendo que as amostras foram colhidas de animais sintomáticos e assintomáticos para dermatofitose. Estes dados corroboram com a hipótese de que a produção de queratinase não é enzima diretamente relacionada ao surgimento de lesões nos animais. Mas, altos níveis dessa enzima sim, podem ser relacionados ao surgimento das lesões, já que obtiveram diferença significativa na produção de amostras colhidas de animais sintomáticos e assintomáticos.

Viani et al. (2001) também correlacionaram maiores índices de produção de queratinase por *M. canis* à existência de lesões da dermatofitose, onde a média de produção dos isolados assemelha-se à encontrada por nós.

Giudice (2008) obteve a maioria dos isolados de *M. gypseum* de animais produzindo entre cinco e dez U.K., enquanto os isolados do solo produziram em sua maioria no máximo 5 U.K., dados que se assemelham aos nossos, notando-se discrepância apenas nos isolados clínicos, ressaltando que nosso estudo envolvia outras espécies, que não *M. gypseum* e que este pesquisador também utilizou a mesma técnica quantitativa que nós.

Os estágios da doença em que houve a coleta das amostras clínicas podem explicar essas diferenças na produção da queratinase entre nosso estudo e o de Giudice (2008), onde estágios iniciais da doença podem requerer maior quantidade da enzima para instalação do patógeno. No Hospital Veterinário da UFRRJ, os pacientes chegam na maioria das vezes em estágios avançados das doenças, onde ocorreram as coletas de nossa pesquisa. Por *M. gypseum* não ser zoofílico, maior quantidade de queratinase pode ser requisitada para que este fungo desenvolva a dermatofitose em animais, o que também pode ter influenciado nos resultados de Giudice (2008).

Sharma et al. (2012) quantificaram a queratinase de dermatófitos do solo em espectrofotômetro como nós, e obtiveram resultados semelhantes aos nossos quando comparadas com as U.K. produzidas pelos fungos. Avaliaram a produção desta enzima em diferentes condições de pH, temperatura e concentrações de metais, sendo raros os isolados que produziram acima de 3 U.K. em qualquer uma das situações a que foram submetidos.

Trabalhos feitos com halos de degradação em placas, como os de Cafarchia et al. (2012) e Sharifzadeh et al. (2016) não permitem a comparação quantitativa com nossos resultados, apenas deixando clara a produção da queratinase por todos os isolados de dermatófitos. A técnica que utiliza placas é mais rápida para gerar resultados e também de menor custo. Porém,

apresenta algumas desvantagens, como ressecamento do meio de cultura com substrato, maior possibilidade de contaminação, subjetividade na interpretação dos halos, dificuldade em quantificar o fungo a ser inoculado nas placas e maior espaço ocupado em estufas.

A técnica que nós utilizamos, utilizando leituras em espectrofotômetro, possui custo relativamente alto e demanda um período maior para se obter os resultados. Porém, permite quantificar melhor as enzimas produzidas, além de permitir quantificar o fungo inoculado no meio com substrato, ter menor risco de contaminação, ocupar menos espaço em estufas e não haver subjetividade durante a leitura dos resultados.

Assim, as enzimas com técnicas já estabelecidas com análise de absorvância, como a queratinase, foram assim por nós analisadas, mostrando resultados satisfatórios e seguros. Algumas adaptações foram feitas da técnica utilizada por Viani et al. (2001), onde a queratina utilizada como substrato inicial está descontinuada no mercado, desta forma, utilizamos queratina oriunda de chifre bovino grosado, obtendo-se pó homogêneo. Este pó de chifre mostrou-se eficiente como fonte de queratina para os dermatófitos, tendo as vantagens de ser facilmente encontrado e também possuir custo muito baixo em relação aos disponíveis no mercado.

Não há na literatura estudos correlacionando a quantidade de U.K. produzida à manifestação da dermatofitose, mas é possível presumir, pelos nossos dados, que 0,5 U.K. (C16) bastaria para a instalação da doença.

Tabela 3 – Atividade da queratinase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	U.K.	Amostra	Espécie	U.K.
C1	<i>Microsporium canis</i>	1,8	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	8,5
C2	<i>Microsporium canis</i>	2,4	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	1,4
C3	<i>Microsporium canis</i>	2,4	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	1,8
C4	<i>Microsporium canis</i>	2,4	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	1,4
C5	<i>Microsporium canis</i>	1	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	2,5
C6	<i>Microsporium canis</i>	4,3	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	1,5
C7	<i>Microsporium canis</i>	1,9	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	1,8
C8	<i>Microsporium canis</i>	1,2	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	1,2
C9	<i>Microsporium canis</i>	1,6	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	1,4
C10	<i>Microsporium canis</i>	1,1	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	1,5
C11	<i>Microsporium canis</i>	1,5	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	4,1	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	2,2
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	1,4	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	2
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	1,8
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	1,5	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	1,6
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	0,5	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	2,3
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	2,3	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	2
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	1,3	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	2,3
C19	<i>Microsporium nanum</i>	1,7	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	2,4
C20	<i>Microsporium nanum</i>	2,2	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	2,6
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2,6	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	2,4
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1,4	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	2,4
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	2,4	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	2,7
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1,7	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	1,5
C25	<i>Trichophyton</i> sp.	1,5	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	2,1
C26	<i>Trichophyton</i> sp.	2,4	S26	<i>Microsporium nanum</i>	1,1
C27	<i>Trichophyton</i> sp.	1	S27	<i>Trichophyton</i> sp.	3
C28	<i>Trichophyton</i> sp.	1,8	S28	<i>Trichophyton</i> sp.	1,3
C29	<i>Trichophyton</i> sp.	1,6	S29	<i>Trichophyton</i> sp.	1,8
C30	<i>Trichophyton</i> sp.	2,9	S30	<i>Trichophyton</i> sp.	2,1

*U.K.: Unidade de queratinase; C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

Tabela 4 – Estatística descritiva da atividade da queratinase por isolados clínicos e ambientais

	Cepas de origem clínica	Cepas oriundas do solo
Quantidade de amostras	30	30
Mínimo	0,5	1
Máximo	4,3	8,5
Primeiro quartil (25%)	1,4	1,5
Terceiro quartil (75%)	2,4	2,375
Variância	0,7148	1,7148
Coefficiente de variação	44,58%	61,77%
Mediana	1,7	1,9
Desvio-padrão	0,8455	1,3095
Média	1,8967	2,12

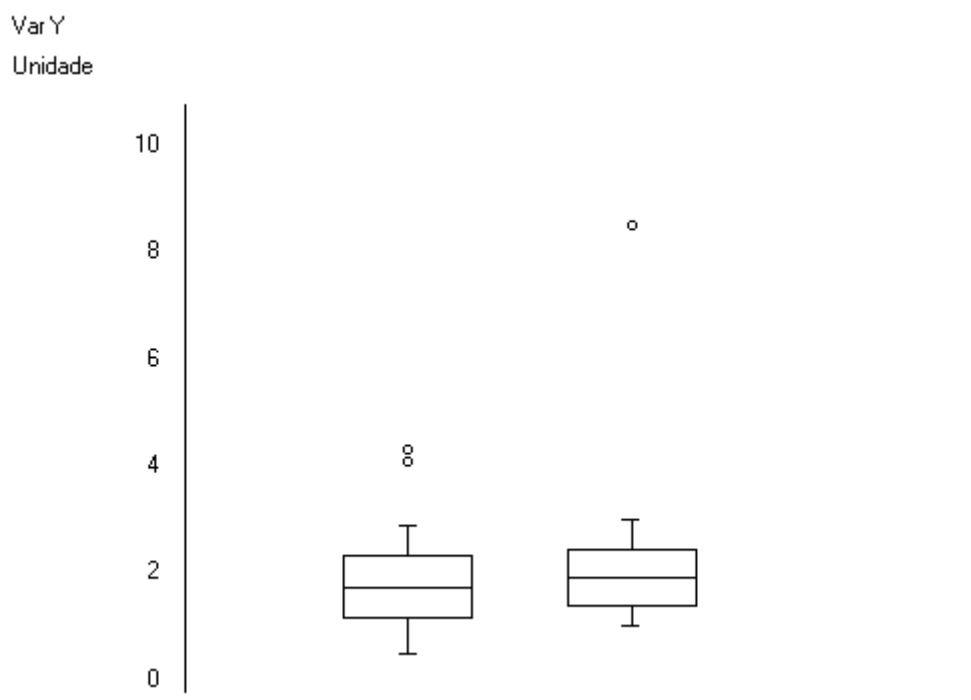


Figura 13 – Gráfico Box-Plot – média e desvios –
U.K., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente

3.4.2 Elastase

Os resultados que mostram a produção da enzima elastase por nossos isolados estão nas Tabelas 5 e 6. Não há diferença significativa estatisticamente na produção de elastase entre os grupos analisados, sendo $p=0,2978$ ($\alpha=0,05$) (Mann-Whitney). O alto custo requerido para aquisição da elastina utilizada como fonte inicial de substrato não permitiu que todos os isolados fossem testados, devido aos cortes financeiros que ocorreram nos últimos tempos em nosso país, principalmente em verbas destinadas à pesquisa em Universidades.

O número de U.E. produzida foi o que apresentou maior coeficiente de variação entre os fatores de virulência analisados, tendo isolados não-produtores e isolados com alta capacidade de produção desta enzima. Apenas o isolado C1 (*M. canis*) foi não-produtor, verificando-se apenas dois *outliers* (Figura 14), C2 e S7, que apresentaram produção bem acima dos parâmetros dos demais isolados. Assim, como ocorrido com os *outliers* da avaliação da queratinase, os testes com essas duas amostras foram repetidos, mantendo-se a alta produção enzimática. A exclusão destas amostras também não alteraria estatisticamente as conclusões dos resultados.

Cafarchia et al. (2012) utilizaram halos de degradação para avaliar a produção de elastase de *M. canis* e *T. mentagrophytes* de coelhos, mostrando variações em técnicas de avaliação enzimática de dermatófitos. Todos os isolados de *T. mentagrophytes* avaliados por eles foram produtores de elastase, como os nossos. Porém, nenhuma amostra de *M. canis* foi produtora, dados que diferem dos nossos, em que *M. canis* apresentou-se desde não-produtor, até como *outlier* de alta produção enzimática.

A não produção da elastase por *M. canis* isolados de coelhos foi explicada pelo fato da diferente constituição dos tecidos destes animais, não sendo hospedeiros naturais desta espécie de dermatófito, ao contrário de *T. mentagrophytes*, que é facilmente isolado de coelhos e é bem adaptado aos roedores.

Sharifzadeh et al. (2016) também utilizaram placas para avaliar a produção da elastase por dermatófitos isolados de animais e pessoas, onde os isolados de *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum* foram capazes de produzir esta enzima, sendo que apenas 18,75% dos isolados de *M. canis* foram produtores. Neste trabalho realizado no Irã, a elastase foi a enzima avaliada com menor produção, bem como observado em nosso trabalho, onde entre as leituras de absorvância, as enzimas de maior produção foram colagenase, queratinase e elastase, respectivamente.

Viani et al. (2007) associaram a produção de elastase a lesões agudas da dermatofitose, como as causadas por *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, considerando *M. canis* como fraco produtor desta enzima e, portanto, relacionado a lesões crônicas em felinos. Explicação que pode justificar o isolado de *M. canis* não produtor e até mesmo o *outlier* de alta produção (C2) em nosso estudo, mostrando essa grande variação dentro da espécie.

Gnat et al. (2018) obtiveram maior percentual de produção de elastase em isolados de *M. canis* de pacientes humanos, quando comparado a isolados de animais, o que pode ser explicado por esse fungo não ser antropofílico, requerendo maior produção de fatores enzimáticos para estabelecer a dermatofitose.

Muhsin et al. (1997) obtiveram a produção de elastase apenas por *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. verrucosum*, ressaltando o maior potencial patogênico dessas espécies frente a outros fungos por eles testados, como *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. violaceum* e *Epidermophyton floccosum*. Estes dados também corroboram com nossos dados que evidenciam o alto poder patogênico dos dermatófitos encontrados no solo, principalmente *M. gypseum*, como potente produtor de fatores de virulência e relacionado a lesões dermatofíticas agudas.

Outro fato a ser ressaltado no trabalho de Muhsin et al. (1997) é que as espécies sem produção de elastase são todas antropofílicas (*T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. violaceum* e *Epidermophyton floccosum*), que possuem pouca ocorrência em animais e não foram testadas em nossa pesquisa. Mas, se comparados aos nossos dados e a outras pesquisas envolvendo isolados zoofílicos e geofílicos, é de se supor que dermatófitos antropofílicos sejam menos virulentos que as outras espécies, ao menos *in vitro*.

A produção de elastase por todos os nossos isolados testados se dá pelo fato da elastina ser um dos principais componentes da pele e estruturas mais profundas dos animais e também estar presente nos resíduos de descamação e outros materiais biológicos em decomposição no solo. A elastina (Figura 15) ainda é constituinte de estruturas mais profundas dos organismos, como ligamentos e vasos sanguíneos, o que justifica quadros agudos mais graves, e mesmo atípicos, da dermatofitose, principalmente por *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, espécies que se apresentaram como potentes produtoras de elastase em nosso trabalho frente aos outros isolados.

Tabela 5 – Atividade da elastase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	U.E.	Amostra	Espécie	U.E.
C1	<i>Microsporium canis</i>	0	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	2,09
C2	<i>Microsporium canis</i>	8,1	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	0,79
C3	<i>Microsporium canis</i>	1,33	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	0,5
C4	<i>Microsporium canis</i>	2,32	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	0,4
C5	<i>Microsporium canis</i>	0,38	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C6	<i>Microsporium canis</i>	1,21	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	2,94
C7	<i>Microsporium canis</i>	0,8	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	5,05
C8	<i>Microsporium canis</i>	0,16	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	0,2
C9	<i>Microsporium canis</i>	3,93	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	0,72
C10	<i>Microsporium canis</i>	-	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8
C11	<i>Microsporium canis</i>	-	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	1,2
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	-	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	2,82
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	3,44	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	1,33	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	0,15
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	1,74	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	-	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	-	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	-	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C19	<i>Microsporium nanum</i>	3,78	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C20	<i>Microsporium nanum</i>	-	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,83	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1,94	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3,72	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3,17	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C25	<i>Trichophyton sp.</i>	0,29	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	-
C26	<i>Trichophyton sp.</i>	0,93	S26	<i>Microsporium nanum</i>	0,7
C27	<i>Trichophyton sp.</i>	1,62	S27	<i>Trichophyton sp.</i>	-
C28	<i>Trichophyton sp.</i>	0,04	S28	<i>Trichophyton sp.</i>	-
C29	<i>Trichophyton sp.</i>	0,96	S29	<i>Trichophyton sp.</i>	-
C30	<i>Trichophyton sp.</i>	-	S30	<i>Trichophyton sp.</i>	-

*U.E.: Unidade de elastase; -: Amostra não analisada; C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

Tabela 6 – Estatística descritiva da atividade da elastase por isolados clínicos e ambientais

	Cepas de origem clínica	Cepas oriundas do solo
Quantidade de amostras	22	13
Mínimo	0	0,15
Máximo	8,1	5,05
Primeiro quartil (25%)	0,8075	0,5
Terceiro quartil (75%)	2,9575	2,09
Variância	3,5227	2,0601
Coefficiente de variação	98,27%	101,63%
Mediana	1,33	0,79
Desvio-padrão	1,8769	1,4353
Média	1,91	1,4123

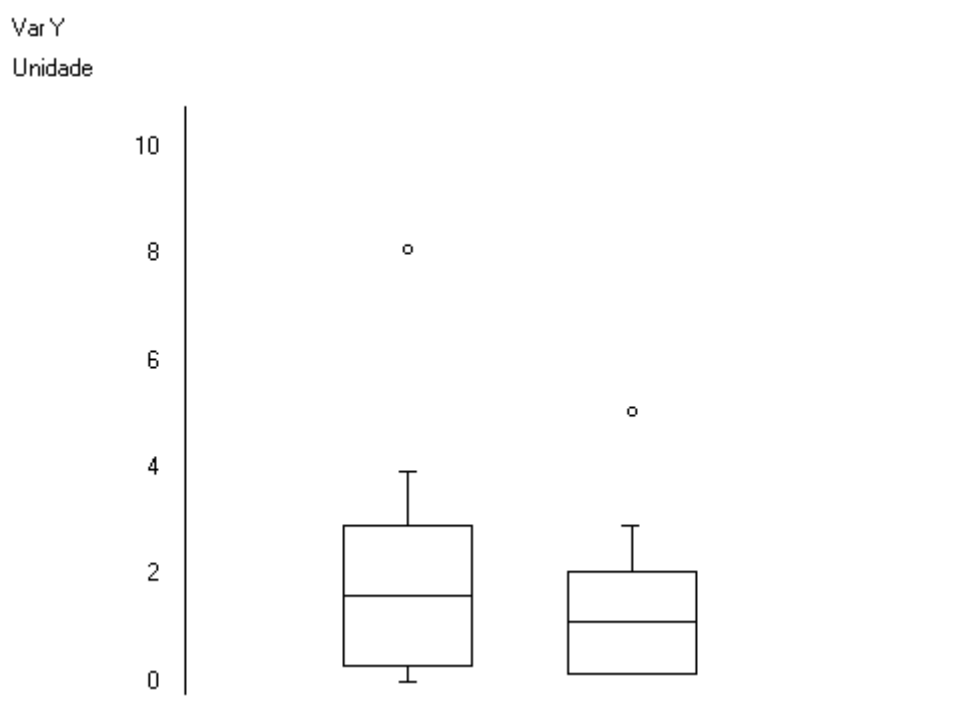


Figura 14 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – U.E., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente



Figura 15 – Cepa de dermatófito crescendo em busca de substrato - elastina

3.4.3 Colagenase

Os dados referentes à produção da colagenase produzida por nossos isolados estão nas Tabelas 7 e 8. Houve a produção por todos os isolados clínicos e ambientais, todas as amostras com grande produção de U.C. quando comparadas as produções de U.K. e U.E. Há diferença significativa estatisticamente na produção de colagenase entre os grupos analisados, sendo

$p=0,0011$ ($\alpha=0,05$) (Mann-Whitney). Na figura 16 fica mais evidente a maior produção enzimática por parte dos isolados ambientais quando comparados aos isolados clínicos.

O colágeno é a proteína mais abundante no organismo de pessoas e animais, sendo o colágeno de tipo I presente na pele, tendões e ossos. Essa grande oferta de substrato pode explicar a grande produção desta enzima pelos nossos isolados. Como a dermatofitose é micose superficial, a oferta de colágeno em animais vivos tende a ser menor que a oferta encontrada no solo, onde organismos em decomposição estão presentes, apresentando outras fontes dessa proteína aos dermatófitos, o que justificaria a maior produção pelos isolados ambientais.

São poucos os trabalhos que analisaram a produção de colagenase por dermatófitos, sendo a maioria deles sobre a degradação da gelatina, produto da hidrólise parcial do colágeno. Rippon (1968) foi um dos primeiros pesquisadores a avaliar a colagenase de dermatófitos, especificamente, *Trichophyton schoenleinii*. Neste trabalho avaliou o melhor pH de ação (6,5) e inibidores desta enzima (EDTA), não quantificando a presença da enzima, como fizemos.

Ibrahim-Granet et al. (1996) avaliaram a produção de colagenase por diversos fungos patogênicos, como *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., entre outros, e o maior produtor da enzima foi o dermatófito *Trichophyton schoenleinii*, espécie antropofílica. Neste trabalho também evidenciaram o EDTA como inibidor desta enzima. Inibidores dos fatores de virulência vem sendo testados como possíveis controladores da dermatofitose, porém ainda não são utilizados em produtos disponíveis comercialmente, talvez pela falta, e mesmo limitações que testes *in vivo* possam impor.

Abdel-Rahman (2001) detectou a produção de colagenase por todos os isolados de *T. tonsurans* obtidos de amostras de lesões em crianças, mostrando a produção desta enzima por diversas espécies do grupo dos dermatófitos.

Viani (2007) avaliou a atividade enzimática de *M. canis* de animais sintomáticos e assintomáticos, verificando não haver diferença estatisticamente entre os grupos para colagenase. Essa semelhança de produção entre grupos sintomáticos e assintomáticos sugere que a colagenase possa não estar envolvida, diretamente, ao surgimento de lesões da dermatofitose. Bem como, a alta produção de nossos isolados ambientais, evidenciam que os dermatófitos produzem esta enzima mesmo quando não estão parasitando organismos vivos.

O estudo de Viani (2007) utilizou técnica de quantificação igual à que utilizamos, obtendo números U.C. inferiores aos nossos, o que pode ser explicado por ter utilizado apenas isolados de *M. canis*.

Kotrajaras (1965) utilizou enzimas produzidas por isolados de *T. mentagrophytes* para avaliar a separação completa da epiderme da derme, e a colagenase mostrou melhor ação que a elastase nessa função, mas as duas enzimas foram eficientes. Isso mostra a importância do colágeno e da elastina na composição da pele. Como os dermatófitos são produtores destas enzimas, estão aptos a destruir essas fibras elásticas, o que, provavelmente favorece a disponibilidade de outros substratos, como a queratina.

Tabela 7 – Atividade da colagenase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	U.C.	Amostra	Espécie	U.C.
C1	<i>Microsporium canis</i>	4,86	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	4,9
C2	<i>Microsporium canis</i>	4,9	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	3,83
C3	<i>Microsporium canis</i>	4,89	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	4,05
C4	<i>Microsporium canis</i>	4,87	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	4,94
C5	<i>Microsporium canis</i>	4,84	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	4,82
C6	<i>Microsporium canis</i>	4,86	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	4,91
C7	<i>Microsporium canis</i>	4,91	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	4,92
C8	<i>Microsporium canis</i>	4,89	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	4,93
C9	<i>Microsporium canis</i>	4,87	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	4,87
C10	<i>Microsporium canis</i>	5,03	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	5,03
C11	<i>Microsporium canis</i>	4,87	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	4,97
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	4,84	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	5
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	4,79	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	5,07
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	4,82	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	5,06
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	4,84	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	4,95
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	4,85	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	4,95
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	4,96	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	5,02
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	4,9	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	4,97
C19	<i>Microsporium nanum</i>	4,84	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	4,82
C20	<i>Microsporium nanum</i>	4,95	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	5,22
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4,83	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	4,87
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4,85	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	4,88
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4,86	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	5,15
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	4,92	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	5,11
C25	<i>Trichophyton sp.</i>	4,94	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	5,06
C26	<i>Trichophyton sp.</i>	4,9	S26	<i>Microsporium nanum</i>	4,9
C27	<i>Trichophyton sp.</i>	4,91	S27	<i>Trichophyton sp.</i>	5,28
C28	<i>Trichophyton sp.</i>	4,9	S28	<i>Trichophyton sp.</i>	4,97
C29	<i>Trichophyton sp.</i>	4,83	S29	<i>Trichophyton sp.</i>	5,01
C30	<i>Trichophyton sp.</i>	5,13	S30	<i>Trichophyton sp.</i>	5,06

*U.C.: Unidade de colagenase; C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

Tabela 8 – Estatística descritiva da atividade da colagenase por isolados clínicos e ambientais

	Cepas de origem clínica	Cepas oriundas do solo
Quantidade de amostras	30	30
Mínimo	4,79	3,83
Máximo	5,13	5,28
Primeiro quartil (25%)	4,8425	4,9
Terceiro quartil (75%)	4,9075	5,0525
Variância	0,0045	0,0831
Coefficiente de variação	1,37%	5,86%
Mediana	4,87	4,96
Desvio-padrão	0,0668	0,2882
Média	4,8883	4,9173

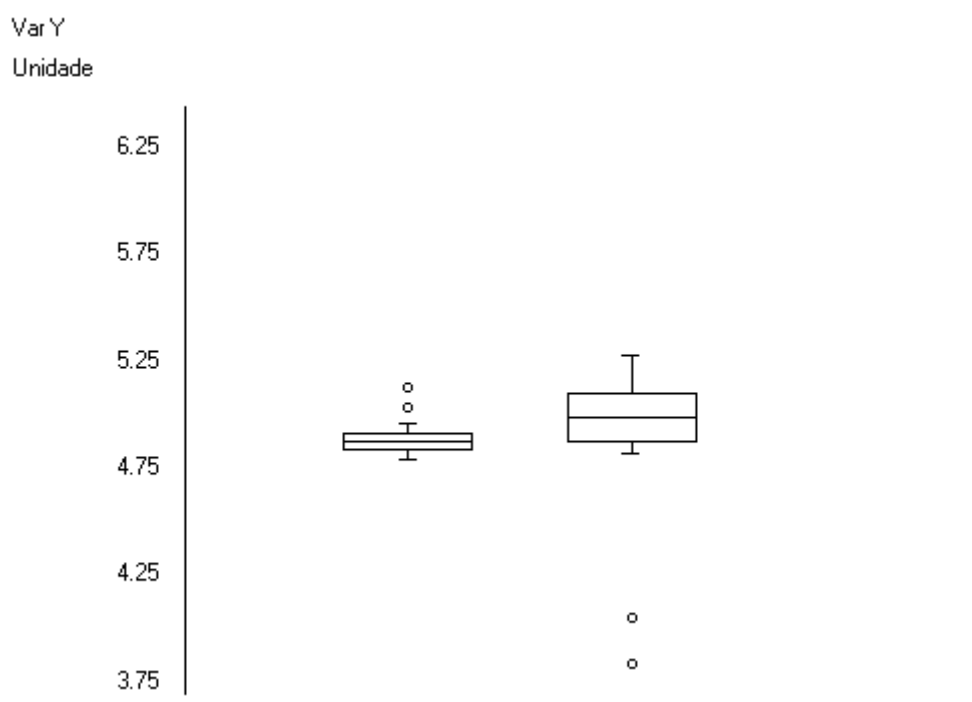


Figura 16 – Gráfico Box-Plot – média e desvios –
U.C., cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente

3.4.4 DNase

Os dados referentes à produção de DNase estão expostos nas tabelas 9 e 10 e podem ter a distribuição melhor visualizadas na figura 17. Há diferença significativa estatisticamente na produção de DNase entre os grupos analisados, sendo $p < 0,0001$ ($\alpha = 0,05$) (Mann-Whitney). Nenhum dos isolados de *M. gypseum* do solo produziu a enzima, bem como alguns isolados clínicos desta espécie. Tal fato sugere que a DNase possa estar diretamente relacionada a estágios específicos (inicial, ou avançado; sintomático) da dermatofitose causada por *M. gypseum*. No mais, todos os outros isolados, que não *M. gypseum*, foram produtores da DNase. De acordo com classificação proposta por Price et al. (1982), onde $Pz < 0,64$ é considerado forte produtor enzimático, apenas três isolados clínicos (C7, C8 e C18) de nosso estudo foram fortes produtores da DNase, sendo dois *M. canis* e um *M. gypseum*.

Embora possa ter envolvimento com a progressão da dermatofitose, Cafarchia et al. (2012) não consideram a DNase envolvida no aparecimento de lesões de dermatofitose por *T. mentagrophytes*, já que em seu trabalho não houve diferença na produção entre isolados de pacientes sintomáticos e assintomáticos. Porém, os maiores níveis de DNase foram detectados por isolados de *M. canis* de animais assintomáticos, sugerindo a participação desta enzima principalmente nas fases iniciais da doença.

Assim como na maioria das pesquisas avaliando a produção de DNase por dermatófitos, a técnica por nós utilizada para detectar e mensurar a produção foi a formação de halos de degradação. Como já citado, esta técnica tem a desvantagem da subjetividade durante a leitura quando comparada à leitura de absorbância. No caso dos testes de avaliação da DNase, a visualização dos halos de degradação mostrou-se difícil mesmo com a utilização de soluções reveladoras propostas em literatura, como o ácido clorídrico 5N. Os halos formados permitiram a detecção da produção enzimática, mas a divisão pouco uniforme entre área degradada de substrato e área não-degradada evidenciou a possibilidade da subjetividade durante a medição

das áreas (Figuras 18 e 19). Porém, não são descritas outras técnicas para a avaliação da DNase por dermatófitos, sendo este o método ainda mais utilizado e aceito.

Visando melhorar e detecção dos halos, testamos outras soluções reveladoras durante nosso projeto, como azul de toluidina, nigrosina, azul de metileno e outras concentrações de HCl. Mas, verificamos ser o HCl 5N o revelador de melhor função neste teste. Além disso, a permanência por 10 minutos do revelador dentro das placas mostrou-se como o melhor período para a revelação das zonas de degradação.

A DNase é enzima melhor estabelecida e avaliada na rotina do diagnóstico bacteriológico, quando comparado ao micológico. Pimenta et al. (2008) determinaram a detecção da DNase como sendo um teste confiável para a identificação da espécie *Corynebacterium diphtheriae*. É de se supor que também possa fazer parte da chave de identificação de fungos dermatófitos, o que requer pesquisas.

Gerceker et al. (2009) sugeriram um novo método para detecção da DNase produzida por bactérias, chamado DDT (*DNase tube test*), onde o micro-organismo a ser analisado é semeado em meio com DNA, e posteriormente a verificação da presença, ou ausência de DNA neste meio é feita por corrida em gel de agarose (eletroforese). Os pesquisadores destacam a simplicidade, rapidez, baixo custo e acurácia deste método quando comparado à leitura de halos em placas. Assim, este método pode ser testado para a detecção de atividade da DNase em fungos, podendo ser uma boa alternativa à subjetividade das leituras em placas.

Sharifzadeh et al. (2016) analisando diferentes espécies de dermatófitos, como *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*, detectaram esta última espécie como a maior produtora de DNase. Ainda ressaltam que a produção de DNase está relacionada a casos crônicos de dermatofitose, enquanto isolados de casos agudos tendem a ser fracos secretores de desta enzima.

Entre os nossos isolados clínicos, nota-se padrão de produção, não sendo os fungos fortes produtores da DNase, o que requer melhor investigação das características dos nossos pacientes para que se obtenha essa correlação com a cronicidade da dermatofitose. O que se pode afirmar, é que todas as amostras foram coletadas de animais com lesões da dermatofitose e que então esta enzima possa estar relacionada à animais sintomáticos.

Porém, Viani et al. (2001) não sugeriram a DNase como envolvida nas características clínicas da dermatofitose, já que não obtiveram diferença na produção entre isolados de *M. canis* de gatos e cães sintomáticos e assintomáticos. A utilização de apenas *M. canis* pode explicar esse comportamento na pesquisa de Viani et al. (2001), já que esta espécie tende a gerar casos crônicos de dermatofitose em cães e gatos, considerados hospedeiros deste fungo.

Além disso, outro fato que se destaca em nosso trabalho é a não produção da DNase por *M. gypseum*, englobando todos os isolados ambientais da espécie e 4 dos 7 isolados clínicos, sugerindo ser esta uma espécie de fraca produção desta enzima, ou que esta enzima seja pouco produzida por dermatófitos geofílicos.

Tabela 9 – Atividade da DNase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	PzD	Amostra	Espécie	PzD
C1	<i>Microsporium canis</i>	0,846	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C2	<i>Microsporium canis</i>	0,8318	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C3	<i>Microsporium canis</i>	0,8453	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C4	<i>Microsporium canis</i>	0,7697	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C5	<i>Microsporium canis</i>	0,8571	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C6	<i>Microsporium canis</i>	0,7146	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C7	<i>Microsporium canis</i>	0,6141	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C8	<i>Microsporium canis</i>	0,6312	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C9	<i>Microsporium canis</i>	0,7233	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C10	<i>Microsporium canis</i>	0,7859	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C11	<i>Microsporium canis</i>	0,8557	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8777	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8828	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	0,5252	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C19	<i>Microsporium nanum</i>	0,871	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C20	<i>Microsporium nanum</i>	0,9378	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,8991	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,8506	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,7291	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,8825	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C25	<i>Trichophyton sp.</i>	0,6976	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C26	<i>Trichophyton sp.</i>	0,85	S26	<i>Microsporium nanum</i>	0,8608
C27	<i>Trichophyton sp.</i>	0,9387	S27	<i>Trichophyton sp.</i>	0,9227
C28	<i>Trichophyton sp.</i>	0,5617	S28	<i>Trichophyton sp.</i>	0,9047
C29	<i>Trichophyton sp.</i>	0,6655	S29	<i>Trichophyton sp.</i>	0,8004
C30	<i>Trichophyton sp.</i>	0,8413	S30	<i>Trichophyton sp.</i>	0,7554

*C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

Tabela 10 – Estatística descritiva da atividade da DNase por isolados clínicos e ambientais

	Cepas de origem clínica	Cepas oriundas do solo
Quantidade de amostras	30	30
Mínimo	0,5252	0,7554
Máximo	1	1
Primeiro quartil (25%)	0,7248	1
Terceiro quartil (75%)	0,8827	1
Variância	0,0168	0,004
Coefficiente de variação	15,87%	6,46%
Mediana	0,848	1
Desvio-padrão	0,1295	0,063
Média	0,8162	0,9748

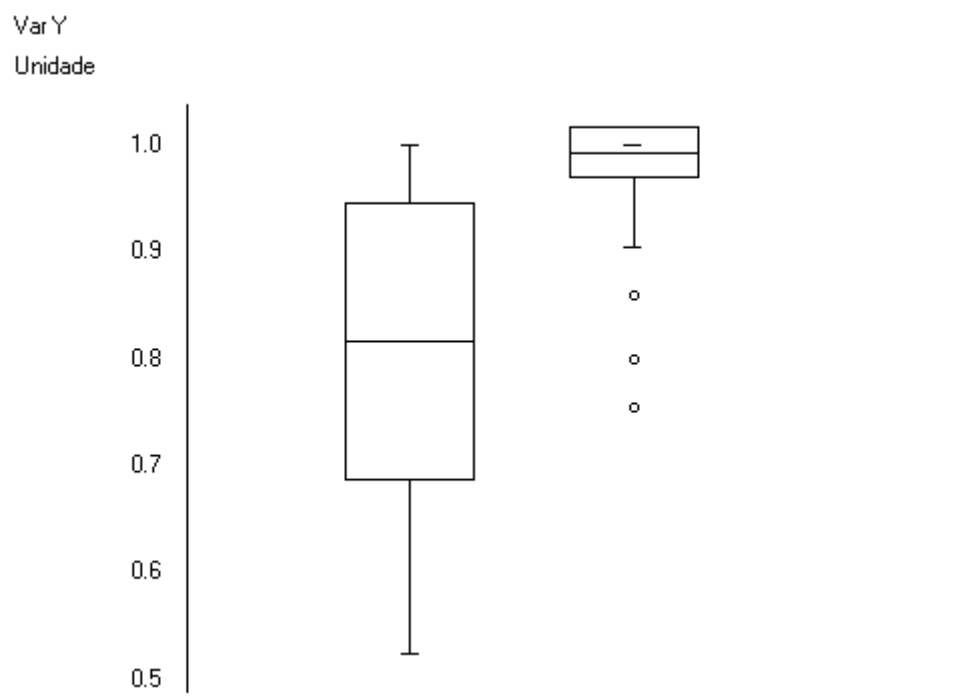


Figura 17 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – PzDNase, cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente



Figura 18 – Cepa de *Trichophyton* sp. produtora de DNase

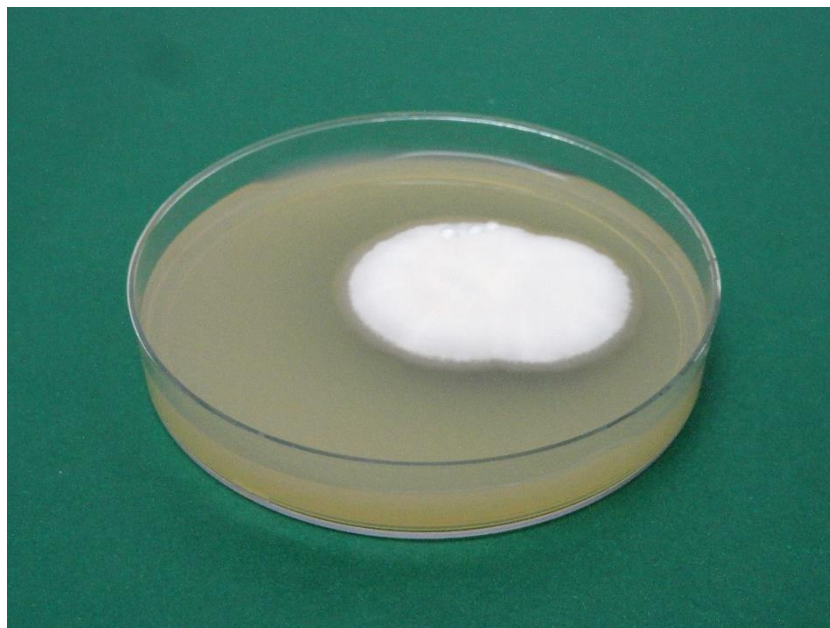


Figura 19 – Cepa de *Trichophyton* sp. produtora de DNase

3.4.5 Lipase

Os dados sobre a produção da lipase são mostrados nas Tabelas 11 e 12, onde nota-se que apenas 7 isolados não foram produtores da enzima. Não há diferença significativa estatisticamente na produção de lipase entre os grupos analisados, sendo $p=0,8650$ ($\alpha=0,05$) (Mann-Whitney). A Figura 20 evidencia a uniformidade da produção de lipase entre os grupos e a ausência de *outliers* nos resultados. De acordo com classificação proposta por Price et al. (1982), onde $Pz < 0,64$ é considerado forte produtor enzimático, apenas quatro isolados clínicos (C1, C8, C11 e C18) de nosso estudo foram fortes produtores da lipase, sendo três *M. canis* e um *T. mentagrophytes* e sete isolados ambientais (S1, S3, S11, S12, S19, S28 e S30) foram fortes produtores, sendo cinco *M. gypseum* e dois *Trichophyton* sp.

A utilização de placas de Petri para aferição dos halos mostrou-se como método prático e de fácil leitura para a produção da lipase (Figura 21), principalmente quando comparado aos testes da DNase. Não houve necessidade de soluções reveladoras e os halos de degradação com precipitação de sais são evidentes, gerando pouca subjetividade nas leituras. Cafarchia et al. (2012) fazem observação em sua pesquisa sobre a dificuldade de leitura das placas, citando não haver clareza nos resultados referentes à produção de elastase e lipase por dermatófitos, fato não ocorrido em nosso trabalho. Variações nas marcas dos produtos utilizados podem explicar essas diferenças em nossos trabalhos, já que a constituição e parâmetros dos testes foram iguais.

Os isolados não produtores, tanto clínicos quanto ambientais, são de espécies diversas, como *M. canis*, *M. gypseum*, *M. nanum* e *Thichophyton* sp., o que mostra não haver correlação entre a produção enzimática e a espécie do dermatófito, já que outros isolados semelhantes foram produtores.

A ocorrência constante da descamação de tecidos de animais e pessoas fornece ao solo substrato suficiente para que ocorra a produção de lipase pelos dermatófitos isolados do ambiente, o que explica a produção pelos nossos isolados ambientais. Hellgrem e Vincent (1980; 1981) relatam a produção de lipase por isolados de *M. canis*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum*, justificando esse fator de virulência pela necessidade dos dermatófitos em atravessar a barreira lipídica presente nos tecidos queratinizados das pessoas e dos animais. O mesmo também pode explicar a produção da lipase dos nossos isolados ambientais, onde o tecido descamado tende a possuir resquícios de lípidos.

Muhsin et al. (1997), Sharifzadeh et al. (2016) e Gnat et al. (2018) relatam a produção de lipase por todos os isolados de leveduras, como *Candida* spp., e dermatófitos avaliados por eles, também confirmando a necessidade desses fungos em atravessar barreiras lipídicas para se instalar nos tecidos dos hospedeiros.

Elavarashi et al. (2017) detectaram a forte produção de lipase por todos os isolados de *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* em sua pesquisa, mostrando ser esta enzima um forte marcador para identificação destes fungos. Todos os isolados de *T. mentagrophytes* em nosso trabalho também foram produtores, contribuindo com a hipótese de Elavarashi et al. (2017).

Cafarchia et al. (2012) não identificaram diferença entre a produção de lipase de *T. mentagrophytes* isolados do ambiente, de coelhos sintomáticos e assintomáticos para dermatofitose. No entanto, em *M. canis* houve maior produção desta enzima nos isolados de pacientes sintomáticos, quando comparado aos outros dois grupos, associando a produção ao surgimento de lesões. A fato dos coelhos não serem hospedeiros naturais de *M. canis* pode explicar a maior produção deste fator para que esta espécie cause lesões nos animais.

Tabela 11 – Atividade da lipase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	PzL	Amostra	Espécie	PzL
C1	<i>Microsporium canis</i>	0,5806	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	0,5964
C2	<i>Microsporium canis</i>	0,6796	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7256
C3	<i>Microsporium canis</i>	1	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	0,2995
C4	<i>Microsporium canis</i>	0,8065	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	1
C5	<i>Microsporium canis</i>	0,7243	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8418
C6	<i>Microsporium canis</i>	0,6951	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8887
C7	<i>Microsporium canis</i>	0,5245	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7615
C8	<i>Microsporium canis</i>	0,6282	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7898
C9	<i>Microsporium canis</i>	1	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8857
C10	<i>Microsporium canis</i>	0,6616	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7803
C11	<i>Microsporium canis</i>	0,6354	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	0,6354
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	1	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	0,6214
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	0,719	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8298
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	0,6732	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8514
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8947	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	0,85
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7705	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8633
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8266	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8083
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7752	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8201
C19	<i>Microsporium nanum</i>	0,7741	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	0,5837
C20	<i>Microsporium nanum</i>	0,7634	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8597
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,691	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7439
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,5292	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	0,6753
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,934	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7833
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	0,8174	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	0,7907
C25	<i>Trichophyton sp.</i>	0,8677	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	0,8222
C26	<i>Trichophyton sp.</i>	0,9185	S26	<i>Microsporium nanum</i>	1
C27	<i>Trichophyton sp.</i>	1	S27	<i>Trichophyton sp.</i>	0,9598
C28	<i>Trichophyton sp.</i>	0,7578	S28	<i>Trichophyton sp.</i>	0,4105
C29	<i>Trichophyton sp.</i>	1	S29	<i>Trichophyton sp.</i>	0,805
C30	<i>Trichophyton sp.</i>	0,6289	S30	<i>Trichophyton sp.</i>	0,3879

*C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

Tabela 12 – Estatística descritiva da atividade da lipase por isolados clínicos e ambientais

	Cepas de origem clínica	Cepas oriundas do solo
Quantidade de amostras	30	30
Mínimo	0,5245	0,2995
Máximo	1	1
Primeiro quartil (25%)	0,6748	0,6879
Terceiro quartil (75%)	0,888	1
Variância	0,0208	0,0284
Coefficiente de variação	18,58%	22,31%
Mediana	0,7669	0,7978
Desvio-padrão	0,1442	0,1686
Média	0,7759	0,7557

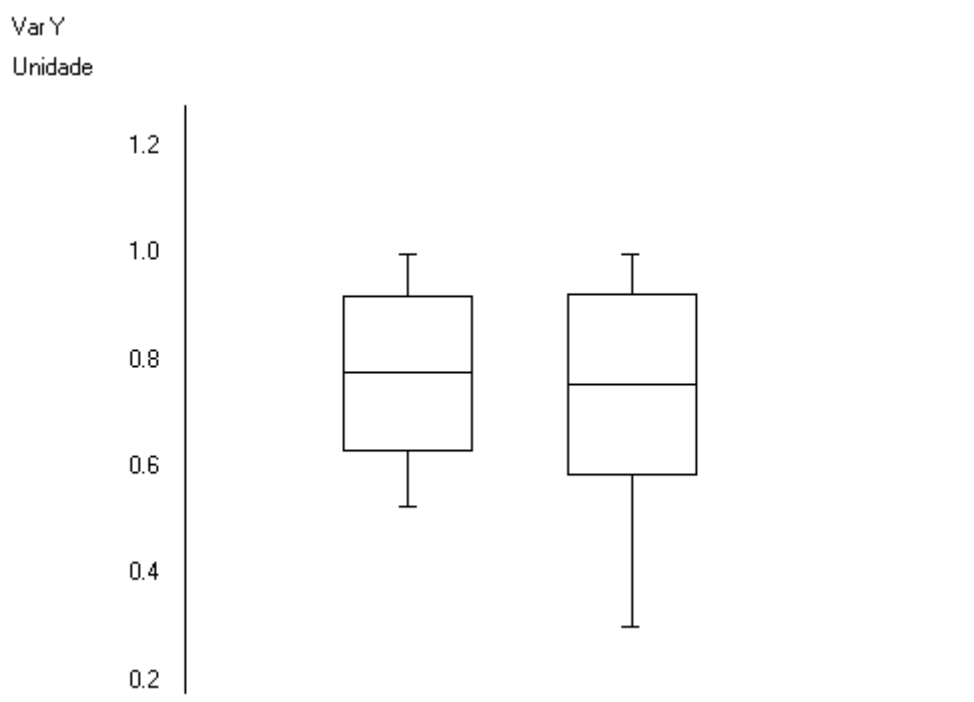


Figura 20 – Gráfico Box-Plot – média e desvios – PzLipase, cepas de origem clínica e cepas oriundas do solo, respectivamente



Figura 21 – Cepa de *Microsporium canis* produtora de lipase

3.4.6 Gelatinase

Os dados sobre a produção de gelatinase pelos isolados clínicos e ambientais estão na Tabela 13. Não há diferença significativa estatisticamente na produção de gelatinase entre os grupos analisados, sendo $p=0,5593$ ($\alpha=0,05$) (Teste binomial: duas proporções). Sete isolados clínicos de dermatófitos não foram produtores da gelatinase, enquanto apenas dois ambientais não produziram a enzima.

A gelatina é resultado da hidrólise parcial do colágeno, por isso, embora todos os isolados de nosso trabalho tenham sido capazes de degradar o colágeno, não necessariamente seriam capazes de liquefazer com eficácia os meios de cultura contendo a gelatina.

Dentre todos os isolados de *M. gypseum* apenas um não foi produtor de gelatinase, sendo esse um fungo ambiental (S13). Todos os isolados de *T. mentagrophytes*, que são de origem clínica, foram produtores da enzima, mostrando o grande potencial patogênico desta espécie. *Microsporum canis* mostrou grande variação na produção da gelatinase, sendo que quatro dos onze isolados não foram produtores, não sendo este um bom marcador para a patogenicidade deste fungo. Os isolados de *Trichophyton* sp., clínicos e ambientais, também mostraram comportamento semelhante ao *M. canis*, sendo que quatro dos dez não foram produtores. Todos os *M. nanum* foram produtores.

Cafarchia et al. (2012) analisaram isolados de *M. canis* ambientais e de coelhos sintomáticos e assintomáticos, onde nenhum fungo foi produtor de gelatinase, corroborando com a variação de produção enzimática desta espécie em nosso trabalho e levantando a hipótese de que *M. canis* seja fraco produtor desta enzima.

O método para detecção de atividade da gelatinase utilizado em nossa pesquisa mostrou-se econômico e de fácil leitura. A utilização de tubos de ensaio de vidro ocupa pouco espaço em estufas, permitem a reutilização dos tubos e tornam evidente se houve liquefação, ou não, do meio de cultura contendo gelatina. Alguns trabalhos utilizaram placas de Petri para a realização dos testes, técnica previamente testada por nós, que apresentou alto índice de contaminação das amostras, bem como maior dificuldade para realização das leituras.

A leitura em tubos ainda permite identificar diferentes padrões de degradação da gelatina, como proposto por Bier (1985) e mostrado na Figura 22. Estes padrões requerem mais pesquisas para que sejam relacionados às espécies dos dermatófitos.

Jacobs e Lorincz (1957) já buscavam por informações à cerca da relação entre dermatófitos e a gelatina, mostrando que meios de cultura contendo 5% de gelatina favorecem o crescimento de dermatófitos, mas que concentrações acima de 30% inibem o desenvolvimento destes fungos. Levantaram a hipótese de que esta concentração possa manter o equilíbrio entre hospedeiro e dermatófito, já que 70% do colágeno íntegro dos seres vivos é água, semelhante ao meio de cultura inibidor. Teoria ainda não confirmada até o momento. Além disso, este trabalho corrobora com nossos dados, onde a maioria dos dermatófitos foi capaz de degradar este substrato.

Sharma et al. (2017) avaliaram a produção da gelatinase por fungos do solo, onde de 31 isolados, apenas 2 foram produtores de gelatinase. O que difere estes resultados dos nossos, é que dentre esses 31 fungos a maioria era do gênero *Aspergillus*, ou fungos demáceos, não sendo citados dermatófitos. Na pesquisa de Muhsin et al. (1997) nenhuma levedura pesquisada, entre espécies de *Candida* e *Malassezia*, foi produtora da gelatinase, enquanto todos os dermatófitos foram produtores. Isto levanta a hipótese de que os dermatófitos possam ser diferenciados de outros fungos também por serem produtores de gelatinase, isolados de animais doentes, ou de amostras do solo.

Tabela 13 – Atividade da gelatinase por isolados clínicos e ambientais

Cepas de origem clínica			Cepas oriundas do solo		
Amostra	Espécie	Gelatinase	Amostra	Espécie	Gelatinase
C1	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S1	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C2	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S2	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C3	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S3	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C4	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S4	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C5	<i>Microsporium canis</i>	Negativa	S5	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C6	<i>Microsporium canis</i>	Negativa	S6	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C7	<i>Microsporium canis</i>	Negativa	S7	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C8	<i>Microsporium canis</i>	Negativa	S8	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C9	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S9	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C10	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S10	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C11	<i>Microsporium canis</i>	Positiva	S11	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C12	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S12	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C13	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S13	<i>Microsporium gypseum</i>	Negativa
C14	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S14	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C15	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S15	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C16	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S16	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C17	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S17	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C18	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva	S18	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C19	<i>Microsporium nanum</i>	Positiva	S19	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C20	<i>Microsporium nanum</i>	Positiva	S20	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C21	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Positiva	S21	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C22	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Positiva	S22	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C23	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Positiva	S23	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C24	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Positiva	S24	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C25	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva	S25	<i>Microsporium gypseum</i>	Positiva
C26	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva	S26	<i>Microsporium nanum</i>	Positiva
C27	<i>Trichophyton</i> sp.	Negativa	S27	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva
C28	<i>Trichophyton</i> sp.	Negativa	S28	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva
C29	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva	S29	<i>Trichophyton</i> sp.	Negativa
C30	<i>Trichophyton</i> sp.	Negativa	S30	<i>Trichophyton</i> sp.	Positiva

*C1: isolado clínico número 1; S1: isolado ambiental número 1.

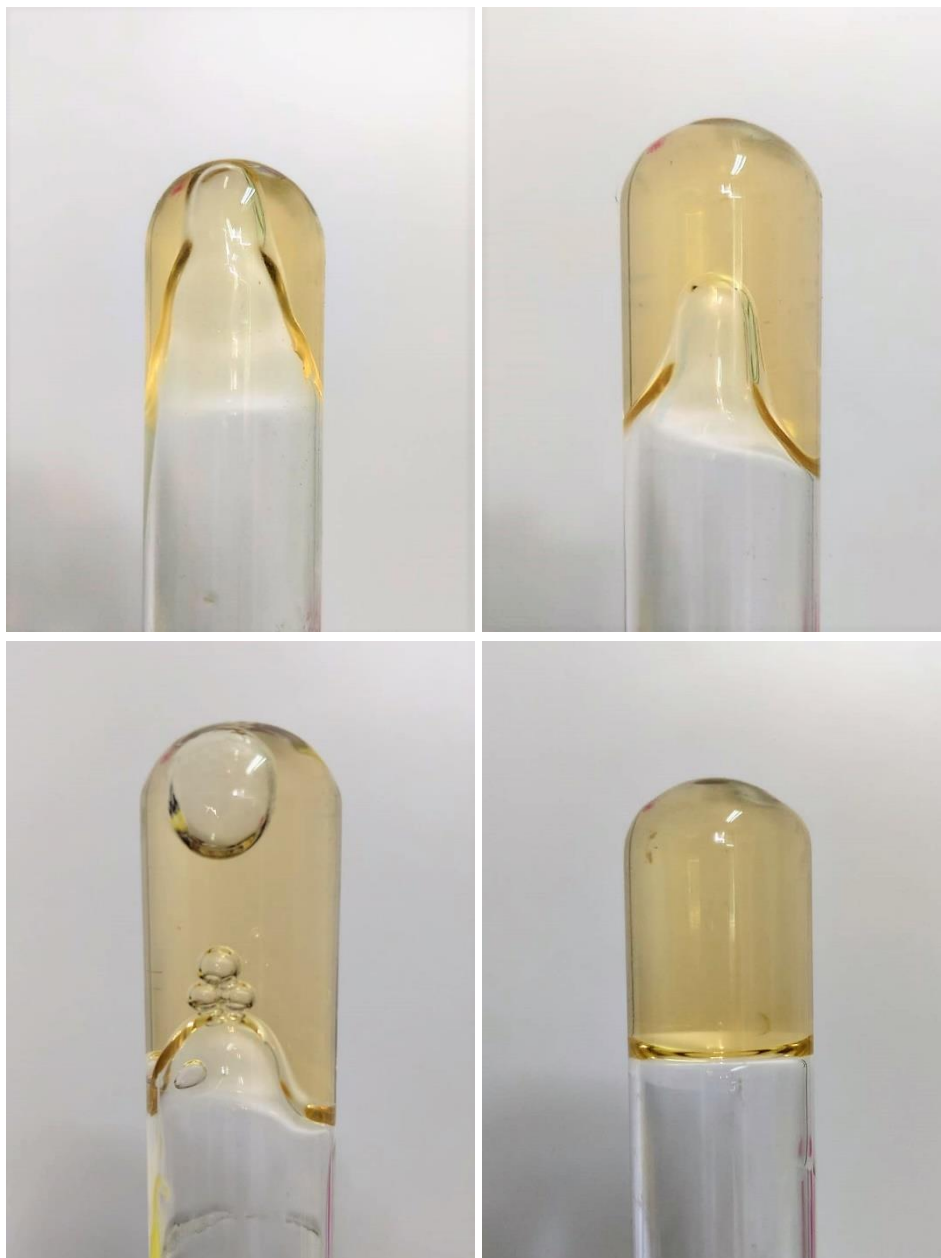


Figura 22 – Diferentes padrões de ação da gelatinase produzida por dermatófitos

4 CONCLUSÕES

- Na identificação de dermatófitos, pode-se afirmar, especificamente em relação a espécies pertencentes ao gênero *Trichophyton*, que as características macroscópicas e micromorfológicas são insuficientes principalmente após a adoção de nova classificação e avanço das técnicas moleculares.
- Houve uma maior prevalência nos isolamentos de *Microsporum canis* dentre os isolados de casos clínicos de dermatofitose. Considerando que a nossa amostragem teve como origem os animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pode-se inferir que esta espécie é a principal responsável nestes casos.
- Quanto aos isolamentos de dermatófitos geofílicos, foi possível demonstrar a presença destes fungos em várias regiões do Brasil, o que não significa que todas as amostras de solo sejam positivas. Aspectos físicos do solo como arenosidade, pH, compactação, assim como lixiviação e maior ou menor teor de queratina podem ser fatores limitantes aos isolamentos. A espécie *Microsporum gypseum* foi a mais isolada e pode-se supor que esteja presente na maioria das regiões.
- A espécie *Microsporum gypseum*, embora reconhecidamente geofílica, encontra-se relacionada a quadros clínicos de dermatofitose.
- Na utilização da técnica Vanbreuseghem (1952), a utilização de pelos claros dificulta a visualização de colônias enquanto o uso de pelos escuros possibilita um aumento de contraste entre o substrato e as mesmas.
- Para a análise de produção enzimática, a técnica que utiliza o cálculo de Pz (relação entre diâmetros da colônia e diâmetro da colônia acrescido do halo formado) apresenta praticidade na detecção de atividade enzimática, mas, ao contrário da análise por espectrofotometria, é imprecisa em quantificar a concentração da mesma. Especificamente, o teste de DNase necessita de adaptações para fornecer resultados mais precisos. A análise espectrofotométrica é de maior precisão e de leitura mais objetiva.
- Os dermatófitos isolados do solo e os isolados de origem clínica possuem basicamente a mesma expressão de fatores relacionados com a virulência, embora ocorram variações nas concentrações das enzimas produzidas.
- Os isolados de *Microsporum gypseum* de amostras ambientais possivelmente não são produtores de DNase.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-RAHMAN, S.M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 3, p. 117-120, 2001.
- AHMADI, B.; MIRHENDI, H.; SHIDFAR, M.R.; NOURIPOUR-SISAKHT, S.; JALALIZAND, N.; GERAMISHOAR, M.; SHOKOOHI, G.R. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 29-35, 2015.
- ALBANO, A.P.N.; NASCENTE, P.D.S.; LEITE, A.T.M.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; MATTEI, A.S.; HUMBERG, R.M.P.; COIMBRA, M.A.A.; MINELLO, L.F.; MEIRELES, M.C. Isolation of dermatophytes in wild felids from screening centers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 171-174, 2013.
- ALLIZOND, V.; TULLIO, V.; CUFFINI, A.M.; ROANA, J.; SCALAS, D.; MARRA, E.S.; MANDRAS, N.; MERLINO, C.; PIERSIGILLI, G.; BANCHE, G. Advances in microbiology, infectious diseases and public health: fungal occurrence in the hair and skin of symptomatic pets in Turin, Italy. In: **Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health**. Springer International Publishing, p. 55-62, 2015.
- AMORIM, M.C.O. Manutenção e revisão da micoteca do Programa de Pesquisa de Biodiversidade do Semi-árido Brasileiro-PPBIO 2011-2012. **Anais Seminário de Iniciação Científica**, n. 20, 2018.
- APODACA, G.; MCKERROW, J.H. Expression of proteolytic activity by cultures of *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 28, n. 2, p. 159-171, 1990.
- BEIFUSS, B.; BEZOLD, G.; GOTTLÖBER, P.; BORELLI, C.; WAGENER, J.; SCHALLER, M.; KORTING, H.C. Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR–ELISA technique open to protocol transfer. **Mycoses**, v. 54, n. 2, p. 137-145, 2011.
- BEZERRA, J.D.P.; NOGUEIRA, E.B.S.; MOTTA, C.M.E.S.; CORREIA, A.C.R.B.; DE SOUZA, S.C.; PENNA, L.A.O.; MACIEL, M.H.C.; SILVA, L.R.C.; GOMES, B.S.; MAGALHÃES, O.; NEVES, R.P.; MOTTA, C.M.S. Micoteca URM da UFPE: uma fonte de recursos biológicos do Brasil. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma**, v. 13, p. 47-56, 2018.
- BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 24. ed. São Paulo: Melhoramentos. 1985.
- BROSH-NISSIMOV, T.; BEN-AMI, R.; ASTMAN, N.; MALIN, A.; BARUCH, Y.; GALOR, I. An Outbreak of *Microsporum canis* infection at a military base associated with stray cat exposure and person-to-person transmission. **Mycoses**, v. 61, n. 7, p. 472-476, 2018.
- CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; COCCIOLI, C.; CAMARDA, A.; OTRANTO, D. Enzymatic activity of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* from breeding rabbits with and without skin lesions. **Mycoses**, v. 55, n. 1, p. 45-49, 2012.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **Veterinary dermatology**, v. 17, n. 5, p. 327-331, 2006.

CAPOCI, I.R.G.; CUNHA, M.M.D.; BONFIM-MENDONCA, P.D.S.; GHIRALDI-LOPES, L.D.; BAEZA, L. C.; KIOSHIMA, E.S.; SVIDZINSKI, T.I.E. Antifungal activity of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle (Citronella) against *Microsporum canis* from animals and home environment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 6, p. 509-511, 2015.

CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MELUSSI, M.; ZAMARIAN, T.P.; CARNIELLI, C.M.; JÚNIOR, J.C.M.F. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, p. 66-74, 2011.

CARLOTTI, D.N.; BENSIGNOR, E. Dermatophytosis due to *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs. **Canine practice**, v. 2, p. 6, 1999.

CAVALCANTI, S.D.B.. **Aplicação de metodologias de preservação e caracterização de fungos na coleção de culturas do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 2010. 61 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Dermatologia) Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo, SP, 2010.

CHAKRABORTY, R.; CHANDRA, A. L. Purification and characterization of a streptomycete collagenase. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 61, n. 4, p. 331-337, 1986.

CORTEZI, M. **Isolamento de microrganismos produtores de queratinase: estudo da biodegradação da queratina oriunda de penas de abatedouro de frangos**. 2009. 127 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada) UNESP, Instituto de Biociências, Rio Claro, São Paulo, 2009.

DA SILVA, B.C.M.; AULER, M.E.; RUIZ, L.D.S.; GANDRA, R.F.; DOS SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; YOSHIOKA, M.C.N.; CASTRO, L.G.M.; NUNES, R.S.; BOUCHARA, J.P.; LARCHER, G.; CHABASSE, D.; GAMBALE, W. *Trichophyton rubrum* isolated from AIDS and human immunodeficiency virus-infected patients in São Paulo, Brazil: antifungal susceptibility and extracellular enzyme production. **Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 21-26, 2005.

DABAS, Y.; XESS, I.; SINGH, G.; PANDEY, M.; MEENA, S. Molecular identification and antifungal susceptibility patterns of clinical dermatophytes following CLSI and EUCAST guidelines. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 2, p. 17, 2017.

DE HOOG, G.; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M.; KUPSCH, C.; STIELOW, J.B.; FREEKE, J.; GOKER, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MIRHENDI, H.; GRASER, Y. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 5-31, 2017.

DE HOOG, G.S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M.J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Utrecht, The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. 1126 p.

DE MOURA BRAZ, S.C.; DE SOUZA MOTTA, C.M.; DE LIMA MASSA, D.M.; NEVES, R.P.; MAGALHÃES, O.M.C. Viabilidade, confirmação taxonômica e detecção enzimática de espécies de *Acremonium* preservadas sob óleo mineral na Coleção de Culturas University

Recife Mycoloy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 1, p. 63-66, 2009.

DEBNATH, C.; MITRA, T.; KUMAR, A.; SAMANTA, I. Detection of dermatophytes in healthy companion dogs and cats in eastern India. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 20, 2016.

DESHMUKH, S.K.; VEREKAR, S.A.; CHAVAN, Y.G. Incidence of Keratinophilic Fungi from the Selected Soils of Kaziranga National Park, Assam (India). **Mycopathologia**, v. 182, n. 3-4, p. 371-377, 2017.

DONG, C.; ANGUS, J.; SCARAMPELLA, F.; NERADILEK, M. Evaluation of dermoscopy in the diagnosis of naturally occurring dermatophytosis in cats. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 4, p. 275-e65, 2016.

ELAVARASHI, E.; KINDO, A.J.; RANGARAJAN, S. Enzymatic and non-enzymatic virulence activities of dermatophytes on solid media. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 11, n. 2, p. DC23, 2017.

ERHARD, M.; HIPLER, U.C.; BURMESTER, A.; BRAKHAGE, A.A.; WÖSTEMEYER, J. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. **Experimental dermatology**, v. 17, n. 4, p. 356-361, 2008.

FERREIRO, L.; ROEHE, C.; DORNELES, A.S.; MACHADO, G.; FRAGA, C.F.; LUPION, C.G.; BARROSO, G.J.; SANCHES, E.M.C. Isolamento de dermatófitos e fungos saprotróficos do pelame de gatos sem dermatoses na região metropolitana de Porto Alegre-RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; PENNISI, M.G.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M.C. Dermatophytosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 7, p. 598-604, 2013.

GERCEKER, D.; KARASARTOVA, D.; ELYÜREK, E.; BARKAR, S.; KIYAN, M.; ÖZSAN, T.M.; CALGIN, M.K.; SAHIN, F. A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 55, n. 4, p. 291-294, 2009.

GIUDICE, M.C. **Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporium gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**. 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências, Microbiologia) Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo, SP, 2008.

GIUDICE, M.C.; REIS-MENEZES, A.A.; RITTNER, G.M.G.; MOTA, A.J.; GAMBALE, W. Isolation of *Microsporium gypseum* in soil samples from different geographical regions of Brazil, evaluation of the extracellular proteolytic enzymes activities (keratinase and elastase) and molecular sequencing of selected strains. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 895-902, 2012.

- GNAT, S.; ŁAGOWSKI, D.; NOWAKIEWICZ, A.; ZIEBA, P. Phenotypic characterization of enzymatic activity of clinical dermatophyte isolates from animals with and without skin lesions and humans. **Journal of applied microbiology**, v. 125, n. 3, p. 700-709, 2018.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n. 3, p. 597-607, 1975.
- HELLGREN, L.; VINCENT, J. Lipolytic activity of some dermatophytes. **Journal of medical microbiology**, v. 13, n. 1, p. 155-157, 1980.
- HELLGREN, L.; VINCENT, J. Lipolytic activity of some dermatophytes. **Journal of medical microbiology**, v. 14, n. 1, p. 347-350, 1981.
- HUNGERFORD, L.L.; CAMPBELL, C.L.; SMITH, A.R. **Veterinary mycology laboratory manual**. 1. ed. Iowa: Iowa State University Press, 1998. 75 p.
- IBRAHIM-GRANET, O.; HERNANDEZ, F.H.; CHEVRIER, G.; DUPONT, B. Expression of PZ-peptidases by cultures of several pathogenic fungi. Purification and characterization of a collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. **Journal of medical and veterinary mycology**, v. 34, n. 2, p. 83-90, 1996.
- ILHAN, Z.; KARACA, M.; EKIN, I.H.; SOLMAZ, H.; AKKAN, H.A.; TUTUNCU, M. Detection of seasonal asymptomatic dermatophytes in Van cats. **brazilian journal of microbiology**, v. 47, n. 1, p. 225-230, 2016.
- IVASKIENE, M.; MATUSEVICIUS, A.P.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G.; BABICKAITE, L. Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 535-543, 2016.
- JACOBS, P.H.; LORINCZ, A.L. The effect of gelatin and collagenous tissue on dermatophyte growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 47-54, 1957.
- JOKLIK, W.K.; WILLETT, H.P.; AMOS, D.B. **Zinsser microbiología**. 17. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1983. 1411 p.
- KHALED, J.M.; GOLAH, H.A.; KHALEL, A.S.; ALHARBI, N.S.; MOTHANA, R.A. Dermatophyte and non dermatophyte fungi in Riyadh City, Saudi Arabia. **Saudi journal of biological sciences**, v. 22, n. 5, p. 604-609, 2015.
- KIDD, S.; HALLIDAY, C.L.; ALEXIOU, H.; ELLIS, D.H. **Descriptions of medical fungi**. David Ellis, 2017.
- KONDORI, N.; TEHRANI, P.A.; STRÖMBECK, L.; FAERGEMANN, J. Comparison of dermatophyte PCR kit with conventional methods for detection of dermatophytes in skin specimens. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3-4, p. 237-241, 2013.
- KONEMAN, E.; WINN, J.R.W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERBER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6a ed. Rio de Janeiro: MEDSI. 2008, 1760p.

KORNILŁOWICZ-KOWALSKA, T.; BOHACZ, J. Some correlations between the occurrence frequency of keratinophilic fungi and selected soil properties. **Acta Mycologica**, v. 37, n. 1-2, p. 101-116, 2002.

KOTRAJARAS, R. Studies on the proteolytic enzyme produced by dermatophytes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 44, n. 1, p. 1-5, 1965.

LEE, M.J.; PARK, J.S.; CHUNG, H.; JUN, J.B.; BANG, Y.J. Distribution of soil keratinophilic fungi isolated in summer beaches of the East Sea in Korea. **Korea J Med Mycol**, v. 16, p. 44-50, 2011.

LIMA, S.R.; SILVA, W.A.; SILVEIRA, M.M.; MACHADO, R.D.C.S.; DUTRA, V.; SOUSA, V.R.F. Isolation of dermatophytes from 50 asymptomatic domestic cats treated at the Federal University of Mato Grosso Veterinary-Hospital in Cuiabá, MT. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, n. 4, p. 2003-2008, 2016.

LOPES, G.; PINTO, E.; SALGUEIRO, L. Natural Products: An Alternative to Conventional Therapy for Dermatophytosis?. **Mycopathologia**, p. 1-25, 2016.

LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MANZANO-GAYOSSO, P.; MIER, T.; MÉNDEZ-TOVAR, L.J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. Exoenzymes of dermatophytes isolated from acute and chronic tinea. **Revista latinoamericana de microbiología**, v. 36, n. 1, p. 17-20, 1994.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CORAZZA, M.; D'ACHILLE, P.; PONTICELLI, C. Environmental detection of *Microsporum canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n. 6, p. 323-328, 2003.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical veterinary microbiology**. 2. ed. Inglaterra: Elsevier Health Sciences, 2013. 901 p.

MEEVOOTISOM, V.; NIEDERPRUEM, D.J. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 17, n. 2, p. 91-106, 1979.

MIRANDA, M.F.; SILVA, A.J. Vinyl adhesive tape also effective for direct microscopy diagnosis of chromomycosis, lobomycosis, and paracoccidioidomycosis. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 52, n. 1, p. 39-43, 2005.

MONODI, M. Secreted proteases from dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 285, 2008.

MORIELLO, K. Feline dermatophytosis: Aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 16, n. 5, p. 419-431, 2014.

MORIELLO, K.A.; COYNER, K.; PATERSON, S.; MIGNON, B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary dermatology**, v. 28, n. 3, p. 266-e68, 2017.

MUHSIN, T.M.; AUBAID, A.H.; AL-DUBOON, A.H. Extracellular enzyme activities of dermatophytes and yeast isolates on solid media. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 465-469, 1997.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PAPINI, R.; FIASCHI, M.; MANCIANTI, F. Canine and feline dermatophytosis due to *Microsporium gypseum*: a retrospective study of clinical data and therapy outcome with griseofulvin. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 23, n. 3, p. 164-167, 2013.

NEVES, R.C.D.S.M.; CRUZ, F.A.C.S.D.; LIMA, S.R.; TORRES, M.M.; DUTRA, V.; SOUZA, V.R.F. Retrospectiva das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso, nos anos de 2006 a 2008. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, 2011.

NEWBURY, S.; MORIELLO, K.A. Feline dermatophytosis: Steps for investigation of a suspected shelter outbreak. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 16, n. 5, p. 407-418, 2014.

NEWBURY, S.; MORIELLO, K.A.; KWOCZKA, K.W.; VERBRUGGE, M.; THOMAS, C. Use of itraconazole and either lime sulphur or Malaseb Concentrate Rinse® to treat shelter cats naturally infected with *Microsporium canis*: an open field trial. **Veterinary dermatology**, v. 22, n. 1, p. 75-79, 2011.

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

PASCOE, R. R.; CONNOLE, M. D. Dermatomycosis due to *Microsporium gypseum* in horses. **Australian Veterinary Journal**, v. 50, n. 9, p. 380-383, 1974.

PIMENTA, F.P.; SOUZA, M.C.; PEREIRA, G.A.; HIRATA JR.R.; CAMELLO, T.C.F.; MATTOS-GUARALDI, A.L. DNase test as a novel approach for the routine screening of *Corynebacterium diphtheriae*. **Letters in applied microbiology**, v. 46, n. 3, p. 307-311, 2008.

PONTES, Z.B.V.S.; OLIVEIRA, A.C.D.; GUERRA, F.Q.S.; PONTES, L.R.D.A.; SANTOS, J.P.D. Distribution of dermatophytes from soils of urban and rural areas of cities of Paraíba state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 6, p. 377-383, 2013.

PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

PROVERBIO, D.; PEREGO, R.; SPADA, E.; DE GIORGI, G.B.; DELLA PEPA, A.; FERRO, E. Survey of dermatophytes in stray cats with and without skin lesions in Northern Italy. **Veterinary medicine international**, v. 2014, 2014.

QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2005. 512 p.

REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; JAHANGIRI, A.; MAHMOUDABADI, A.Z.; NAJAFZADEH, M.J.; NOURIPOUR-SISAKHT, S.; MAKIMURA, K. Morpho-molecular

- characterization of soil inhabitant dermatophytes from Ahvaz, Southwest of Iran, a high occurrence of *Microsporum fulvum*. **Mycopathologia**, v. 182, n. 7-8, p. 691-699, 2017.
- RIPPON, J.W. Extracellular collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. **Journal of bacteriology**, v. 95, n. 1, p. 43-46, 1968.
- RIPPON, J.W.; VARADI, D.P. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 50, n. 1, p. 54-58, 1968.
- SHAQRA, Q.A.; AL-JAMAIEN, H.; AL ZOUBI, M. Isolation of soil dermatophytes from three distinct geographic locations in Jordan. **fungus ecology**, v. 5, n. 2, p. 274-276, 2012.
- SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H.; KHOSRAVI, A.R. *In vitro* evaluation of antifungal susceptibility and keratinase, elastase, lipase and DNase activities of different dermatophyte species isolated from clinical specimens in Iran. **Mycoses**, v. 59, n. 11, p. 710-719, 2016.
- SHARMA, A.; CHANDRA, S.; SHARMA, M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. **Mycoses**, v. 55, n. 5, p. 410-415, 2012.
- SHARMA, A.K.; NEGI, S.; SHARMA, V.; SAXENA, J. Isolation and Screening of Protease Producing Soil Fungi. **Advance Pharmaceutical Journal**, v. 2, n. 3, p. 100-104, 2017.
- SIESENOP, U.; BÖHM, K.H. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. **Mycoses**, v. 38, n. 5-6, p. 205-209, 1995.
- SIMPANYA, M.F. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 1-12, 2000.
- SÖDERLING, E.; PAUNIO, K. U. Conditions of production and properties of the collagenolytic enzymes by two *Bacillus* strains from dental plaque. **Journal of Periodontal Research**, v. 16, n. 5, p. 513, 1981.
- TABART, J.; BALDO, A.; VERMOUT, S.; NUSGENS, B.; LAPIERE, C.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. **Journal of medical microbiology**, v. 56, n. 7, p. 971-975, 2007.
- TERRENI, A.A.; GREGG, W.B.; MORRIS, P.R.; DISALVO, A.F. *Epidermophyton floccosum* infection in a dog from the United States. **Sabouraudia**, v. 23, n. 2, p. 141-142, 1985.
- URIBE, M.P.; CARDONA-CASTRO, N. Mecanismos de adherencia e invasión de dermatofitos a la piel. **CES Medicina**, v. 27, n. 1, p. 67-76, 2013.
- VANBREUSEGHEM, R. Technique Biologique Pour l'isolement des Dermatophytes du Sol. **Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale**, Antwerp, v. 32, p. 173-178, 1952.
- VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 267, 2008.

VIANI, F.C.; SANTOS, J.D.; PAULA, C.R.; LARSON, C.E.; GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 463-468, 2001.

VIANI, F.C.; VIANI, P.R.C.; RIVERA, I.N.G.; DA SILVA, E.G., PAULA, C.R.; GAMBALE, W. Extracellular proteolytic activity and molecular analysis of *Microsporium canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Revista iberoamericana de micología**, v. 24, n. 1, p. 19, 2007.

WESTHOFF, D.; ORVEILLON, F.X.; FARNOW, D.; KLÖS, M.C.; ELBERS, K. Safety of a non-adjuvanted therapeutic vaccine for the treatment of feline dermatophytosis. **Veterinary Record**, v. 167, n. 23, p. 899-903, 2010.

WESTHOFF, D.K.; KLOES, M.C.; ORVEILLON, F.X.; FARNOW, D.; ELBERS, K.; MUELLER, R.S. Treatment of feline dermatophytosis with an inactivated fungal vaccine. **The Open Mycology Journal**, v. 4, n. 1, 2010.

ZAITZ, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M.D. **Compêndio de micologia médica**. Rio de Janeiro: MEDSI Médica e Científica, 1998. 434 p.

ZIGLIOLI, V.; PANCIERA, D.L.; LEROITH, T.; WIEDERHOLD, N.; SUTTON, D. Invasive *Microsporium canis* causing rhinitis and stomatitis in a cat. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 6, p. 327-331, 2017.

6 ANEXOS

Anexo A - Meios de Cultura e Soluções

- Agar seletivo para fungos patogênicos[®] (Merck[®])

- Peptona de farinha de soja 10,0 g
- Dextrose 10,0 g
- Cicloheximida 0,40 g
- Cloranfenicol 0,05 g
- Ágar-ágar 12,5 g
- Água destilada 1000 mL

- Agar Fungobiotic[®] (Himedia[®])

- Peptona de farinha de soja 10,0 g
- Dextrose 10,0 g
- Cicloheximida 0,50 g
- Cloranfenicol 0,05 g
- Ágar-ágar 15,0 g
- Água destilada 1000 mL

- Agar Sabouraud dextrose (Himedia[®])

- Peptona micológica 10,0 g
- Dextrose 40,0 g
- Ágar-ágar 15,0 g
- Água destilada 1000 mL

- Caldo Sabouraud dextrose

- Proteose peptona (MicroMED[®]) 10,0 g
- Dextrose (Sigma[®]) 40,0 g
- Água destilada 1000 mL

- DTM[®] (BD[®])

- Peptona de farinha de soja 10,0 g
- Dextrose 10,0 g
- Cicloheximida 0,50 g
- Cloranfenicol 0,10 g
- Gentamicina 0,10 g
- Vermelho de fenol 0,20 g
- Ágar-ágar 24,0 g
- Água destilada 1000 mL

- Meio com substrato para produção de enzimas

- Queratina (chifre bovino em pó), ou Elastina de ligamento de pescoço bovino (Sigma[®]), ou Colágeno (Drogavet[®]) 3,00 g

- MgSO₄ (Vetec[®]) 6,00 g
 - CaCl₂ (Vetec[®]) 0,111 g
 - Protovit[®] (Roche[®]) 1 mL
 - Água destilada 1000 mL
- Solução Tris-HCl/CaCl₂ (pH 8,0/pH 7,2)**
- Tris-Base (Merck[®]) 12,1 g
 - CaCl₂ (Vetec[®]) 111,1 mg
 - HCl (Vetec[®]) necessário para atingir pH desejado
 - Água destilada 1000 mL
- Solução tampão fosfato (pH 7,0)**
- Solução A:
- Dissolver 27,6 g de NaH₂PO₄H₂O (fostato monossódico) (Vetec[®])
 - Água destilada Completar até 1000 mL
- Solução B:
- Dissolver 53,65 g de NaH₂HPO₄H₂O (fostato dissódico) (Vetec[®])
 - Água destilada Completar até 1000 mL
- Solução final:
- Solução A 195,0 mL
 - Solução B 305,0 mL
 - Água destilada 500,0 mL
- Agar teste DNase (Difco[®])**
- Triptose 20,0 g
 - Ácido desoxirribonucleico 2,00 g
 - Cloreto de sódio 5,00 g
 - Ágar-ágar 15,0 g
 - Água destilada 1000 mL
- Agar para avaliação de lipase**
- Proteose peptona (MicroMED[®]) 10,0 g
 - NaCl (Vetec[®]) 5,00 g
 - CaCl₂ (Vetec[®]) 0,10 g
 - Tween 20 (Isofar[®]) 10,0 mL
 - Ágar-ágar (Dinâmica[®]) 20,0 g
 - Água destilada 1000 mL
- Meio para avaliação da gelatinase**
- Proteose peptona (MicroMED[®]) 5,00 g
 - Extrato de carne (Himedia[®]) 3,00 g
 - Gelatina (Merck[®]) 120 g
 - Água destilada 1000 mL