

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA ENTRE
ISOLADOS DE *Microsporium canis***

Fernanda Vieira Amorim da Costa

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TESE DE DOUTORADO

**DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA ENTRE
ISOLADOS DE *Microsporium canis***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Subárea: Microbiologia. Especialidade: micologia.

Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva

Porto Alegre, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Fernanda Vieira Amorim da Costa

DETERMINAÇÃO DA VARIABILIDADE GENOTÍPICA ENTRE
ISOLADOS DE *Microsporium canis*

Aprovada em

APROVADO POR:

Prof. Dr. Laerte Ferreira – UFRGS – RS
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Sérgio da Silva Ceroni – UFRGS – RS
Co-orientador

Profª. Dra. Daniela Isabel Brayer Pereira – UFPEL – RS
Membro da Comissão

Profª. Dra. Silvia Dias de Oliveira – PUC – RS
Membro da Comissão

Prof. Dr. Alexandre Tavares de Oliveira – UFCSPA – RS
Membro da Comissão

Ao meu marido, João Marcos, pelo amor e companheirismo e, acima de tudo, pelo incentivo e ajuda nos momentos mais difíceis. Por entender a minha ausência nos momentos de trabalho e me apoiar e sempre colaborar para a realização dos meus sonhos.

Ao meu filho Henrique, que tem me proporcionado indescritível felicidade desde o seu nascimento.

Aos meus gatos, Nenê, Miu e Tita, por despertarem em mim uma enorme paixão pelos felinos domésticos e por me estimularem a zelar pelo bem-estar e saúde de todos eles.

À minha família, pela educação e incentivo na minha formação profissional.

AGRADECIMENTOS

A Laerte Ferreira e Sérgio Ceroni da Silva – meus orientadores, pelo exemplo profissional, ensinamentos e estímulo.

A Marconi Rodrigues Farias – meu amigo, pelo exemplo profissional, pela amizade e confiança, por ter me proporcionado meios para a realização deste trabalho de pesquisa.

A Luiza Amaral de Castro – por todos os ensinamentos, paciência, amizade e ajuda sempre e nos momentos mais difíceis.

A Daniele Bier, por ter me proporcionado meios para a realização deste trabalho de pesquisa e por participar e ajudar no experimento.

A Caroline, Edna, Andrea, Helena, Laura, Camila e Gabriela – pela amizade, companheirismo e por estarem sempre prontas a me ouvir e me ajudar.

A equipe do setor de patologia veterinária da UFRGS – pelo exemplo profissional, por me ceder o espaço para a realização do experimento e pela agradável convivência.

A Heloisa Justen Moreira de Souza, por sempre ter participado e me incentivado na construção da minha carreira profissional, por todos os ensinamentos e sábias orientações, sempre.

RESUMO

Microsporium canis é um dermatófito zoofílico e o fungo mais frequentemente isolado de cães e gatos, de crianças com *tinea capitis* e de adultos com *tinea corporis*. Ainda não se conhece as possíveis variáveis envolvidas no estabelecimento de infecções clínicas ou subclínicas em cães e gatos, assim como os fatores envolvidos na transmissão de *M. canis* para os seres humanos. Diversas técnicas de biologia molecular falharam em demonstrar variabilidade genética entre diferentes linhagens de *M. canis*, porém, estudos recentes indicam que a utilização de *primers* mais discriminatórios, como os marcadores microsátélites, possibilite a detecção de diferentes genótipos de *M. canis*. Os objetivos deste trabalho de pesquisa foram: identificar e comparar o genótipo de *M. canis* isolados de cães e gatos sintomáticos e assintomáticos e de seres humanos utilizando marcadores microssatélites e investigar uma possível correlação entre as características genótípicas e dados epidemiológicos de *M. canis* isolados de cães, gatos e seres humanos. Foram incluídos no estudo isolados de 102 cães e gatos sintomáticos e assintomáticos e de pacientes humanos com *tinea* nos quais se isolou o *M. canis* durante os anos de 2006 a 2010. Essas amostras foram provenientes de Curitiba, Porto Alegre, Florianópolis e Cuiabá. Dentre elas, 37 eram de gatos sintomáticos, 35 de gatos assintomáticos, 19 de pacientes humanos sintomáticos, 9 de cães assintomáticos e 2 de cães sintomáticos. A amplificação da região de microsátélites do DNA foi realizada utilizando dois *primers*, McGT13 e McGT17, a qual possibilitou a formação de grupos de acordo com o grau de similaridade genética baseada no número de repetições nessas duas regiões do DNA do *M. canis*. Os loci Mc(GT)13 e Mc(GT)17 revelaram 3 e 6 alelos, variando de 2 e 5 repetições de dinucleotídeos dentro de cada locus, respectivamente. Dos 14 genótipos e 5 grandes grupos formados após análise da árvore filogenética gerada pelo método Dc, 1 foi compartilhado por 26 isolados, outro por 21, um por 12 isolados e outros dois com 11 isolados cada um. Outros dois pequenos grupos foram formados com 7 e 5 isolados cada. Os marcadores microssatélites possibilitaram a identificação, o estudo filogenético e a comparação dos isolados de *M. canis* oriundos de gatos, cães e pacientes humanos incluídos no estudo. Apesar da formação de grupos geneticamente relacionados, não houve correlação entre as linhagens e os dados epidemiológicos analisados entre as isolados, incluindo fonte, sintomatologia, quadro clínico, raça, idade, sexo, moradia e localização geográfica.

ABSTRACT

Microsporium canis is a zoophilic dermatophyte and the most commonly isolated fungi from dogs, cats, children with *tinea capitis* and adults with *tinea corporis*. There are unknown variables in establishment of clinical or subclinical infection in dogs and cats and also in *M. canis* transmission to humans. Several molecular techniques failed to show genetic variability between different strains of *M. canis*, but recent studies indicate that the use of more discriminatory primers, as microsatellite markers, may detect different genotypes of this dermatophyte. This study has as objectives to identify and compare *M. canis* strains genotype isolated from symptomatic and asymptomatic dogs and cats and from people with dermatophytosis using microsatellite technique and to investigate a possible correlation between epidemiologic data and genotypic characteristics of *M. canis* isolated from dogs, cats and people. One hundred and two strains of *M. canis* isolated from symptomatic and asymptomatic dogs and cats and people with *tinea* between 2006 and 2010 were included in this study. These strains were from Curitiba, Porto Alegre, Florianópolis and Cuiaba. Among them, 37 were from symptomatic cats, 35 from asymptomatic cats, 19 from people with *tinea*, 9 from asymptomatic dogs and 2 from symptomatic dogs. Amplification of microsatellite DNA region was performed using two primers, McGT13 e McGT17, which allowed the formation of groups according to the degree of genetic similarity based on the amount of repetition in these two regions of *M. canis* DNA. Loci Mc(GT)13 e Mc(GT)17 revealed 3 and 6 alleles, varying between 2 and 5 dinucleotide repeats within each locus, respectively. Of the 14 genotypes and 5 major groups formed after phylogenetic tree analysis generated by DC method, 1 was shared by 26 strains, the other by 21, one by 12 strains and another two with 11 strains each. Two other small groups were formed with seven and five isolates each. Microsatellite markers allowed identification, phylogenetic analysis and comparison of *M. canis* strains isolated from cats, dogs and people included in this study. Despite the formation of genetically related groups, there was no correlation between the lineage and epidemiologic characteristics, including source, symptoms, clinical picture, breed, age, sex, housing and geographical location.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Produtos de amplificação do marcador microssatélite McGT13 de isolados de *M. canis* de pacientes humanos e gatos no Brasil. Linhas 1, 10 e 20 - marcador de 100 pb, Linhas 3-6 (gatos assintomáticos), 8-9 (humano e gato assintomático), 12 (humano) e 14-19 (humanos).....36
- Figura 2 - Produtos de amplificação do marcador microssatélite McGT17 de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos no Brasil. Linhas 1, 10 e 20 - marcador de 100 pb, Linhas 2-4 (gatos assintomáticos) 5-9 (cães assintomáticos), 11 (cão assintomático), 13-19 (gatos sintomáticos).....36
- Figura 3 - Árvores filogenéticas de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos geradas pelo algoritmo UPGMA a partir da análise de marcadores microssatélites McGT13 e McGT17. A – Método Dc. B – Método Dm. C – Método Dmu2.37
- Figura 4 - Árvore filogenética de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos geradas pelo algoritmo UPGMA baseada no método de distância genética Dc (à esquerda) a partir da análise de marcadores microssatélites McGT13 e McGT17. * – Dados não coletados. N/A – Não aplicável.....38

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Deoxyribonucleic acid Ácido desoxirribonucleotídico
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso
RLFPs	Restriction fragment length polymorphisms Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
ITS	Internal transcribed spacer Espaçador interno transcrito
RNA	Ribonucleic acid Ácido ribonucleotídico
KOH	Hidróxido de potássio
MTD	Meio de teste para dermatófitos
PCR	Polymerase chain reaction Reação em cadeia da polimerase
AFLPs	Amplified fragment length polymorphism Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados
qPCR	PCR em tempo real
NTS	Non-transcribed spacer Espaçador não transcrito
ISSR	Inter-single-sequence-repeat Sequência simples repetida interna
SSR	Simple Sequence Repeats Sequência simples repetida
STR	Short Tandem Repeats Repetições curtas enfileiradas
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean Agrupamento aos pares pela média aritmética não ponderada
MEGA	Molecular evolutionary genetics analysis
S.R.D.	Sem raça definida

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Dermatófitos	14
2.2	Dermatofitose em cães, gatos e seres humanos	15
2.3	Diagnóstico	19
2.3.1	Exame macroscópico com a lâmpada de Wood.....	19
2.3.2	Exame microscópico direto.....	20
2.3.3	Cultura fúngica.....	20
2.3.3.1	Meio, incubação e interpretação	21
2.3.3.2	Confirmação microscópica	21
2.3.4	Achados histopatológicos	22
2.4	Métodos moleculares aplicados aos dermatófitos.....	22
2.4.1	Diagnóstico molecular	22
2.4.2	Variabilidade genética entre linhagens	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1	Animais e seres humanos estudados	28
3.1.1	Animais Sintomáticos	28
3.1.2	Animais Assintomáticos	29
3.1.3	Seres Humanos.....	29
3.2	Análise molecular dos microssatélites	30
3.2.1	Extração do DNA.....	30
3.2.2	Amplificação e classificação dos marcadores microssatélites do DNA através da PCR.....	31
3.2.3	Cálculo do número de repetições e sequenciamento de DNA.....	32
3.2.4	Análise dos dados	33
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Identificação e comparação dos genótipos de <i>M. canis</i> utilizando marcadores microssatélites	35
4.2	Correlação entre as características genótípicas e dados epidemiológicos de <i>M. canis</i> em gatos e seres humanos no Brasil.....	39
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	45
7	PERSPECTIVAS	46
	REFERÊNCIAS	47
	APÊNDICE A - Questionário utilizado para coletar dados dos animais sintomáticos	59
	APÊNDICE B - Aspectos clínicos e anamnese dos animais sintomáticos incluídos no estudo	60
	APÊNDICE C - Anamnese dos animais assintomáticos incluídos no estudo	61
	APÊNDICE D - Sinais clínicos e anamnese das pacientes humanos incluídos no estudo	62

1 INTRODUÇÃO

A dermatofitose é uma infecção micótica cutânea superficial, de evolução subaguda ou crônica, causada por uma ou mais espécies de fungos queratinofílicos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, os quais são denominados dermatófitos (DeBOER e MORIELLO, 2006; OUTERBRIDGE, 2006; ZAITZ e PROENÇA, 1988). A doença é facilmente transmitida de uma espécie animal para outra, assim como de animais para o homem e, ocasionalmente, do homem para os animais (RICHARD *et al.*, 1994).

Os principais agentes etiológicos das dermatofitoses em cães e gatos são *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*, os quais são dotados de alta infectividade e baixas patogenicidade e virulência (CABAÑES *et al.*, 1997; CARETTA *et al.*, 1989; DUBUGRAS *et al.*, 1992; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995; OUTERBRIDGE, 2006).

A doença ocorre por infecção de tecidos queratinizados da epiderme, do epitélio folicular e seus anexos, como pêlos e garras, e é caracterizada por alopecia multifocal, descamação e lesões circulares (CAFARCHIA *et al.*, 2006). Ela é constituída de quadros de baixa mortalidade, porém, é bastante frequente na clínica dermatológica de animais e humanos e possui distribuição mundial (ALY, 1994; DUBUGRAS *et al.*, 1992; LUNDER e LUNDER, 1992).

O gato doméstico é apontado como um hospedeiro natural e um reservatório de *M. canis*, o qual pode ser frequentemente isolado dos pêlos de animais clinicamente saudáveis (BAXTER, 1973; BETANCOURT *et al.*, 2009; CAFARCHIA *et al.*, 2006; GAMBALE *et al.*, 1993; IORIO, 2007; MIGNON e LOSSON, 1997; SEGUNDO *et al.*, 2004). A espécie se comporta como carreadora assintomática passiva de arthroconídios dermatofíticos em índices que variam de 2,2% a 88% dos casos (BAXTER, 1973; BETANCOURT *et al.*, 2009; GAMBALE *et al.*, 1993; QUAIFE e WOMAR, 1982; ROMANO *et al.*, 1997; SPARKES *et al.*, 1994; WOODGYER, 1977; ZAROR *et al.*, 1986). Essa variabilidade pode ser resultante de características individuais dos animais, mas é mais provável que ela reflita as condições ambientais e o manejo desses gatos (SPARKES *et al.*, 1994). O *M. canis* não é comumente isolado de cães assintomáticos (ATES *et al.*, 2008; BAXTER, 1973).

Por estes motivos, a espécie felina é considerada a principal fonte de contágio para seres humanos e outros animais (BASSANESI *et al.*, 1993; BAXTER, 1973; LUNDER e LUNDER, 1992; MIGNON *et al.*, 1999; RADENTZ, 1991; THOMAS *et al.*, 1989). Estima-se que a maioria das dermatofitoses humanas com origem em fungos zoofílicos seja causada por *M. canis* (SCOTT e HORN, 1987; SCOTT *et al.*, 2001). Este dermatófito é o principal agente etiológico da dermatofitose em crianças de um a 12 anos de idade (BAXTER, 1973; BRAJAC *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2001; LUNDER e LUNDER, 1992; MARCHISIO *et al.*, 1996; SEGUNDO *et al.*, 2004) e também naquelas com menos de 30 dias de idade (ZAROR *et al.*, 1985). Provavelmente, isso ocorra porque crianças e adolescentes carregam e acariciam inadvertidamente os animais portadores sintomáticos ou assintomáticos do agente etiológico, em sua maioria filhotes oriundos de gatis, da rua ou de abrigos (BASSANESI *et al.*, 1993; BAXTER, 1973; DUBUGRAS *et al.*, 1992; FERNANDES *et al.*, 2001; PIER *et al.*, 1994; ZAROR *et al.*, 1985).

Desta maneira, há a necessidade de se conhecer as possíveis variáveis envolvidas no estabelecimento de infecções clínicas ou subclínicas em gatos, assim como os fatores envolvidos na transmissão de *M. canis* para os seres humanos. Aparentemente, a relação entre a apresentação clínica da doença e os fatores de patogenicidade fúngica ainda está sendo estabelecida.

Diversas enzimas proteolíticas diferentes (principalmente queratinases, elastases e collagenases) já foram isoladas de fungos dermatófitos *in vitro* e *in vivo*, e as suas funções estão envolvidas na iniciação e progressão da infecção (ABDEL-RAHMAN, 2001; BROUTA *et al.*, 2001; BROUTA *et al.*, 2002; DESCAMPS *et al.*, 2002; MIGNON *et al.*, 1998a; MIGNON *et al.*, 1998b; SIMPANYA e BAXTER, 1996). A habilidade de produzir essas proteinases pode ter um papel importante na patogênese da infecção cutânea de humanos e animais, influenciando na sua reação contra os mecanismos de defesas do hospedeiro e providenciando seu requerimento nutricional (MIGNON *et al.*, 1998b; SIMPANYA e BAXTER, 1996). O número e a quantidade de enzimas produzidas variam de cepa para cepa e pode explicar, em parte, a variabilidade de apresentação clínica da doença (ABDEL-RAHMAN, 2001; DeBOER e MORIELLO, 2006; SIMPANYA *et al.*, 1998; VIANI *et al.*, 2001).

Entretanto, existem até hoje resultados conflitantes sobre a produção enzimática entre isolados de animais sintomáticos e assintomáticos. Simpanya e Baxter (1996), não verificaram produções de diferentes enzimas entre *M. canis* isolados de gatos

sintomáticos e assintomáticos, e os isolados oriundos de gatos carreadores produziram uma alta quantidade de proteinases, quando comparados a humanos e cães (SIMPANYA e BAXTER, 1996). Mignon *et al.* (1998b), isolou, caracterizou e identificou, através de imunofluorescência, a produção e expressão de uma protease queratinolítica do *M. canis* em gatos naturalmente infectados. A produção *in vivo* dessa queratinase não pareceu ser um fator diretamente responsável pela manifestação clínica vista em gatos sintomáticos, visto que um isolado de *M. canis* oriundo de gato assintomático demonstrou produzir esta enzima *in vitro*. Porém, os autores não quantificaram a produção enzimática e demonstraram a presença desta apenas nos tecidos dos animais (MIGNON *et al.*, 1998b). Já Viani *et al.* (2001) observou que havia maior atividade de queratinase em amostras isoladas de cães e gatos sintomáticos do que assintomáticos, através de infecção experimental de porcos da Guiné. Posteriormente, confirmaram maior atividade enzimática de queratinase e elastase em isolados de gatos sintomáticos, quando comparados com os assintomáticos, porém, não houve diferença genética entre as linhagens avaliadas (VIANI *et al.*, 2007).

Apesar de os dermatófitos seguirem um desenvolvimento assexuado e raramente se reproduzirem sexualmente, é evidente que diferenças relacionadas à virulência ocorrem devido a genótipos específicos ainda não detectados pelas técnicas recentemente utilizadas (VIANI *et al.*, 2007). A tipificação de linhagens explora a diversidade genética dos dermatófitos, abrangendo questões clinico-epidemiológicas relevantes, principalmente em relação à natureza das infecções que eles causam (ABDEL-RAHMAN, 2008).

Diversas técnicas de DNA *fingerprinting* demonstraram existir uma diversidade entre isolados de *M. canis* (GRÄSER *et al.*, 2000), *T. mentagrophytes* (FAGGI *et al.*, 2001; GRÄSER *et al.*, 1998; KAC *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1997) *T. rubrum* (BAEZA e GIANNINI, 2004; GRÄSER *et al.*, 2007; OHST *et al.*, 2004) e *Trichophyton violaceum* (OHST *et al.*, 2004), levando inclusive a uma reclassificação potencial de algumas espécies de dermatófitos.

Porém, não existem estudos que comparem o genótipo de isolados de *M. canis* provenientes de gatos sintomáticos e assintomáticos, e também de seres humanos no Brasil, respondendo a questão relacionada a uma possível variação genotípica entre os mesmos. A grande incidência de gatos assintomáticos carreadores de *M. canis* pode estar relacionada a uma imunidade adquirida durante a infecção primária (DeBOER e MORRIELO, 1993) ou à existência de linhagens menos virulentas capazes de produzir menos dano tecidual aparente (VIANI *et al.*, 2007). As infecções humanas causadas por *M. canis* tendem a ser moderadamente inflamatórias, mas também há casos de querions e infecções altamente inflamatórias em populações de pacientes em condições de saúde semelhantes (SHARMA *et al.*, 2007). Por isso, é importante se avaliar se os animais hospedeiros abrigam genótipos mistos de *M. canis* que diferem em seu grau de virulência a seres humanos e se existem diferentes graus de predileção e patogenicidade entre esses genótipos.

No que diz respeito especificamente ao *M. canis*, diversas técnicas falharam em demonstrar variabilidade genética entre diferentes linhagens, incluindo RAPD, RLFPs, amplificação das regiões ITS 1 e ITS 2 do RNA ribossômico e utilização de *primer* repetitivo (BRILHANTE *et al.*, 2005a; BRILHANTE *et al.*, 2005b; FAGGI *et al.*, 2001; VIANI *et al.*, 2007, YU *et al.*, 2004), embora Gräser *et al.* (2000) tenha encontrado uma pequena diferença genética entre dois isolados.

Estudos indicam que a utilização de *primers* mais discriminatórios, como os marcadores microsatélites, em uma maior quantidade e variedade de amostras oriundas de diferentes regiões geográficas, pode possibilitar a detecção de diferentes genótipos de *M. canis*, relacionando-os às suas manifestações clínicas em animais e à maior ou menor virulência na infecção de seres humanos (CANO *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2007).

Os objetivos deste trabalho foram: identificar e comparar o genótipo de *M. canis* isolados de cães e gatos sintomáticos e assintomáticos e de seres humanos utilizando os marcadores microsatélites e investigar uma possível correlação entre as características genotípicas e dados epidemiológicos de *M. canis* isolados de cães, gatos e seres humanos, incluindo fonte, sintomatologia, quadro clínico, raça, idade, sexo, moradia e localização geográfica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dermatófitos

Os dermatófitos podem ser divididos em três grupos baseado no seu habitat natural (ALY, 1994; MEDLEAU e RISTIC, 1992; OUTERBRIDGE, 2006; WHITE *et al.*, 2008; ZAITZ e PROENÇA, 1988). Aqueles que são **geofílicos** são habitantes do solo rico em matéria orgânica, infectam humanos e animais. Os dermatófitos **zoofílicos** são adaptados à pele e aos pêlos dos animais e infectam também humanos. Os **antropofílicos** são adaptados à pele e anexos dos seres humanos, porém raramente infectam animais e não sobrevivem no solo.

A maioria dos casos de dermatofitose em cães e gatos é causada por *M. canis*, *T. mentagrophytes* ou *M. gypseum* (CABAÑES *et al.*, 1997; CABAÑES, 2000; CARETTA *et al.*, 1989; COPETTI *et al.*, 2006; DUBUGRAS *et al.*, 1992; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995). Em geral, a dermatofitose canina tem baixa prevalência e há igual proporção do isolamento fúngico entre animais sintomáticos e assintomáticos. Já os felinos têm frequentemente uma prevalência acima de 20% e maior número de casos entre os animais que apresentam lesões clínicas compatíveis com a doença (CABAÑES *et al.*, 1997; CABAÑES, 2000; LEWIS *et al.*, 1991; SPARKES *et al.*, 1993).

Em geral, a infecção tem maior prevalência em climas subtropicais e tropicais e em gatos que vivem em gatis/abrigos endêmicos para a doença, que participam de exposições ou que possuem acesso à rua (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO e DeBOER, 1991b; MORIELLO *et al.*, 1994; QUAIFFE e WOMAR, 1982; ZAROR *et al.*, 1986). Em gatis/abrigos com histórico de dermatofitose, virtualmente todos os gatos possuem culturas positivas para *M. canis* (IORIO, 2007; MORIELLO e DeBOER, 1991b). Já em locais aonde não há histórico da doença ou quando o gato não tem acesso à rua ou vive sozinho, o fungo não é isolado dos pêlos dos felinos (DeBOER e MORIELLO, 1995; MORIELLO e DeBOER, 1991b; THOMAS *et al.*, 1989) ou é isolado em índices muito baixos (IORIO, 2007; SPARKES *et al.*, 1994). O *M. canis* não é comumente isolado de cães assintomáticos (ATES *et al.*, 2008; BAXTER, 1973). Os dermatófitos geralmente isolados de cães que não apresentam lesões clínicas são *T. terrestre* e *M. gypseum* (dermatófitos geofílicos) (CAFARCHIA *et al.*, 2006).

Fungos dermatófitos patogênicos, como *M. canis*, não devem ser considerados como microbiota normal de cães e gatos, pois se isso fosse verdade, eles seriam rotineiramente isolados de animais saudáveis, independentemente de região geográfica, acesso ao ambiente externo ou domesticação (CABAÑES, 2000; DeBOER e MORIELLO, 2006). Além disso, concluiu-se que é possível isolar patógenos de animais saudáveis, significando que existe uma infecção (óbvia ou subclínica) ou exposição a um ambiente contaminado (MORIELLO e DeBOER, 1991b, DeBOER e MORIELLO, 2006). Porém, se o animal não possui uma lesão evidente, é impossível se distinguir as duas possibilidades (BAXTER, 1973; DeBOER e MORIELLO, 2006). Desta maneira, todo animal que possui uma cultura positiva deve ser tratado porque a dermatofitose é uma importante zoonose (DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO e DeBOER, 1991b, THOMAS *et al.*, 1989).

2.2 Dermatofitose em cães, gatos e seres humanos

A exata prevalência da doença é desconhecida porque não se trata de uma enfermidade de comunicação obrigatória, embora seja uma zoonose (DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO, 2003). Na prática clínica, a dermatofitose é superestimada, pois seus sinais clínicos se assemelham a outras dermatopatias (DeBOER e MORIELLO, 2006). Em geral, a porcentagem de culturas positivas resultantes de casos suspeitos da doença varia de 1,7% a 60% (BALDA *et al.*, 2004; BOYANOWSKI *et al.*, 2000; BRILHANTE *et al.*, 2003; CABAÑES *et al.*, 1997; CAFARCHIA *et al.*, 2004; DUBUGRAS *et al.*, 1992; KHOSRAVI e MAHMOUDI, 2003; LEWIS *et al.*, 1991; MARCHISIO *et al.*, 1995; SPARKES *et al.*, 1993).

A prevalência da dermatofitose em alguns estudos norte-americanos está em torno de 2% (FOIL, 1998; MORIELLO, 2003). Nos três estados do sul do Brasil, dentre as amostras de cães e gatos, a porcentagem de resultados positivos para dermatófitos foi de 10,2% e 27,8%, respectivamente (COPETTI *et al.*, 2006). Em outro estudo, 5,6% das dermatopatias estudadas em 250 cães de Porto Alegre foram primariamente causadas por dermatófitos (MACHADO *et al.*, 2004). Em Curitiba, a doença afetou em torno de 1,5% dos cães no período de cinco anos (FRIESEN *et al.*, 2009). Já em São Paulo, essas porcentagens foram mais altas, de 14,2% para cães e 35% para gatos (DUBUGRAS *et al.*, 1992). No nordeste do Brasil, os índices são semelhantes aos de São Paulo (BRILHANTE *et al.*, 2003). Essa variação reflete as diferenças geográficas e a escolha

dos casos suspeitos para a realização de culturas para fungos (DeBOER e MORIELLO, 2006; FOIL, 1998).

Fatores ambientais, como aumento da umidade e da temperatura, fatores sócio-econômicos e fatores intrínsecos ao animal, como debilidade ou presença de doença concomitante, extremos de idade, comportamento selvagem, domesticação ou abrigo em locais de grandes populações, podem aumentar a prevalência da infecção em cães e gatos (CABAÑES, 2000; DeBOER e MORIELLO, 1995; MORIELLO, 2003).

A dermatofitose em gatos é duas vezes ou mais prevalente do que a dermatofitose em cães (CABAÑES, 2000; KHOSRAVI e MAHMOUDI, 2003; LEWIS *et al.*, 1991; SPARKES *et al.*, 1993). Ela é a infecção cutânea mais comum de gatos domésticos e é causada pelo *M. canis* em 90% a 100% dos casos (BOYANOWSKI *et al.*, 2000; BRILHANTE *et al.*, 2003; CABAÑES *et al.*, 1997; CHERMETTE *et al.*, 2008; DeBOER e MORIELLO, 2006; IORIO, 2007; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995; MORIELLO, 2003; SEGUNDO *et al.*, 2004). Os gatos a adquirem através do contato direto com animais doentes ou do contato indireto, a partir da exposição de propágulos fúngicos de dermatófitos presentes em ambientes contaminados, fômites e em animais carreadores assintomáticos (CHERMETTE *et al.*, 2008; DeBOER e MORIELLO, 2006).

Porém, existem muito mais gatos positivos para *M. canis* na cultura fúngica do que gatos realmente portadores de dermatofitose clínica (CABAÑES, 2000; IORIO, 2007; PIER e MORIELLO, 1998). O isolamento do dermatófito em cultura fúngica não prediz necessariamente a doença, necessitando também de evidência microscópica de infecção ativa e investigação clínica para se estabelecer o diagnóstico definitivo (PIER e MORIELLO, 1998). O significado desse isolamento em animais assintomáticos ainda permanece em discussão (MIGNON e LOSSON, 1997). Estudos indicam que o *M. canis* é mais frequentemente isolado de gatos em risco de infecção ou exposição a outros gatos infectados ou a um ambiente contaminado (IORIO, 2007; MIGNON e LOSSON, 1997; MORIELLO e DeBOER, 1991b; QUAIFFE e WOMAR, 1982).

Desta maneira, os gatos podem ser carreadores mecânicos transitórios, apresentarem lesões clínicas decorrentes da infecção ou serem assintomáticos (CHERMETTE *et al.*, 2008; DeBOER e MORIELLO, 1995; SPARKES *et al.*, 1994). Estes últimos devem apresentar pêlos positivos na microscopia e/ou ao exame com a lâmpada de Wood em lesões subclínicas, os quais são mais bem vistos após a tricotomia, mas não durante o exame clínico de rotina (MIGNON e LOSSON, 1997).

Gatos sintomáticos e assintomáticos apresentam altos níveis de imunoglobulinas IgG específicas, quando comparados a gatos que possuem culturas negativas e gatos que possuem resultado negativo sob lâmpada de Wood, chamados de carreadores mecânicos (MIGNON *et al.*, 1999). Porém, nos carreadores mecânicos, a detecção de IgG específica é mais observada em animais adultos, provavelmente devido a uma exposição prévia ao *M. canis* e desenvolvimento de imunidade humoral ou à presença de reação cruzada com outro dermatófito ou antígeno fúngico comum (MIGNON *et al.*, 1999).

A ocorrência da dermatofitose é maior em gatos da raça, provavelmente porque estes são mantidos juntos em grandes grupos, através dos quais um agente altamente infeccioso e contagioso como o *M. canis* pode facilmente se disseminar (SPARKES *et al.*, 1993). Em relação aos tipos de raças, pode ser observada maior prevalência em cães da raça Yorkshire terrier e em gatos da raça Persa (BRILHANTE *et al.*, 2003; CABAÑES *et al.*, 1997; CABAÑES, 2000; CAFARCHIA *et al.*, 2004; FRIESEN *et al.*, 2009; LEWIS *et al.*, 1991).

Em geral, machos e fêmeas são acometidos em igual proporção (BALDA *et al.*, 2004; BRILHANTE *et al.*, 2003; CABAÑES *et al.*, 1997; CAFARCHIA *et al.*, 2004; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995; SPARKES *et al.*, 1993), com algumas variações de acordo com a região estudada (DUBUGRAS *et al.*, 1992; FRIESEN *et al.*, 2009; MORIELLO e DeBOER, 1991a). Os cães e gatos jovens, com menos de dois anos de idade, são os mais acometidos pela doença (BALDA *et al.*, 2004; BAXTER, 1973; BRILHANTE *et al.*, 2003; CAFARCHIA *et al.*, 2004; DUBUGRAS *et al.*, 1992; FRIESEN *et al.*, 2009; KHOSRAVI e MAHMOUDI, 2003; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995; MORIELLO e DeBOER, 1991b; SPARKES *et al.*, 1993).

Alguns autores relatam que o número de carreadores assintomáticos do *M. canis* é maior em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina (MANCIANTI *et al.*, 1992), embora outros estudos não tenham encontrado o mesmo resultado (IORIO, 2007; MIGNON e LOSSON, 1997). Não há predileção por raça, tamanho dos pêlos, idade ou sexo entre os cães e gatos carreadores assintomáticos (BETANCOURT *et al.*, 2009; CAFARCHIA *et al.*, 2006; MIGNON e LOSSON, 1997; QUAIFFE e WOMAR, 1982).

A doença é primariamente folicular e os sinais clínicos mais comuns são: alopecia e tonsura dos pêlos, descamação e a formação de crostas melicéricas (BALDA *et al.*, 2004; DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; DeBOER e MORIELLO, 1994; FRIESEN *et al.*, 2009; SCOTT e HORN, 1987; THOMAS *et al.*,

1989). Alguns pacientes desenvolvem a lesão clássica em forma de anel, de crescimento centrífugo, cicatrização central e pápulas finas foliculares na periferia (DeBOER e MORIELLO, 2006; FRIESEN *et al.*, 2009; THOMAS *et al.*, 1989).

A dermatite granulomatosa, na forma de nódulos dérmicos ulcerados e bem-circunscritos, é infrequente (DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RAKICH, 1994; RICHARD *et al.*, 1994). Essas lesões são chamadas de pseudomicetomas, micetomas e granulomas de Majocchi e possuem um prognóstico reservado (RICHARD *et al.*, 1994). Na maioria das vezes, o *M. canis* é isolado, porém, as colônias muitas vezes não são típicas e não há macroconídios durante a avaliação microscópica (CHERMETTE *et al.*, 2008).

M. canis é o dermatófito mais isolado de crianças com infecção no couro cabeludo (*tinea capitis*) (BASSANESI *et al.*, 1993; BRAJAC *et al.*, 2004; FERNANDES *et al.*, 2001; SEGUNDO *et al.*, 2004;), sendo o reponsável por cerca de 57% das infecções nessa faixa etária (FERNANDES *et al.*, 2001). As crianças são especialmente afetadas, apresentando lesões também na face (*Tinea facialis*) ou na pele glabra do antebraço, mãos e abdome (*Tinea corporis*), e é comum a observação de microepidemias familiares e em ambientes escolares (FERNANDES *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2004). Pacientes adultos também apresentam alto índice de infecção corporal (*tinea faciei e tinea corporis*) causada por *M. canis* (BRAJAC *et al.*, 2004; MARCHISIO *et al.*, 1996; MERCANTINI *et al.*, 1995). Geralmente, há inflamação moderada (DEGREEF, 2008), mas também existem casos de dermatofitose com alto grau de inflamação, o que leva ao questionamento em relação à virulência equivalente nas linhagens de *M. canis* (SHARMA *et al.*, 2007). Além disso, pessoas transplantadas, com câncer e imunocomprometidas, principalmente pela síndrome da imunodeficiência adquirida, se comportam como grupo de risco à infecção dermatofítica (KING *et al.*, 1996; ODOM, 1994; RICHARD *et al.*, 1994).

O papel dos gatos carreadores assintomáticos na transmissão da doença para seres humanos ainda é bastante discutido (BASSANESI *et al.*, 1993; CAFARCHIA *et al.*, 2006; MIGNON e LOSSON, 1997; MORIELLO e DeBOER, 1991b; PIER e MORIELLO, 1998; SPARKES *et al.*, 1994). Sabe-se que cerca de 50% das pessoas expostas a felinos carreadores assintomáticos de arthroconídios fúngicos ou portadores de infecções subclínicas, desenvolvem lesões tegumentares (PEPIN e OXENHAM, 1986). Um estudo americano demonstrou que a dermatofitose é a zoonose mais frequente, sendo o *M. canis* o agente mais isolado e o gato a fonte da infecção em 77% dos casos

(WARNER, 1984). O *M. canis* foi isolado de 36,4% dos cães e de 53,6% dos gatos assintomáticos que coabitavam com proprietários diagnosticados com *tinea corporis* e de 14,6% dos gatos cujos proprietários não tiveram nenhum sinal da doença (CAFARCHIA *et al.*, 2006). Além disso, os gatos infectados causam substancial contaminação ambiental, provocando a presença de grande quantidade de elementos fúngicos no ar (MANCIANTI *et al.*, 2003).

Em geral, os dermatófitos são transmitidos entre animais ou para pessoas por contato direto, contato com pêlos, escamas ou crostas infectadas no ambiente ou indireto através de fômites (CHERMETTE *et al.*, 2008; DeBOER e MORIELLO, 2006; FOIL, 1998; MEDLEAU e RISTIC, 1992; MORIELLO, 2003; MORIELLO e DeBOER, 1995; SCOTT e HORN, 1987). Com relação ao *M. canis*, a fonte de infecção geralmente é um gato infectado ou fômites contaminados por eles (FOIL, 1998).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da dermatofitose causada por *M. canis* é baseado na anamnese, exame clínico, demonstração da infecção fúngica com a lâmpada de Wood, exame direto, cultura fúngica e, eventualmente, histopatologia e imunoistoquímica nos casos de pseudomicetoma (FERREIRO, 2000; MEDLEAU e RISTIC, 1992; SCOTT e HORN, 1987). Ele deve ser realizado em animais recém adquiridos, com sinais clínicos da doença ou quando há lesão compatível nos responsáveis dos animais (MORIELLO, 2003).

2.3.1 Exame macroscópico com a lâmpada de Wood

A utilização da lâmpada de Wood (ultravioleta, com comprimento de onda entre 320 e 400 nm) em ambientes escuros para o exame macroscópico dos pêlos é rápida e de fácil realização como triagem para a presença de infecção por certos dermatófitos, mas não é um método de diagnóstico definitivo (DeBOER e MORIELLO, 2006; FERREIRO, 2000; MEDLEAU e RISTIC, 1992; MORIELLO, 2001; PIER e MORIELLO, 1998).

Cerca da metade de todas as linhagens de *M. canis* demonstra fluorescência ao uso da lâmpada, diferentemente das outras espécies de dermatófitos que infectam animais, o que torna o teste insensível (DeBOER e MORIELLO, 1995; SPARKES *et*

al., 1993). Os resultados falso-negativos advêm de linhagens que não produzem o pigmento fluorescente nos pêlos infectados, quando a doença está em fase de resolução ou quando se utiliza anti-sépticos no local do exame (DeBOER e MORIELLO, 1994; FERREIRO, 2000; MEDLEAU e RISTIC, 1992; PIER e MORIELLO, 1998). Falsos positivos podem ocorrer em debris, escamas, algodão e medicações tópicas, que tipicamente produzem falsa fluorescência (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; FERREIRO, 2000; MEDLEAU e RISTIC, 1992; MORIELLO, 2001; PIER e MORIELLO, 1998; OUTERBRIDGE, 2006; THOMAS *et al.*, 1989).

2.3.2 Exame microscópico direto

Os pêlos e as escamas suspeitos devem ser embebidos em KOH de 10% a 20% e deixados dessa forma durante a noite ou aquecidos gentilmente na mesma solução durante 10 a 30 minutos para que ocorra o clareamento da queratina e a visualização dos elementos fúngicos (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992; OUTERBRIDGE, 2006; THOMAS *et al.*, 1989).

O exame direto só resulta em um diagnóstico definitivo de dermatofitose em aproximadamente 50% a 60% dos casos (BRILHANTE *et al.*, 2003; CABAÑES *et al.*, 1997; CAFARCHIA *et al.*, 2004; SPARKES *et al.*, 1993). Ele pode resultar em falsos positivos quando existem artroconídios de fungos saprófitas ou artefatos na amostra ou quando as estruturas das hastes pilosas são confundidas com elementos fúngicos (DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992). Falsos negativos podem ocorrer quando a amostra está muito escassa ou foi mal colhida (MEDLEAU e RISTIC, 1992; PIER e MORIELLO, 1998).

2.3.3 Cultura fúngica

O diagnóstico definitivo da dermatofitose é realizado preferencialmente através da cultura fúngica em meio específico para crescimento de dermatófitos, embora esse método não seja perfeitamente sensível e nem sempre específico (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992; OUTERBRIDGE, 2006; SPARKES *et al.*, 1993).

Técnicas apropriadas de coleta da amostra, exame regular das culturas em crescimento e confirmação da espécie fúngica no exame microscópico são necessários

para o desempenho ideal desse teste (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006).

2.3.3.1 Meio, incubação e interpretação

A cultura para fungos dermatófitos pode ser realizada dentro do estabelecimento veterinário, utilizando-se um meio de teste para dermatófitos (MTD) como meio de cultura (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; PIER e MORIELLO, 1998; MEDLEAU e RISTIC, 1992; OUTERBRIDGE, 2006; THOMAS *et al.*, 1989). Este meio consiste de um meio nutritivo (Agar Sabouraud dextrose) adicionado de inibidores bacterianos e de crescimento de fungos saprófitas, além de vermelho de fenol como indicador de pH (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992; MORIELLO, 2001; PIER e MORIELLO, 1998; THOMAS *et al.*, 1989). As colônias de dermatófitos crescem e são visualizadas em cinco a sete dias após a inoculação, mas as placas de cultura devem ser retidas por três semanas antes de se concluir um resultado negativo (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006). As placas devem se avaliadas diariamente, quanto à mudança de cor para vermelho ou ao crescimento de um micélio branco a amarelado e de aspecto pulverulento a algodinoso (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006). A identidade da colônia deve ser confirmada através do exame microscópico (DeBOER e MORIELLO, 1995; DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO, 2001; THOMAS *et al.*, 1989).

Na rotina laboratorial, outros meios de cultivo comumente utilizados incluem *Sabouraud* modificado com ou sem antibacterianos e cicloexamida e lactrimel (BETANCOURT *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2001).

2.3.3.2 Confirmação microscópica

Após um crescimento de sete a 10 dias, a maioria das colônias começa a produzir macroconídios, o que permitirá a identificação específica (DeBOER e MORIELLO, 2006). Ela é realizada através da aplicação de uma fita de celofane transparente em cima da superfície da colônia para coletar o micélio fúngico (DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992; OUTERBRIDGE, 2006). Em seguida, a fita é colocada, com o lado colante para baixo, sobre uma lâmina com uma gota do corante azul de algodão lactofenol e adiciona-se mais uma gota do corante sobre a fita, e depois, uma lamínula para o exame em um microscópio com aumento de 100x

(DeBOER e MORIELLO, 2006; MEDLEAU e RISTIC, 1992; MORIELLO, 2001). Se os macroconídios não estão visíveis, deve-se aguardar por mais quatro a sete dias e repetir o processo (DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO, 2001). Se uma colônia suspeita não produzir macroconídios ou se eles são difíceis de identificar, a amostra deve ser enviada para um laboratório de referência (DeBOER e MORIELLO, 2006).

2.3.4 Achados histopatológicos

A avaliação histopatológica de biópsias cutâneas não é tão sensível quanto a cultura fúngica no diagnóstico de dermatofitose (DeBOER e MORIELLO, 2006; MORIELLO, 2001). Quando a significância de um resultado de uma cultura é questionada, a demonstração do organismo numa avaliação histopatológica é definitiva (DeBOER e MORIELLO, 2006). Porém, a espécie do dermatófito em questão não pode ser identificado em um exame histopatológico necessitando, portanto, de cultura e identificação microscópica para proceder sua classificação e a terapia adequadas (MORIELLO, 2001).

A observação histopatológica de foliculite e perifoliculite aguda e subaguda é mais comum em gatos sintomáticos do que em assintomáticos (MIGNON *et al.*, 1999). Gatos assintomáticos geralmente possuem evidências de inflamação crônica e infiltração de mastócitos na derme superficial.

2.4 Métodos moleculares aplicados aos dermatófitos

2.4.1 Diagnóstico molecular

O diagnóstico laboratorial convencional de micoses cutâneas geralmente requer isolamento do dermatófito através de cultura fúngica, o que inclui períodos de incubação de duas a três semanas antes de a identificação microscópica ser realizada (BOCK *et al.*, 1994). O diagnóstico definitivo pode incluir observação macroscópica das culturas *in vitro*, exame microscópico direto da morfologia celular, testes metabólicos e, raramente, determinações sorológicas (TURIN *et al.*, 2000). Entretanto, em alguns casos, é difícil identificar claramente a espécie porque a cultura mostra uma aparência atípica ou resulta num resultado falso-negativo, além de as técnicas empregadas requererem pessoas treinadas e os métodos utilizados serem bastante

laboriosos e demorados (BRILLOWSKA-DABROWSKA *et al.*, 2010; GRÄSER *et al.*, 1998; HERMOSO DE MENDOZA *et al.*, 2010; KANBE, 2008; KAWAI, 2003; LIU *et al.*, 2001; MAKIMURA *et al.*, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1997; TURIN *et al.*, 2000; WHITE *et al.*, 2008). Além disso, segundo Gräser *et al.* (2000), deve-se dar uma atenção especial ao diagnóstico laboratorial de dermatófitos zoofilicos, em especial, as do gênero *Microsporum*, visto que as características morfológicas variam consideravelmente ao longo de poucas transferências de hospedeiros. Tais mudanças levam a uma grande diversidade de colônias, bem como de metabólitos produzidos pelo fungo.

Por estas razões, diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas para a identificação precisa das espécies de dermatófitos (KAC, 2000; KAWAI, 2003). O diagnóstico molecular da dermatofitose através da detecção e amplificação do DNA fúngico pela PCR pode ser realizado em apenas algumas horas e é extremamente sensível e específico (BOCK *et al.*, 1994; BRILLOWSKA-DABROWSKA *et al.*, 2010; CAMPA *et al.*, 2008; FAGGI *et al.*, 2001; GRÄSER *et al.*, 1998; KAC, 2000; LIU *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2000b; LIU *et al.*, 2001).

A análise dos padrões de polimorfismo por RAPD (KANO *et al.*, 1998a; KANO *et al.*, 1998b; LIU *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2000a; LIU *et al.*, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1997) e a avaliação de AFLPs ou RFLPs (KAMIYA *et al.*, 2004; KANBE *et al.*, 2003; KAWASAKI *et al.*, 1996; LEON-MATEOS *et al.*, 2006; SHEHATA *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2008) são úteis para a identificação e diferenciação dos isolados que não são claramente identificáveis através das técnicas moleculares convencionais (LEON-MATEOS *et al.*, 2006; KAC, 2000; KAWAI, 2003).

Liu e colaboradores (2000b e 2001) desenvolveram uma técnica de extração de DNA fúngico e *primers* específicos para a amplificação de *M. canis* visando um diagnóstico específico e definitivo deste tipo de dermatófito. A análise filogenética e o diagnóstico dos dermatófitos também têm sido realizados utilizando a amplificação e o sequenciamento de DNA ribossômico, incluindo as regiões 18S, 28S e ITS (CAMPA *et al.*, 2008; GRÄSER *et al.*, 2000; HARMSSEN *et al.*, 1999; LEON-MATEOS *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; MAKIMURA *et al.*, 1999; MAKIMURA *et al.*, 2001; NINET *et al.*, 2003; SHEHATA *et al.*, 2008; TURIN *et al.*, 2000; YANG *et al.*, 2008). A técnica de RFLP pode ser associada à análise da sequência de nucleotídeos da região ITS para inclusive determinar a espécie de *Microsporum* quando esta demonstrar ser atípica nas técnicas de diagnóstico tradicionais (LEON-MATEOS *et al.*, 2006).

Alguns pesquisadores ainda identificam espécies de dermatófitos utilizando um único *primer* composto por oligonucleotídeo repetitivo simples (FAGGI *et al.*, 2001; SHEHATA *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de *primers* específicos para a amplificação do gene que codifica para a enzima quitina sintetase permite que o DNA do dermatófito seja detectado direto das amostras clínicas de cães, gatos e coelhos (KANO *et al.*, 2003). Kawai (2003) relatou a identificação de espécies de dermatófitos a partir da quantificação do RNA mensageiro da actina. Recentemente, foram desenvolvidos métodos de PCR em tempo real (qPCR) para o diagnóstico altamente sensível, específico e com resultados em menos de 24 horas para o diagnóstico de dermatofitose humana (ARABATZIS *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2010). Essas técnicas prometem uma rápida identificação das espécies clínicas, mas ainda devem ser aprimoradas para o uso comercial (DeBOER e MORIELLO, 2006; KAC, 2000).

2.4.2 Variabilidade genética entre linhagens

Existem fortes evidências de que os isolados de *M. canis* encontrados na natureza tenham origem africana (KASZUBIAK *et al.*, 2004) e sejam haplóides, já que eles são capazes de se reproduzir sexualmente quando cruzados com o tipo oposto de “mating type” (WHITE *et al.*, 2008; YAMADA *et al.*, 2006).

Estudos genéticos existentes sobre as espécies de *Microsporum* são bastante limitados (KANBE, 2008). A questão a ser discutida seria se as diferenças entre os isolados determinam diferentes mecanismos de patogenicidade, diferentes graus de infecção ou diferentes perfis de resistência antimicrobiana (ABDEL-RAHMAN, 2008). Além disso, deve-se buscar a exploração de marcadores satisfatórios para a determinação de variabilidade genética e discriminação de subtipos de linhagens deste grupo de fungos (KANBE, 2008).

Embora já se reconheça uma variação genotípica (CANO *et al.*, 2005; FAGGI *et al.*, 2001; GRÄSER *et al.*, 1998; GRÄSER *et al.*, 2000; KAC *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1997; SHARMA *et al.*, 2007) e fenotípica (BRILHANTE *et al.*, 2005b; MAIA *et al.*, 2001; MORIELLO e DeBOER 1991b; SIMPANYA *et al.*, 1998) entre diferentes isolados de uma mesma espécie de dermatófito, a importância prática e aplicação clínica dessas variações ainda não foram elucidadas (DeBOER e MORIELLO, 2006). Com relação ao *M. canis*, a variabilidade bioquímica e

morfológica entre isolados de infecções superficiais e profundas em um mesmo gato já foi evidenciada (MORGANTI *et al.*, 1992).

Diversas técnicas de DNA *fingerprinting* demonstraram existir uma diversidade entre isolados de *T. mentagrophytes* (FAGGI *et al.*, 2001; GRÄSER *et al.*, 1998; KAC *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2001; MOCHIZUKI *et al.*, 1997) *T. rubrum* e *T. violaceum* (BAEZA e GIANNINI, 2004; GRÄSER *et al.*, 2007; OHST *et al.*, 2004), levando inclusive a uma reclassificação potencial de algumas espécies de dermatófitos.

A técnica de RAPD, que utiliza *primers* curtos de sequência arbitrária, permitiu a diversos pesquisadores detectar variabilidade intraespecífica entre isolados de dermatófitos. Mochizuki *et al.* (1997) obtiveram êxito na diferenciação de espécies de dermatófitos antropofílicos e encontraram uma pequena diferenciação intraespecífica entre isolados de *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*. Kac *et al.* (1999) avaliaram 46 isolados clínicos de *T. mentagrophytes*, detectando 23 genótipos diferentes com apenas um dos 15 *primers* utilizados. Entretanto, a diversidade genética encontrada não foi correlacionada com a origem geográfica dos isolados ou com o tipo de lesão clínica causada por eles. Já Kim e colaboradores (2001) avaliaram 61 cepas de *T. mentagrophytes* e encontraram 5 diferentes genótipos entre os isolados de animais, porém, o mesmo genótipo entre os isolados de origem humana. Em estudo brasileiro, foi possível detectar variabilidade intraespecífica em 5 de 10 isolados de *T. rubrum* (BAEZA e GIANNINI, 2004).

Gräser *et al.* (1998) também observaram variabilidade intraespecífica entre quatro de seis variedades de *T. mentagrophytes* utilizando quatro *primers* não específicos, porém, não se avaliou mais de um isolado de *M. canis* nessa investigação.

Gräser *et al.* (2000) foram os primeiros pesquisadores a encontrar uma variação intraespecífica entre dois isolados de *M. canis* avaliados através do sequenciamento da região ITS 1 e 2 do RNA ribossômico. As duas linhagens diferiram em oito substituições neste local, representando uma variação mínima de 1,4%.

Faggi *et al.* (2001) estudaram 53 linhagens de *M. canis* isoladas de humanos, de gatos e cães sintomáticos e assintomáticos através da técnica de PCR utilizando um único *primer* composto por sequência de DNA simples repetitiva e não encontrou diferenças intra-específicas nos padrões eletroforéticos dos amplicons. Entretanto, houve diferença entre os isolados de *T. mentagrophytes*, o que permitiu aos autores separá-los em 3 grupos, um composto por todas as cepas de *T. mentagrophytes* var. *granulosum* e *T. interdigitale*, outro com os isolados de *T. mentagrophytes* var.

asteroides e *T. mentagrophytes* var. *radians* e o último com as amostras de *T. mentagrophytes* var. *lacticolor* e os isolados de *T. mentagrophytes* de variedade inespecífica. No primeiro e segundo grupos havia isolados de pacientes humanos e animais e no terceiro grupo apenas isolados de pessoas.

Yu *et al.* (2004) avaliaram um surto de dermatofitose em uma escola da China, utilizando a técnica de RAPD e sequenciamento das regiões ITS 1 e ITS 2 do RNA ribossômico, além da amplificação da região NTS do RNA ribossômico, e encontraram padrões genotípicos idênticos entre os isolados de crianças e do ambiente a que elas tiveram contato.

Posteriormente, porém, dois estudos realizados no Brasil, que compararam o genótipo de linhagens de *M. canis* isoladas de humanos, cães e gatos através da técnica de RAPD, RLFPS e amplificação das regiões ITS 1 e ITS 2 do RNA ribossômico não demonstraram existir variabilidade genética entre as linhagens estudadas, apesar de encontrarem uma variação fenotípica nas amostras (BRILHANTE *et al.*, 2005a; BRILHANTE *et al.*, 2005b).

Recentemente, Viani *et al.* (2007) compararam 30 linhagens de *M. canis* isoladas de gatos sintomáticos com 30 linhagens de gatos assintomáticos através de análise enzimática e molecular utilizando a técnica de RFLP. As linhagens que foram isoladas de gatos sintomáticos apresentaram maior atividade de queratinase e elastase, porém, não foi demonstrado polimorfismo genético entre as amostras estudadas com a técnica utilizada.

Entretanto, na Espanha, um estudo identificou a presença de alta variação genotípica em 21 dos 24 isolados estudados de cães, gatos e pessoas, utilizando a técnica de polimorfismo ISSR-PCR, a qual amplifica regiões do genoma localizadas entre *loci* de DNA repetitivo (microsatélites) (CANO *et al.*, 2005). Contudo, além do estudo ter sido realizado com um pequeno número de amostras, não se efetuou uma correlação entre os diferentes genótipos encontrados com a sintomatologia apresentada pelos hospedeiros ou com a região geográfica da Espanha em que os isolados foram obtidos.

Existem ainda evidências de que os isolados de *M. canis* obtidos de seres humanos sejam uma variação genotípica mais virulenta originada de isolados animais (SHARMA *et al.*, 2007). Sharma *et al.* (2007) estudaram variações nos padrões genéticos e dispersões de 101 linhagens de *M. canis* de vários países através da técnica de marcadores de microsatélites, para verificar possíveis diferenças genéticas que

determinem maior ou menor virulência do microrganismo em humanos. Nessa pesquisa, três diferentes populações de *M. canis* foram identificadas, com evidências de recombinação entre elas. Porém, não houve correlação específica dessas populações com a manifestação clínica diferenciada desse patógeno, nem com a região geográfica avaliada.

Segundo Oliveira *et al.* (2006), os microssatélites são regiões de sequências curtas, não codificantes e repetitivas do DNA compostas por um a seis nucleotídeos repetidos um ao lado do outro. Também são conhecidos como Repetições de Sequências Simples (Simple Sequence Repeats – SSR) ou Repetições Sequenciais Curtas (Short Tandem Repeats - STR).

Eles têm sido usados mundialmente como marcadores moleculares para uso em estudos genéticos, incluindo vários campos como conservação e diferenciação genética, estudos populacionais e testes de paternidade. Sua qualidade como marcador genético consiste em sua alta taxa de mutabilidade, que é maior do que o resto do genoma, além de ser codominante e multialélico, altamente reproduzível, com alta resolução e baseado na PCR (LI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em uma população em geral, pode haver vários alelos com um número diferente de repetições num mesmo *locus*, o que indica que os marcadores microssatélites são muito úteis para discriminar indivíduos diferentes. Os mecanismos sugeridos para originar a alta taxa de mutação dessas regiões do DNA incluem erros durante recombinação, *crossing-over* desigual e um “escorregamento” da enzima polimerase durante a replicação ou reparo do DNA. Os microssatélites podem ter um efeito neutro no genoma ou regular funções importantes em uma espécie em particular, como regulação e funcionamento de genes (LI *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além de *M. canis* (CANO *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2007), os microssatélites já foram usados com sucesso como marcadores para determinar diferenciação genética entre isolados de outros dermatófitos como *T. rubrum*, *T. violaceum* (GRÄSER *et al.*, 2007; OHST *et al.*, 2004) e *M. audouinii* (KASZUBIAK *et al.*, 2004).

Por estas razões, as evidências apontam para a utilização dos marcadores microssatélites como um melhor meio de se avaliar diferenças genéticas entre isolados de *M. canis*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e seres humanos estudados

Foram incluídos no estudo isolados de *Microsporium canis* de 102 cães e gatos sintomáticos e assintomáticos e de pacientes humanos com *tinea* durante os anos de 2006 a 2010. Essas amostras foram provenientes de 4 cidades do Brasil, sendo 71 de Curitiba, 26 de Porto Alegre, 4 de Florianópolis e 1 de Cuiabá. Dentre eles, 37 eram de gatos sintomáticos, 35 de gatos assintomáticos, 19 de pacientes humanos sintomáticos, 9 de cães assintomáticos e 2 de cães sintomáticos.

3.1.1 Animais Sintomáticos

Foram utilizados pêlos e isolados clínicos de 37 gatos e 2 cães que apresentaram lesões clínicas decorrentes de dermatofitose causada por *M. canis*. Desses animais, 25 foram provenientes da cidade de Porto Alegre, 9 de Curitiba, 4 de Florianópolis e 1 de Cuiabá.

As amostras das cidades de Porto Alegre e Florianópolis incluíram pêlos e escamas que foram colhidos através da técnica do arrancamento. As hastes pilosas foram coletadas de vários locais suspeitos com uma pinça hemostática após a limpeza local com gaze embebida em álcool a 70% e secagem ao ar (DeBOER e MORIELLO, 2006). Os pêlos apreendidos foram acondicionados em envelope de papel e encaminhados ao Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, aonde foram semeados em placas de ágar Mycosel, acondicionados em estufa, a temperatura constante de 30° C, e o crescimento fúngico foi observado durante três semanas. As placas que apresentaram crescimento fúngico foram avaliadas quanto às características macro e microscópicas das colônias presentes, visando à determinação da espécie de dermatófitos envolvida. Quando se fez necessário, foi realizado microcultivo em meio lactrimel visando à estimulação da formação de macroconídios e hifas próprias de cada espécie de fungo dermatofítico, permitindo, portanto, sua correta identificação.

As amostras provenientes da cidade de Curitiba e Cuiabá incluíram isolados de *M. canis* previamente cultivados e mantidos em meio de cultura Mycosel e água destilada provenientes do Serviço de Dermatologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFPR e do Laboratório particular Micolab, ambos em Curitiba, e da Universidade

Federal do Mato Grosso, as quais foram transportados até o Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, para recultivo e confirmação da espécie de dermatófito.

Quando possível, foram obtidas informações sobre as características gerais dos animais sintomáticos através de questionário. Foram colhidas informações sobre raça, idade, sexo, tipo de domiciliação e sinais clínicos de 23 gatos e 2 cães (**Apêndices A e B**). Os sinais clínicos mais relatados incluíram alopecia, hipotricose, descamação e presença de crostas e prurido. Houve relato de contágio humano em 10 casos e o teste da lâmpada de Wood foi positivo em 5 animais, todos felinos. Entretanto, esse testes só foi avaliado em mais 3 gatos, cujos resultados foram negativos. Houve 2 casos de pseudomicetoma, os quais foram generalizados e os animais evoluíram para óbito. As lesões dermatofíticas foram consideradas multifocais em 20 animais e 3 gatos da raça Persa, um filhote e dois adultos, apresentaram lesões solitárias.

3.1.2 Animais Assintomáticos

Foram utilizados isolados clínicos de *M. canis* de 35 gatos e 9 cães provenientes da cidade de Curitiba, que eram assintomáticos e apresentaram culturas fúngicas positivas para *M. canis*. Os isolados de *M. canis* previamente cultivados e mantidos em meio de cultura Mycosel e água destilada foram transportados até o Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, para recultivo e confirmação da espécie de dermatófito. Em todas as amostras positivas, o único dermatófito isolado foi o *M. canis*.

Todos os gatos eram S.R.D. e dentre os cães, 3 eram da raça Basset Hound, 2 eram Labrador, 2 Mastiff, 1 Afghan Hound e 1 S.R.D (**Apêndice C**). Só houve determinação da idade e sexo de 18 gatos e dos 9 cães. Dezesesseis gatos e 6 cães tinham mais do que um ano de idade. As fêmeas foram mais representadas, incluindo 10 de 18 gatos e 6 dos 9 cães. Quarenta animais eram extradomiciliados, mais exatamente 31 gatos e os 9 cães.

3.1.3 Seres Humanos

Foram utilizados isolados clínicos de 19 pacientes humanos, 18 provenientes do Serviço de Dermatologia Pediátrica da Faculdade de Medicina da UFPR e do

Laboratório particular Micolab, ambos em Curitiba, além de um caso de uma veterinária de Porto Alegre com dermatofitose clínica. As amostras provenientes da cidade de Curitiba incluíram isolados de *M. canis* previamente cultivados e mantidos em meio de cultura Mycosel e água destilada, que foram transportados até o Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da UFRGS, para recultivo e confirmação da espécie de dermatófito. A amostra de Porto Alegre foi colhida de uma Médica Veterinária através da escarificação dos bordos ativos lesionais e da técnica do arrancamento.

Dentre os pacientes humanos incluídos no estudo, havia 13 crianças (com idade inferior a 12 anos) e 6 adultos, 12 eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino (**Apêndice D**). A *tinea corporis* foi a forma clínica mais comum (11 casos), seguida da *tinea capitis* (7 casos) e *tinea faciei* (1 caso). Todos os adultos apresentaram *tinea corporis* e mais do que a metade das crianças desenvolveram *tinea capitis*. Quatro pacientes humanos relataram possuir contato com cães e gatos.

3.2 Análise molecular dos microssatélites

3.2.1 Extração do DNA

O protocolo para a extração de DNA foi baseado em extração enzimática (VERMOUT *et al.*, 2007) e mecânica (FAGGI *et al.*, 2005), além da utilização de *Kit* para purificação de DNA genômico total “Purelink” Invitrogen[®]. O micélio superficial foi transferido para um tubo tipo Eppendorf e armazenado a -20°C. O material foi resuspenso em solução tampão contendo enzima de lise obtida de *Trichoderma harzianum*, agitando vigorosamente em vortex e, em seguida, encubado durante 3 horas. Os tubos foram invertidos frequentemente durante este período. Adicionou-se a estes tubos 20 µL da enzima Proteinase K e 180 µL da solução tampão de digestão (ambos fornecidos pelo kit), além de 250 mg de pérolas de vidro lavadas em ácido, agitando vigorosamente em vortex e encubando a 55°C durante 3 minutos, alternadamente, em um período total de 60 minutos. Depois, 20 µL de RNase A (fornecida pelo kit) foram adicionados, a solução foi agitada vigorosamente em vortex e incubada em temperatura ambiente durante 2 minutos. Posteriormente, 200 µL da solução tampão de lise e ligação e 200 µL de etanol a 96-100% foram adicionados e misturados vigorosamente em vortex ao conteúdo do tubo, para obter uma solução homogênea. Cerca de 640 µL

do lisado foram então adicionados à coluna de ligação acoplada a um tubo coletor de 2,0 mL, com centrifugação posterior durante 1 minuto a 14.000 rpm em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido até que todo o lisado fosse passado através da coluna de ligação. A fração filtrada coletada foi descartada e a coluna foi então transferida para um novo tubo coletor de 2 mL, ao qual foram adicionados 500 µL de solução de lavagem 1 contendo etanol a 96-100%, com centrifugação durante 1 minuto a 14.000 rpm, descartando-se o filtrado em seguida. A coluna foi novamente transferida para um novo tubo coletor aonde foram adicionados 500 µL de solução de lavagem 2 preparada com etanol a 96-100%, com centrifugação durante 3 minutos a 14.000 rpm, descartando-se o filtrado e o tubo coletor em seguida. A coluna de filtração foi então transferida para um tubo de 1,5 mL estéril, aonde 100 µL da solução tampão de eluição foram adicionados diretamente à sua membrana. Procedeu-se a incubação à temperatura ambiente (15°C a 25°C) durante 30 minutos, com posterior centrifugação durante 1 minuto a 14.000 rpm. Os tubos contendo DNA purificado foram estocados a -20°C para posterior amplificação.

3.2.2 Amplificação e classificação dos marcadores microsatélites do DNA através da PCR

A amplificação da região de microsatélites do DNA foi realizada utilizando a técnica descrita por Sharma *et al.* (2007). As reações foram realizadas em volumes de 25 µL contendo 22 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 55 mM de KCl, 1,65 mM de MgCl₂, 30 pmol de cada *primer* (McGT13 senso, 5'-GATCGGAGCATGCCATACAG-3'; McGT13 anti-senso, 5'-TCTTCCCACCTTCTCAATG-3'; McGT17 senso, 5'-GCTCTGGGATAAGGTGTTTG-3'; e McGT17 anti-senso, 5'-GTAGCAGTAAAGCCAAGAGGG-3'), 220 µM de cada dNTP, 5,5 U da *Taq* DNA polimerase e 0,5 µL do DNA genômico. A *hot start* PCR foi empregado (D'AQUILA *et al.*, 1991). Para isto, realizaram-se os seguintes passos: 1) foi preparada a mistura de PCR com todos os componentes e os tubos foram mantidos a -20°C durante e após essa preparação; 2) em seguida, o termociclador foi ligado e pausado a uma temperatura de 95°C para que cada um dos tubos fossem colocados em seu local apropriado; 3) Os ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos e amplificação com 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para a desnaturação, 68°C por 45 segundos para a hibridização do

primer McGT17 e 66°C por 45 segundos para a hibridização do *primer* McGT13, 72°C por 30 segundos para a extensão, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 min. A *touchdown* PCR (DON *et al.*, 1991). foi empregado visando reduzir a amplificação de produtos não específicos. Este método consistiu em iniciar a temperatura de hibridização de cada *primer* 2°C acima da temperatura ideal, reduzindo 0,2°C a cada ciclo, durante 10 ciclos, seguindo-se os 35 ciclos de hibridização com a temperatura final ideal. Algumas amostras requereram que a temperatura inicial do *touchdown* e da hibridização final fosse reduzida até que houvesse amplificação do produto de PCR alvo. No total, 6 amostras necessitaram de 1 grau a menos e 2 amostras necessitaram de 3 graus a menos para o McGT13. Já para o McGT17, 14 amostras necessitaram de 1 grau a menos, 15 de 2 graus a menos, 7 de 3 graus a menos e 2 de 4 graus a menos. Os produtos de PCR (5 µL) foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, e os microsátélites migraram a 30V durante 36 horas, com força constante. Os géis foram corados com corante SYBR Gold e fotografados. Para avaliar o tamanho dos produtos de amplificação gerados foi utilizado o *software GelPro Analyser*[®]. Os fragmentos menores que 105 pb e maiores que 120 pb para McGT13 e menores que 140 pb e maiores que 170 pb para McGT17 não foram considerados.

3.2.3 Cálculo do número de repetições e sequenciamento de DNA

O número de repetições nos alelos foi obtido a partir do cálculo do tamanho dos produtos de amplificação gerados subtraindo-se o tamanho da região conservada de DNA que flanqueia a região de DNA repetitivo, que foi conhecida através da comparação com sequências de alelos com um número conhecido de microsátélites (EMPL acesso números AM295318 e AM295319). Posteriormente, esse cálculo foi ajustado a partir de 4 sequências de alelos geradas através de sequenciamento de DNA.

As quatro amostras enviadas para sequenciamento foram eluídas de gel de poliacrilamida a 8% da seguinte maneira: cada gel foi cortado com lâmina de bisturi destacando-se os fragmentos de interesse e colocado em parafilme para ser rinsado com 0,5 mL de tampão de eluição; em seguida o líquido foi drenado e o gel cortado em pedaços de 1 mm para serem colocados em tubos de 1,5 mL; ao tubo adicionou-se 400 µL de tampão de eluição, submergindo todos os pedaços de gel, para serem incubados a 37°C com agitação durante a noite; no dia seguinte, cada tubo foi centrifugado durante 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante foi removido com pipeta e ponteira de 200 µL,

para evitar a aspiração de pedaços de gel, e foi colocado em novo tubo de 1,5 mL; ao sobrenadante foi adicionado 16 µL de NaCl 5 M e 1 mL de etanol; o tubo foi então agitado vigorosamente em vortex e colocado no freezer a -20°C durante no mínimo 1 hora; após esse período, o tubo foi centrifugado durante 30 minutos, a 4°C e a 14.000 rpm para então ser descartado o sobrenadante, ser deixado a temperatura ambiente por 30 minutos para que o etanol evaporasse e o DNA ser ressuspenso em 25 µL de tampão de eluição. Posteriormente, as amostras foram purificadas com *Kit* para purificação de DNA “Purelink PCR Purification kit” Invitrogen®. Adicionou-se a cada tubo 4 volumes de tampão de ligação contendo isopropanol para cada volume da solução contendo o DNA. Depois, as soluções foram então adicionadas à coluna de ligação acoplada a um tubo coletor de 2,0 mL, com centrifugação posterior durante 1 minuto a 14.000 rpm em temperatura ambiente. A fração filtrada coletada foi descartada e a coluna foi então transferida para um novo tubo coletor de 2 mL, ao qual foram adicionados 650 µL de solução de lavagem 1 contendo etanol a 96-100%, com centrifugação durante 1 minuto a 14.000 rpm, descartando-se o filtrado em seguida. A coluna foi novamente submetida à centrifugação durante 2 a 3 minutos a 14.000 rpm para remover a solução de lavagem residual, descartando-se o filtrado e o tubo coletor em seguida. A coluna de filtração foi então transferida para um tubo de 1,7 mL estéril, aonde 50 µL da solução tampão de eluição foram adicionados diretamente à sua membrana. Procedeu-se a incubação à temperatura ambiente (15°C a 25°C) durante 30 minutos, com posterior centrifugação durante 2 minutos a 14.000 rpm. Os tubos contendo DNA purificado foram estocados a -20°C para posterior sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático 3100 no Centro de Biotecnologia da UFRGS - CBIOT. Duas amostras amplificadas com o primer McGT13 possuíam 4 pares de base a mais e outras duas amplificadas com o primer McGT17 tinham 10 pares de base a mais do que o valor avaliado pelo programa *software GelPro Analyser*®. Portanto, as outras amostras foram reavaliadas e ajustadas a partir destas amostras seqüenciadas.

3.2.4 Análise dos dados

A distância genética entre os indivíduos foi calculada com base em três diferentes aferições, distâncias Dc (CAVALLI-SFORZA e EDWARDS, 1967), Dm (SAITOU e NEI, 1987) e Dmu2 (GOLDSTEIN *et al.*, 1995), implementados no

software POPULATIONS pacote versão 1.2.28
(<http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>) (LANGELLA, 1999). As árvores foram construídas com os algoritmos UPGMA e Neighbour-joining e foram visualizadas utilizando-se o programa MEGA4 (<http://www.megasoftware.net/>) (TAMURA *et al.*, 2007).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e comparação dos genótipos de *M. canis* utilizando marcadores microssatélites

Os marcadores microssatélites possibilitaram o estudo e a comparação dos isolados de *M. canis* oriundos de gatos, cães e seres humanos (**Figura 1 e 2**). A análise dos *loci* Mc(GT)13 e Mc(GT)17 revelaram 3 e 6 alelos, variando de 2 e 5 repetições de dinucleotídeos dentro de cada locus, respectivamente.

A aplicação dos diversos métodos de distância genética (Dc, Dm, Dmu2) pelos algoritmos UPGMA e Neighbour-joining resultou na construção de 6 árvores filogenéticas. As árvores geradas a partir do algoritmo Neighbour-joining não demonstraram reprodutibilidade em sua topologia, pois a relação entre as amostras não foram iguais, mesmo utilizando métodos de distância diferentes (Dc, Dm, Dmu2). Dessa maneira, as árvores geradas pelo algoritmo UPGMA foram as escolhidas para a análise das amostras deste estudo.

Dentre os métodos de análise de distancia genética, o método Dmu2 gerou uma árvore com uma combinação de alelos diversa e, por isso, foi também descartado (**Figura 3**). Este método considerou grupos externos como internos diferentemente dos outros métodos. Os métodos Dc e Dm geraram árvores idênticas e, assim, o método Dc foi o escolhido para este estudo (**Figura 4**).

A análise da combinação do número de repetições de ambos os marcadores detectou um total de 14 genótipos dentre as 102 amostras de *M. canis* (**Figura 4**). Houve a formação de 5 grupos maiores de isolados que compartilharam os mesmos genótipos, porém, este tipo de análise não evidenciou relação entre a origem dessas amostras.

Dos 14 genótipos encontrados e 5 grandes grupos formados, 1 foi compartilhado por 26 linhagens, outro por 21, um por 12 isolados e outros dois com 11 isolados cada um (**Figura 4**). Outros dois pequenos grupos foram formados com 7 e 5 isolados cada. A formação de grupos revela o grau de similaridade genética baseada no número de repetições de duas regiões de microssatélites no DNA do *M. canis*.

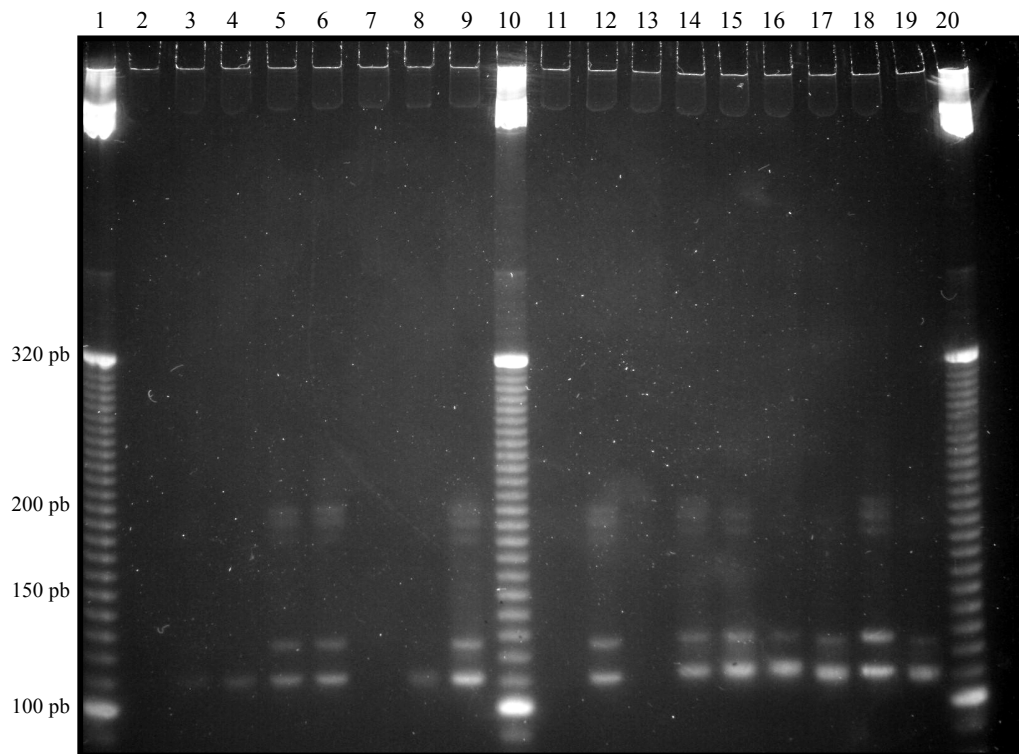


Figura 1 – Produtos de amplificação do marcador microsatélite McGT13 de isolados de *M. canis* de pacientes humanos e gatos no Brasil. Linhas 1, 10 e 20 - marcador de 100 pb, Linhas 3-6 (gatos assintomáticos), 8-9 (humano e gato assintomático), 12 (humano) e 14-19 (humanos).

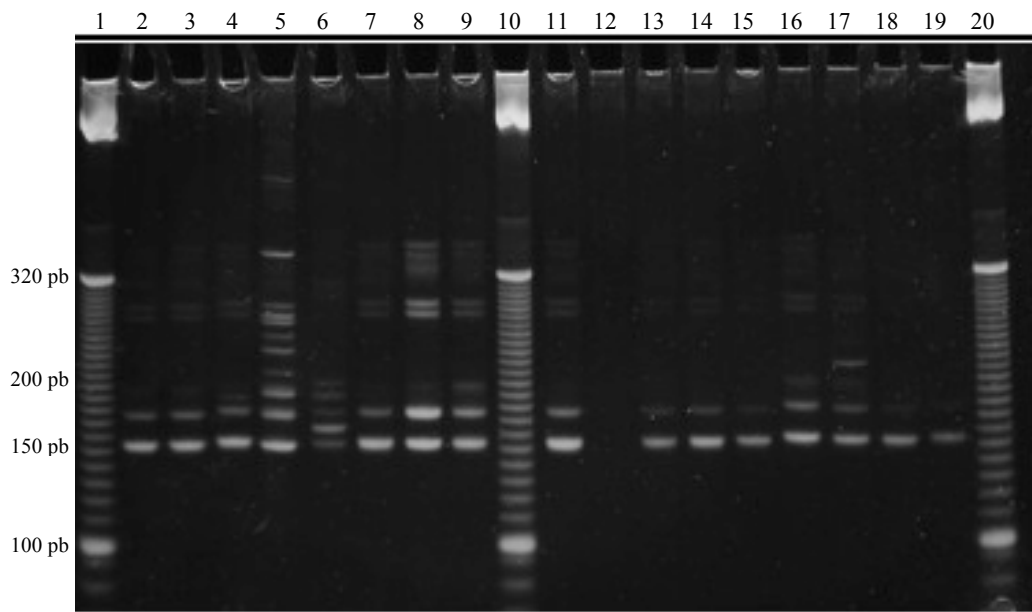


Figura 2 - Produtos de amplificação do marcador microsatélite McGT17 de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos no Brasil. Linhas 1, 10 e 20 - marcador de 100 pb, Linhas 2-4 (gatos assintomáticos) 5-9 (cães assintomáticos), 11 (cão assintomático), 13-19 (gatos sintomáticos).



Figura 3 - Árvores filogenéticas de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos geradas pelo algoritmo UPGMA a partir da análise de marcadores microssatélites McGT13 e McGT17. A – Método Dc. B – Método Dm. C – Método Dmu2.

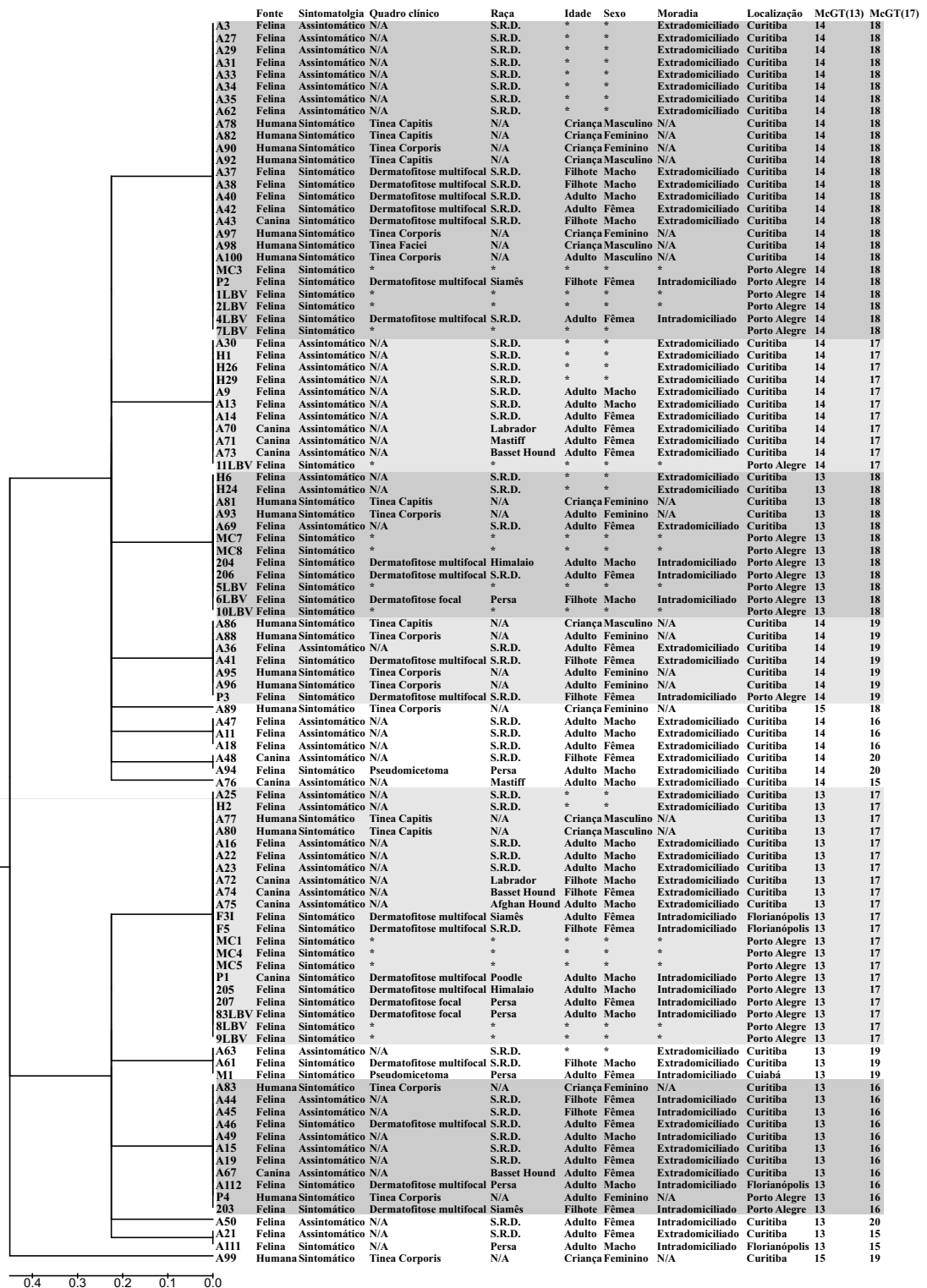


Figura 4 - Árvore filogenética de isolados de *M. canis* de pacientes humanos, cães e gatos geradas pelo algoritmo UPGMA baseada no método de distância genética Dc (à esquerda) a partir da análise de marcadores microsatélites McGT13 e McGT17. * – Dados não coletados. N/A – Não aplicável.

4.2 Correlação entre as características genóticas e dados epidemiológicos de *M. canis* em gatos e seres humanos no Brasil

Apesar da formação destes grupos geneticamente relacionados, não houve correlação entre os dados epidemiológicos analisados dentre as linhagens, incluindo fonte, sintomatologia, quadro clínico, raça, idade, sexo, moradia e localização geográfica (**Figura 4**).

5 DISCUSSÃO

Diversos estudos moleculares, incluindo a utilização de *primers* não específicos (GRÄSER *et al.*, 1998), *primers* compostos por sequência de DNA simples repetitiva (FAGGI *et al.*, 2001), RAPD (BRILHANTE *et al.*, 2005a; BRILHANTE *et al.*, 2005b; YU *et al.*, 2004), RFLPs (BRILHANTE *et al.*, 2005a; BRILHANTE *et al.*, 2005b; VIANI *et al.*, 2007), amplificação e sequenciamento da região ITS 1 e 2 do RNA ribossômico (BRILHANTE *et al.*, 2005a; BRILHANTE *et al.*, 2005b; GRÄSER *et al.*, 2000; YU *et al.*, 2004) e amplificação da região NTS do RNA ribossômico (YU *et al.*, 2004) falharam em demonstrar diferença genótipica de isolados de *M. canis*, sugerindo inclusive que o *M. canis* é constituído de reprodução estritamente clonal, sendo a grande diversidade morfológica explicada por uma adaptação dos isolados ao meio ambiente em que se encontram. Este trabalho de pesquisa identificou uma diversidade genética entre isolados de *M. canis* originados em pacientes humanos, cães e gatos no Brasil.

Seguindo a metodologia de Sharma *et al.* (2007), com pequenas modificações, os marcadores microssatélites possibilitaram o estudo e a comparação do genótipo das 102 linhagens de *M. canis* incluídas neste estudo, incluindo isolados de felinos, caninos e seres humanos, provenientes de 4 cidades brasileiras. A comparação dos isolados e a determinação do tamanho dos produtos de PCR possibilitou a estimativa do número de unidades de repetição de cada amostra, que foi confirmada com a comparação com sequências de alelos conhecidas e geradas através de sequenciamento de DNA.

Os produtos de amplificação de McGT13 e McGT17, porém, não foram únicos, sendo necessário utilizar técnicas para a redução do aparecimento de produtos espúrios, como a *hot start* (D'AQUILA *et al.*, 1991) e a *touchdown* PCR (ROUX, 2009). Algumas amostras requereram ainda que a temperatura inicial do *touchdown* e da hibridização final fosse reduzida até que houvesse amplificação do produto de PCR alvo, que foi determinado a partir do tamanho dos produtos gerados no estudo feito por Sharma *et al.* (2007). Ainda assim, a maioria dos géis avaliados mostraram produtos com 10 a 30 pares de base a mais do que os produtos-alvo, que pode ser justificado por um “escorregamento” da enzima DNA polimerase (*DNA polymerase slippage*) durante o processo de alongamento da fita de DNA, o que também é uma hipótese para a própria formação das regiões de microssatélites encontradas no DNA (ELLEGREN, 2004). Esse escorregamento corresponde a uma dissociação da fita de DNA durante sua

replicação e a subsequente reassociação, o que leva à inserção ou deleção de unidades de repetição em relação à fita molde.

Os *loci* Mc(GT)13 e Mc(GT)17 revelaram 3 e 6 alelos dentre as amostras avaliadas, respectivamente, e os alelos variaram de 2 e 5 repetições de dinucleotídeos dentro de cada locus. Esses resultados são diferentes dos encontrados por Sharma *et al.* (2007), que encontraram 4 e 5 alelos respectivamente, com variações de 7 e 5 repetições de dinucleotídeos. Essa diferença pode ser justificada pela origem das amostras (europeias, asiáticas e América do Norte *versus* brasileiras) ou até pela inclusão nesse estudo de amostras de animais assintomáticos.

A análise da combinação do número de repetições de ambos os marcadores detectou um total de 14 genótipos dentre as 102 amostras de *M. canis*, contrastando com os 11 genótipos encontrados por Sharma *et al.* (2007). O maior número de genótipos encontrados nos isolados brasileiros contrasta com uma maior diversidade de espécies incluídas no estudo europeu, que avaliou linhagens oriundas de cães, gatos, cavalos, galinhas e seres humanos, além de incluir amostras de várias partes do mundo. Provavelmente, a determinação da diferenciação genética entre as linhagens de *M. canis* não está correlacionada com dados epidemiológicos, pois em ambos os estudos tais relações não foram encontradas.

Porém, os marcadores microssatélites possibilitaram a diferenciação genética e correlação epidemiológica entre populações de outros dermatófitos, como *T. rubrum* e *T. violaceum* (GRÄSER *et al.*, 2007; OHST *et al.*, 2004) e também de outros fungos como *H. capsulatum* (CARTER *et al.*, 2001), *Cryptococcus neoformans* (ILLNAIT-ZARAGOZÍ *et al.*, 2010) e *Aspergillus flavus* (HADRICH *et al.*, 2010).

Em um estudo que avaliou isolados de *T. rubrum* e *T. violaceum* com um marcador microssatélite, foram encontrados quatro alelos polimórficos entre 130 isolados, o que gerou uma associação com a região geográfica que originou os isolados (OHST *et al.*, 2004). GRÄSER *et al.* (2007) utilizaram sete marcadores microssatélites para a análise de 236 amostras de várias partes do mundo. Cinquenta e cinco genótipos foram determinados, dividindo em duas a população avaliada, uma de origem africana e outra com origem no resto do mundo. Foi encontrada uma predileção de cada população pela a apresentação clínica da doença nos pacientes humanos (*tinea capitis e tinea corporis versus tinea pedis*), porém, não houve correlação entre os genótipos encontrados e as características fenotípicas avaliadas.

Carter e colaboradores (2001) encontraram diferença genética entre isolados de *H. capsulatum* de diferentes regiões das Américas, utilizando a técnica de RFLP e um marcador microssatélite, sugerindo inclusive a separação em diferentes espécies entre isolados da América do Norte e do Sul.

Illnait-Zaragozí *et al.* (2010) utilizaram nove microssatélites e encontraram 14 genótipos diferentes em 19 isolados de *Cryptococcus neoformans* estudados. Em três pacientes, a recorrência da infecção foi associada com isolados genotipicamente idênticos. Porém, em quatro pacientes, a reinfeção foi associada a isolados de genótipos diferentes em relação à infecção inicial, demonstrando que provavelmente esses pacientes estavam infectados com mais de um isolado.

Hadrich *et al.* (2010) estudou uma população de 63 isolados de *A. flavus* na Tunísia com cinco marcadores microssatélites e houve distinção do genótipo de amostras oriundas da Tunísia e da França. Os microssatélites possibilitam também determinar que dois pacientes adquiriram infecção hospitalar, pois o genótipo de seus isolados e dos isolados do ambiente eram idênticos.

Estas pesquisas demonstram que mesmo com poucos marcadores microssatélites e com número de amostras ainda menor do que aquele avaliado no presente estudo, foi possível correlacionar os genótipos encontrados com dados epidemiológicos em outras espécies de fungos.

Cano *et al.* (2005) relataram a presença de 21 genótipos de *M. canis* em um grupo de 24 isolados de cães, gatos e pessoas na Espanha. Apesar do número pequeno de amostras, a técnica de ISSR-PCR possibilitou a detecção de um alto grau de polimorfismo, evidenciando inclusive três diferentes isolados em dois pacientes de uma mesma família. Possivelmente, a técnica de ISSR-PCR possua um maior poder discriminatório individual do que os marcadores microssatélites, o que deve ser investigado com um número maior de amostras de várias partes do mundo.

A patogenicidade demonstrada pelos dermatófitos está relacionada, principalmente, a enzimas produzidas por eles. O número e a quantidade de enzimas produzidas variam de cepa para cepa e pode explicar, em parte, a variabilidade de apresentação clínica da doença (ABDEL-RAHMAN, 2001; DeBOER e MORIELLO, 2006; SIMPANYA *et al.*, 1998; VIANI *et al.*, 2001). Viani *et al.*, (2001), em estudos da atividade enzimática em cepas de *M. canis*, analisaram queratinases, lipases, elastases e DNAses e demonstraram que a enzima queratinase está correlacionada diretamente com o desenvolvimento das lesões dermatofíticas. A caracterização de queratinases parece ser

fundamental para o melhor esclarecimento da patogênese das dermatofitoses e da relação parasito-hospedeiro. Mignon *et al.*, (1998b), e Brouta *et al.*, (2001), purificaram e caracterizaram uma protease de 31,5 kDa e uma metaloprotease de 43,5 kDa de *M. canis*. Brouta *et al.*, (2002) isolaram três genes codificadores de metaloprotease (meps) em cepas de *M. canis*, demonstrando que o gene *mep3* é o codificador da metaloprotease 43,5KDa caracterizada anteriormente. Aparentemente, a caracterização molecular de enzimas proteolíticas e o estudo de sua expressão durante a infecção dermatofítica caracteriza uma importante caminho na pesquisa da patogenicidade do *M. canis*, podendo inclusive responder questões relacionadas à diferentes graus de virulência vistos em diferentes hospedeiros.

Durante quase um século, a resposta imunológica do hospedeiro à infecção por dermatófitos foi objeto de investigação e, apenas recentemente, a imunologia dessa doença foi estudada em animais de companhia (DeBOER e MORIELLO, 2006). A maior parte das informações resulta de estudo em gatos e indicam que a resposta imune celular é mais importante na resistência à infecção do que a humoral (DeBOER e MORIELLO, 2006). Quando os artroconídios infectantes entram em contato com o pêlo e a pele, muitos fatores influenciam a instalação ou não de uma infecção (SCOTT *et al.*, 2001). Além da integridade da pele e da produção de soro e sebo fungistáticos, o *status* imunológico do hospedeiro influencia o desenvolvimento da infecção (DeBOER e MORIELLO, 2006; SCOTT *et al.*, 2001). A doença se estabelece mais facilmente em animais e pessoas muito jovens, muito idosas ou imunocomprometidas (DeBOER e MORIELLO, 2006).

A susceptibilidade à infecção é pobremente entendida, mas a habilidade em construir uma resposta inflamatória eficiente tem um papel crucial no término da infecção (FOIL, 1998). Os animais jovens são mais predispostos a contrair infecções sintomáticas devido ao não completo desenvolvimento do seu sistema imunológico (BALDA *et al.*, 2004; BAXTER, 1973; BRILHANTE *et al.*, 2003; CAFARCHIA *et al.*, 2004; DUBUGRAS *et al.*, 1992; FOIL, 1998; FRIESEN *et al.*, 2009; KHOSRAVI & MAHMOUDI, 2003; LEWIS *et al.*, 1991; MANCIANTI *et al.*, 2002; MARCHISIO *et al.*, 1995; MORIELLO e DeBOER, 1991b; SPARKES *et al.*, 1993). Indivíduos imunocomprometidos, como aqueles portadores do vírus da imunodeficiência felina, geralmente abrigam infecções mais sérias, generalizadas ou prolongadas (FOIL, 1998; MANCIANTI *et al.*, 1992). A terapia com corticóides aumenta a susceptibilidade individual por inibir a inflamação local (FOIL, 1998). Outras deficiências imunológicas

podem estar relacionadas à infecção por dermatófitos, como a inibição da função de linfócitos T e inflamação locais em pessoas atópicas (FOIL, 1998).

DeBoer e Moriello (2006) também citam os fatores genéticos como fatores importantes no desenvolvimento de dermatofitose crônica em pacientes humanos, evidenciados pela alta prevalência de infecções crônicas entre indivíduos com algum grau de parentesco *versus* indivíduos que moram no mesmo local, mas não são parentes. A genética também é um fator importante em gatos. A dermatofitose crônica foi verificada mais frequentemente em abrigos aonde os gatos eram geneticamente relacionados (MORIELLO e DeBOER, 1991b). Além disso, os gatos que apresentam a doença na forma crônica possuem taxas de anticorpos significativamente mais altas e respostas blastogênicas linfocíticas diferentes (DeBOER e MORIELLO, 2006).

Os marcadores microssatélites utilizados neste trabalho de pesquisa não permitiram estabelecer a correlação entre as diferenças nos genótipos das amostras de *M. canis* analisadas e os dados epidemiológicos pesquisados. Portanto, se existem linhagens mais ou menos virulentas de *M. canis*, é possível que a sua determinação esteja relacionada apenas a outros fatores de patogenicidade fúngica, como produção enzimática (ABDEL-RAHMAN, 2001; DeBOER e MORIELLO, 2006; SIMPANYA *et al.*, 1998; VIANI *et al.*, 2001; VIANI *et al.*, 2007), ou à imunidade do indivíduo infectado (DeBOER e MORRIELO, 1993; MIGNON *et al.*, 1999). Outra possibilidade reside numa variação genética específica ainda não detectada pelos métodos até hoje utilizados (VIANI *et al.*, 2007).

6 CONCLUSÕES

Os marcadores microssatélites possibilitaram a identificação e comparação dos isolados de *M. canis* oriundos de gatos, cães e pacientes humanos incluídos no estudo.

Foram identificados 14 genótipos de *M. canis* através da análise de dois loci de microssatélites (Mc(GT)13 e Mc(GT)17) e 5 grandes grupos foram formados de acordo com o grau de similaridade genética entre os isolados de gatos, cães e pacientes humanos provenientes de Curitiba, Porto Alegre, Florianópolis e Cuiabá.

Apesar da formação de grupos geneticamente relacionados, não houve correlação entre as linhagens e dados epidemiológicos analisados entre as linhagens estudadas de *M. canis*, incluindo fonte, sintomatologia, quadro clínico, raça, idade, sexo, moradia e localização geográfica.

7 PERSPECTIVAS

Diante dos resultados obtidos nesta pesquisa e do conhecimento encontrado na literatura vigente, acredita-se ser importante o desenvolvimento de novos estudos visando:

- Analisar um número maior e mais diversificado de isolados de *M. canis* com os marcadores microssatélites, incluindo outras espécies animais e outros estados brasileiros;
- Incluir outros dados epidemiológicos do *M. canis* na avaliação dos grupos filogenéticos formados pelos marcadores microssatélites, dentre eles, o grau de sintomatologia apresentada, tempo de evolução da doença clínica e desenvolvimento de infecções crônicas;
- Analisar isolados de *M. canis* com os marcadores microssatélites compartilhados por diferentes espécies, por exemplo, animais de estimação e pacientes humanos de uma mesma moradia;
- Estudar a interferência do sistema imunológico local e sistêmico no desenvolvimento de sintomatologia na infecção por *Microporum canis* nas espécies animais e em pacientes humanos.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S. M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathologia**, v. 150, n. 3, p. 117-120, 2001.
- ABDEL-RAHMAN, S. M. Strain differentiation of dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 319-333, 2008.
- ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 Pt 2, p. S21-S25, 1994.
- ARABATZIS, M.; BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET, L. E. S.; KUIJPER, E. J. et al. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. **British Journal of Dermatology**, v. 157, n. 4, p. 681-689, 2007.
- ATES, A.; ILKIT, M.; OZDEMIR, R. et al. Dermatophytes isolated from asymptomatic dogs in Adana, Turkey: a preliminary study. **Journal of Medical Mycology**, v. 18, n. 3, p. 154-157, 2008.
- BAEZA, L. C.; GIANNINI, M. J. Strain differentiation of *Trichophyton rubrum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 6, p. 339-341, 2004.
- BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M. et al. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 583-584, 2004.
- BASSANESI, M. C.; CONCI, L. A.; SOUZA, A. P. et al. Fonte de infecção na dermatofitose por *Microsporum canis*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, n. 1, p. 11-13, 1993.
- BAXTER, M. Ringworm due to *Microsporum canis* in cats and dogs in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 21, n. 3, p. 33-37, 1973.
- BERGMANS, A. M.; van der ENT, M.; KLAASSEN, A. et al. Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 704-710, 2010.
- BETANCOURT, O.; SALAS, V.; OTAROLA, A. et al. *Microsporum canis* on dermatologically healthy cats in Temuco city, Chile. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p. 206-210, 2009.
- BOCK, M.; MAIWALD, M.; KAPPE, R. et al. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus specific primer system. **Mycoses**, v. 37, n. 3-4, p. 79-84, 1994.

- BOYANOWSKI, K. J.; IHRKE, P. J.; MORIELLO, K. A. et al. Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA. **Veterinary Dermatology**, v. 11, n. 2, p. 81 - 157, 2000.
- BRAJAC, I.; STOJNIĆ-SOSA, L.; PRPIĆ, L. et al. The epidemiology of *Microsporum canis* infections in Rijeka area, Croatia. **Mycoses**, v. 47, n. 5-6, p. 222-226, 2004.
- BRILHANTE, R. N. S.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JUNIOR, F. A. et al. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 303–308, 2003.
- BRILHANTE, R. S.; CORDEIRO, R. A.; MEDRANO, D. J. et al. Antifungal susceptibility and genotypical pattern of *Microsporum canis* strains. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 507-510, 2005a.
- BRILHANTE, R. S.; ROCHA, M. F.; CORDEIRO, R. A. et al. Phenotypical and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in north-east Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 776-782, 2005b.
- BRILLOWSKA-DABROWSKA, A.; SWIERKOWSKA, A.; LINDHARDT SAUNTE, D. M. et al. Diagnostic PCR tests for *Microsporum audouinii*, *M. canis* and *Trichophyton* infections. **Medical Mycology**, v. 48, n. 3, p. 486-490, 2010.
- BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETT, T. et al. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Medical Mycology**, v.39, n. 3, p. 269-275, 2001.
- BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; MONOD, M. et al. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 5676-5683, 2002.
- CABAÑES, F. J. Dermatofitosis animales. Recientes avances. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, n. 1, p. S8-S12, 2000.
- CABAÑES, F. J.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. **Mycopathologia**, v. 137, n. 2, p. 107-113, 1997.
- CAFARCHIA, C.; ROMITO D.; CAPELLI, G. et al. 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.
- CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; SASANELLI, M. et al. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. **Mycoses**, v. 47, n. 11-12, p. 508-513, 2004.
- CAMPA, D.; TAVANTI, A.; GEMIGNANI, F. et al. DNA microarray based on arrayed-primer extension technique for identification of pathogenic fungi

responsible for invasive and superficial mycoses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 909-915, 2008.

CANO, J.; REZUSTA, A.; SOLÉ, M. et al. Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. **Journal of Dermatological Science**, v. 39, n. 1, p. 17-21, 2005.

CARETTA, G.; MANCIANTI, F.; AJELLO, L. Dermatophytes and keratinophilic fungi in cats and dogs. **Mycoses**, v. 32, n. 12, p. 620-626, 1989.

CARTER, D. A.; TAYLOR, J. W.; DECHAIRO, B. et al. Amplified single-nucleotide polymorphisms and a (GA)_n microsatellite marker reveal genetic differentiation between populations of *Histoplasma capsulatum* from the Americas. **Fungal Genetics and Biology**, v. 34, n. 1, p. 37-48, 2001.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 233-257, 1967.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 385-405, 2008.

COPETTI, M. V.; SANTURIO, J. M.; CAVALHEIRO, A. S. et al. Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 119-124, 2006.

D'AQUILA, R. T.; BECHTEL, L. J.; VIDELER, J. A. et al. Maximizing sensitivity and specificity of PCR by pre-amplification heating. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 13, p. 3749, 1991.

DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Clinical update on feline dermatophytosis—part I. **The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 17, n. 10, p. 1197-1265, 1995.

DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Cutaneous fungal infections. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3. ed. St. Louis, Saunders Elsevier, 2006, Cap. 58, p. 550-569.

DeBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 289-295, 1994.

DEGREEF, H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 257-265, 2008.

DESCAMPS, F.; BROUTA, F.; MONOD, M. et al. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 119, n. 4, p. 830-835, 2002.

DON, R. H.; COX, P.T.; WAINWRIGHT, B. J. et al. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 14, p. 4008, 1991.

DUBUGRAS, M. T. B.; LARSSON, C. E.; LEDON, A. L. B. P. et al. Dermatofitoses e levedurosas de cães e gatos. Aspectos diagnósticos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 2, p. 273-287, 1992.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews. Genetics**, v. 5, n. 6, p. 435-445, 2004.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E. Use of magnetic beads to extract fungal DNA. **Mycoses**, v. 48, n. 1, p. 3-7, 2005.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E. et al. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.9, p.3382-3385, 2001.

FERNANDES, N. C.; AKITI, T.; BARREIROS, M. G. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 43, n. 2, p. 83-85, 2001.

FERREIRO, L. Dermatofitose. In: 1st BRAZILIAN INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL MYCOSES, 1., 2000, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: HCPA, 2000. p. 1- 16.

FOIL, C. S. Dermatophytosis. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 2. ed. Philadelphia, WB Saunders, 1998, Cap. 58, p. 362-370.

FRIESEN, R.; TUREK, E.; FARIAS, M. R. Estudo retrospectivo da dermatofitose canina entre janeiro de 2004 a janeiro de 2009 na Unidade Hospitalar para Animais de Companhia – PUPR. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 7, n. 21, p. 160-165, 2009.

FUCHS, A.; BREUER, R.; AXMAN, H. et al. Subcutaneous mycosis in a cat due to *Staphylotrichum coccosporum*. **Mycoses**, v. 39, n. 9-10, p. 381-385, 1996.

GAMBALE, W.; LARSSON, C. E.; MORITAMI, M. M. et al. Dermatophytes and other fungus of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. **Feline Practice**, v. 21, n. 3, p. 29-33, 1993.

GOLDSTEIN, D. B.; RUIZ LINARES, A.; CAVALLI-SFORZA, L. L. et al. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 463-471, 1995.

GRÄSER, Y.; EL FARI, M.; PRESBER, W. et al. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. **British Journal of Dermatology**, v. 138, n. 4, p. 576-582, 1998.

GRÄSER, Y.; FRÖHLICH, J.; PRESBER, W. et al. Microsatellite markers reveal geographic population differentiation in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1058-1065, 2007.

GRÄSER, Y.; KUIJPERS, A. F. A.; EL FARI, M. et al. Molecular and conventional taxonomy of the *Microsporum canis* complex. **Medical Mycology**, v. 38, n. 2, p.143-153, 2000.

HADRICH, I.; MAKNI, F.; AYADI, A. et al. Microsatellite typing to trace *Aspergillus flavus* infections in a hematology unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 2396-2401, 2010.

HARMSSEN, D.; SCHWINN, A.; BRÖCKER, E. B. et al. Molecular differentiation of dermatophyte fungi. **Mycoses**, v. 42, n. 1-2, p. 67-70, 1999.

HERMOSO DE MENDOZA, M.; HERMOSO DE MENDOZA, J.; ALONSO, J. M. et al. A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporum canis* from stray cats. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 62-65, 2010.

ILLNAIT-ZARAGOZÍ, M. T.; MARTÍNEZ-MACHÍN, G. F.; FERNÁNDEZ-ANDREU, C. M. et al. Microsatellite typing and susceptibilities of serial *Cryptococcus neoformans* isolates from Cuban patients with recurrent cryptococcal meningitis. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 289, 2010.

IORIO, R.; CAFARCHIA, C.; CAPELLI, G. Dermatophytoses in cats and humans in central Italy: epidemiological aspects. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 491-495, 2007.

KAC, G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. **Medical Mycology**, v. 38, n. 5, p. 329-36, 2000.

KAC, G.; BOUGNOUX, M. E.; FEUILHADE DE CHAUVIN, M. et al. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. **British Journal of Dermatology**, v. 140, n. 5, p. 839-844, 1999.

KAMIYA, A.; KIKUCHI, A.; TOMITA, Y. et al. PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 34, n. 1, p. 35-48, 2004.

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

KANBE, T.; SUZUKI, Y.; KAMIYA, A. et al. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, n. 1, p. 41-54, 2003.

- KANO, R.; HIRAI, A.; MURAMATSU, M. et al. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n. 2, p. 267-270, 2003.
- KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S. et al. Differentiation of *Microsporum* species by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and southern hybridization analyses. **Mycoses**, v. 41, n. 5-6, p. 229-33, 1998a.
- KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATARI, T. et al. Identification of clinical isolates of *Microsporum canis* and *M. gypseum* by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. **Mycoses**, v. 41, n. 3-4, p. 139-143, 1998b.
- KASZUBIAK, A.; KLEIN, S.; de HOOG, G. S. et al. Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 4, n. 3, p. 179-186, 2004.
- KAWAI, M. Diagnosis of dermatophytoses: conventional methods and recent molecular biological methods. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 44, n. 4, p. 261-264, 2003.
- KAWASAKI, M.; AOKI, M.; ISHIZAKI, H. et al. Phylogeny of *Epidermophyton floccosum* and other dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p. 121-128, 1996.
- KHOSRAVI, A. R.; MAHMOUDI, M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. **Mycoses**, v. 46, n. 5-6, p. 222-225, 2003.
- KIM, J. A.; TAKAHASHI, Y.; TANAKA, R. et al. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. **Mycoses**, v. 44, n. 5, p. 157-165, 2001.
- KING, D.; CHEEVER, L. W.; HOOD, A. et al. Primary invasive cutaneous *Microsporum canis* infections in immunocompromised patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 460-462, 1996.
- LANGELLA, O. Populations, 1.2.30, 1999 [acesso em 2010 Ago 20]; Disponível em <http://bioinformatics.org/~tryphon/populations/>.
- LEON-MATEOS, A.; PAREDES-SUÁREZ, C.; PEREIRO, M. Jr. et al. Study of the ITS region in an atypical isolate and comparison with six species of *Microsporum*. **Mycoses**, v. 49, n. 6, p. 452-456, 2006.
- LEWIS, D. T.; FOIL C. S.; HOSGOOD, G. Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981-1990. **Veterinary Dermatology**, v. 2, p.53-58, 1991.
- LI, H. C.; BOUCHARA, J. P.; HSU, M. M. et al. Identification of dermatophytes by an oligonucleotide array. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3160-3166, 2007.

LI, H. C.; BOUCHARA, J. P.; HSU, M. M. et al. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, Pt.5, p. 592-600, 2008.

LI, Y.C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T. et al. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 12, p. 2453-2465, 2002.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R. et al. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n.6, p. 493-497, 2000a.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R. et al. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction. **British Journal of Dermatology**, v. 137, n. 3, p. 351-355, 1997.

LIU, D.; COLOE, S.; BAIRD, R. et al. Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n.1, p. 471, 2000b.

LIU, D.; PEARCE, L.; LILLEY, G. et al. A specific PCR assay for the dermatophyte fungus *Microsporum canis*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 2, p. 215-219, 2001.

LUNDER, M.; LUNDER, M. Is *Microsporum canis* infection about to become a serious dermatological problem? **Dermatology**, v. 184, n. 2, p. 87-89, 1992.

MACHADO, M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 225-232, 2004.

MAIA, M. L. S.; DOS SANTOS, J. I.; VIANI, F. C. et al. Phenotypic characterization of *Microsporum canis* isolated from cats and dogs. **Mycoses**, v. 44, n. 11-12, p. 480-486, 2001.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; MOCHIZUKI, T. et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 920-924, 1999.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; MURAKAMI, A. et al. Cluster analysis of human and animal pathogenic *Microsporum* species and their teleomorphic states, *Arthroderma* species, based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1. **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 3, p. 209-216, 2001.

MANCIANTI, F.; GIANNELLI, C.; BENDINELLI, M. et al. Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cats. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 3, p. 257-259, 1992.

- MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHI, S. et al. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 13-18, 2002.
- MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CORAZZA, M. et al. Environmental detection of *Microsporium canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, n.6, p. 323-328, 2003.
- MARCHISIO, V. F.; GALLO, M. G.; TULLIO, V. et al. Dermatophytes from cases of skin lesions in cats and dogs in Turin, Italy. **Mycoses**, v. 38, n. 5-6, p.239-244, 1995.
- MARCHISIO, V. F.; PREVE, L.; TULLIO, V. Fungi responsible for skin mycoses in Turin (Italy). **Mycoses**, v. 39, n. 3-4, p. 141-150, 1996.
- MEDLEAU, L.; RAKICH, P. M. *Microsporium canis* pseudomycetomas in a cat. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 30, n. 6, p. 573-576, 1994.
- MEDLEAU, L.; RISTIC, Z. Diagnosing dermatophytosis in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, v. 87, n. 11, p. 1086-1091, 1992.
- MERCANTINI, R.; MORETTO, D.; PALAMARA, G. et al. Epidemiology of dermatophytoses observed in Rome, Italy, between 1985 and 1993. **Mycoses**, v. 38, n. 9-10, p. 415-419, 1995.
- MIGNON, B. R.; COIGNOUL, F.; LECLIPTEUX, T. et al. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. **Medical Mycology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 1999.
- MIGNON, B. R.; LOSSON, B. Prevalence and characterization of *Microsporium canis* carriage in cats. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 35, n. 4, p. 249-256, 1997.
- MIGNON, B. R.; NIKKELS, A. F.; PIÉRARD, G. E. et al. The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kD keratinolytic subtilase from *Microsporium canis* and the clinical status in naturally infected cats. **Dermatology**, v. 196, n. 4, p. 438-441, 1998a.
- MIGNON, B.; SWINNEN, M.; BOUCHARA, J. P. et al. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. **Medical Mycology**, v. 36, n. 6, p. 395-404, 1998b.
- MOCHIZUKI, T.; SUGIE, N.; UEHARA, M. Random amplification of polymorphic DNA is useful for the differentiation of several anthropophilic dermatophytes. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 405-409, 1997.

- MORGANTI, L.; TAMPIERI, M. P.; GALUPPI, R. et al. Morphological and biochemical variability of *Microsporium canis* strains. **European Journal of Epidemiology**, v. 8, n. 3, p. 340-345, 1992.
- MORIELLO, K. A. Dermatophytosis Symposium, Parts 1-4. **Veterinary Medicine**, v. 98, n. 10, p. 844-891, 2003.
- MORIELLO, K. A. Diagnostic techniques for dermatophytosis. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 16, n. 4, p. 219-224, 2001.
- MORIELLO, K. A.; DeBOER, D. J. Feline dermatophytosis: recent advances and recommendations for therapy. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n. 4, p. 901-921, 1995.
- MORIELLO, K. A.; DeBOER, D. J. Fungal flora of the coat of pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 602-606, 1991a.
- MORIELLO, K. A.; DeBOER, D. J. Fungal flora of the haircoat of cats with and without dermatophytosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 29, n. 5, p.285-292, 1991b.
- MORIELLO, K. A.; KUNKLE, G. A.; DeBOER, D. J. Isolation of dermatophytes from the haircoats of stray cats from selected animal shelters in two different geographic regions in the United States. **Veterinary Dermatology**, v. 5, n. 2, p.57-62, 1994.
- NINET, B.; JAN, I.; BONTEMS, O. et al. Identification of dermatophyte species by 28S ribosomal DNA sequencing with a commercial kit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 826-830, 2003.
- ODOM, R. B. Common superficial fungal infections in immunosuppressed patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3 Pt 2, p. S56-S59, 1994.
- OHST, T.; DE HOOOG, S.; PRESBER, W. et al. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (Dermatophytes). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4444-4448, 2004.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, v. 2, p. 294-307, 2006.
- OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic disorders of the skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 21, n. 3, p.128-134, 2006.
- PEPIN, G. A.; OXENHAM, M. Zoonotic dermatophytosis (ringworm). **Veterinary Record**, v. 118, n. 4, p.110-111, 1986.
- PIER, A. C.; MORIELLO, K. A. Parasitic relationship between *Microsporium canis* and the cat. **Medical Mycology**, v. 36, Suppl 1, p. 271-275, 1998.

PIER, A. C.; SMITH, J. M.; ALEXIOU, H. et al. Animal ringworm-its aetiology, public health significance and control. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, Suppl 1, p. 133-150, 1994.

QUAIFE, R. A.; WOMAR, S. M. *Microsporium canis* isolations from show cats. **Veterinary Record**, v. 110, n. 14, p. 333-334, 1982.

RADENTZ, W. H. Fungal skin infections associated with animal contact. **American Family Physician**, v. 43, n. 4, p. 1253-1256, 1991.

RICHARD, J. L.; DEBEY, M. C.; CHERMETTE, R. et al. Advances in veterinary mycology. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, Suppl 1, p.169-87, 1994.

ROMANO, C.; VALENTI, L.; BARBARA, R. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. **Mycoses**, v. 40, n. 11-12, p. 471-472. 1997.

ROUX, K. H. Optimization and troubleshooting in PCR. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2009(4), pdb.ip66, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SCOTT, D. W.; HORN, R. T. Jr. Zoonotic dermatoses of dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 17, n. 1, p. 117-144, 1987.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, G. E. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**. Philadelphia: Saunders. 6^a edição. 2001. 1528 p.

SEGUNDO, C.; MARTÍNEZ, A.; ARENAS, R. et al. Superficial infections caused by *Microsporium canis* in humans and animals. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, n. 1, p. 39-41, 2004.

SHARMA, R.; DE HOOG, S.; PRESBER, W. et al. A virulent genotype of *Microsporium canis* is responsible for the majority of human infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56 (Pt 10), p. 1377-1385, 2007.

SHEHATA, A. S.; MUKHERJEE, P. K.; ABOULATTA, H. N. et al. Single-step PCR using (GACA)₄ primer: utility for rapid identification of dermatophyte species and strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 8, p. 2641-2645, 2008.

SIMPANYA, M. F.; BAXTER, M. Multiple proteinases from two *Microsporium* species. **Journal of Medical & Veterinary Mycology**, v. 34, n. 1, p. 31-36, 1996.

SIMPANYA, M. F.; JARVIS, B.D.; BAXTER, M. Isozyme variation within and among populations of *Microsporium* species. **Mycoses**, v. 41, n. 11-12, p. 501-508, 1998.

SOUZA, H. J. M.; TEIXEIRA, C. H. R.; GRAÇA, R. F. S. Estudo epidemiológico de infecções pelo vírus da leucemia e/ou imunodeficiência felina, em gatos domésticos do município do Rio de Janeiro. **Clínica Veterinária**, n. 36, p. 14-21, 2002.

SPARKES, A. H.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; SHAW, S. E. et al. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. **Veterinary Record**, v. 133, n. 3, p. 57-61, 1993.

SPARKES, A. H.; WERRETT, G.; STOKES, C. R. et al. *Microsporium canis*: Inapparent carriage by cats and the viability of arthrospores. **Journal of Small Animal Practice**, v.35, p. 397-401, 1994.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, p. 1596-1599, 2007 [acesso em 2010 Ago 20]; Disponível em <http://www.megasoftware.net/>.

THOMAS, M. L. E.; SCHEIDT, V. J.; WALKER, R. L. Inapparent carriage of *M. canis* in cats. **The Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 11, n. 5, p. 563-570, 1989.

TURIN, L.; RIVA, F.; GALBIATI, G. et al. Fast, simple and highly sensitive double-rounded polymerase chain reaction assay to detect medically relevant fungi in dermatological specimens. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n.6, p. 511-518, 2000.

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A. et al. RNA silencing in the dermatophyte *Microsporium canis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 275, n. 1, p. 38-45, 2007.

VIANI, F. C.; CAZARES VIANI, P. R.; GUTIERREZ RIVERA, I. N. et al. 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. 19-23, 2007.

VIANI, F. C.; DOS SANTOS, J. I.; PAULA, C. R. et al. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 463-468, 2001.

WARNER, R. D. Occurrence and impact of zoonoses in pet dogs and cats at US Air Force bases. **American Journal of Public Health**. v. 74, n. 11, p. 1239-1243, 1984.

WHITE, T. C.; OLIVER, B. G.; GRÄSER, Y. et al. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-1245, 2008.

WOODGYER, A. J. Asymptomatic carriage of dermatophytes by cats. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 25, n. 3, p. 67-69, 1977.

YAMADA, T.; MAKIMURA, K.; ABE S. Isolation, characterization, and disruption of *dnr1*, the *areA/nit-2*-like nitrogen regulatory gene of the zoophilic dermatophyte, *Microsporum canis*. **Medical Mycology**, v. 44, n. 3, p. 243-25, 2006.

YANG, G.; ZHANG, M.; LI, W. et al. Direct species identification of common pathogenic dermatophyte fungi in clinical specimens by semi-nested PCR and restriction fragment length polymorphism. **Mycopathologia**, v. 166, n. 4, p. 203-208, 2008.

YU, J.; WAN, Z.; CHEN, W. et al. Molecular typing study of the *Microsporum canis* strains isolated from an outbreak of tinea capitis in a school. **Mycopathologia**, v.157, n. 1, p. 37-41, 2004.

ZAITS, C.; PROENÇA, N. G. Estado atual da taxonomia dos dermatófitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, n. 5, p. 403-406, 1988.

ZAROR, L.; FISCHMANN, O.; BORGES, M. et al. The role of cats and dogs in the epidemiological cycle of *Microsporum canis*. **Mykosen**, v. 29, n. 4, p. 185-188, 1986.

ZAROR. L.; MORENO M. I.; BILBAO. M. T. Tiña por *Microsporum canis* en niños menores de treinta días. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 23, n. 1, p. 1-5, 1985.

APÊNDICE A - Questionário utilizado para coletar dados dos animais sintomáticos

REGISTRO				
NOME				
RAÇA				
PÊLOS				
IDADE				
SEXO				
CIDADE				
CONTÁGIO HUMANO				
Prurido				
Inflamação				
Descamação				
Depilação em placas				
Depilação difusa				
Hiperqueratose				
Comedões				
Crostas				
OBS: Portador Crônico, Portador saudável, Quêrion, Pseudomicetoma, Contágio entre animais				
WOOD				
CULTURA LOCAL				

APÊNDICE B - Aspectos clínicos e anamnese dos animais sintomáticos incluídos no estudo

Registro	Cidade	Espécie	Raça	Idade	Sexo	Moradia	Lesão proprietário
MC1	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
MC3	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
MC4	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
MC5	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
MC7	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
MC8	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
1LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
2LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
5LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
7LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
8LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
9LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
10LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
11LBV	Porto Alegre	Felina	*	*	*	*	*
A37	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Macho	Extradomiciliado	Sim
A38	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Macho	Extradomiciliado	Sim
A40	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado	Sim
A41	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Fêmea	Extradomiciliado	Sim
A42	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado	Sim
A46	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado	Sim
A61	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Macho	Extradomiciliado	Não
A94	Curitiba	Felina	Persa	Adulto	Macho	Extradomiciliado	Não
F3	Florianópolis	Felina	Siamês	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado	Sim
F5	Florianópolis	Felina	SRD	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado	Sim
A111	Florianópolis	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
A112	Florianópolis	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
P2	Porto Alegre	Felina	Siamês	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado	Não
P3	Porto Alegre	Felina	SRD	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado	Não
203	Porto Alegre	Felina	Siamês	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado	Sim
204	Porto Alegre	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
205	Porto Alegre	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
206	Porto Alegre	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado	Não
207	Porto Alegre	Felina	Persa	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado	Não
83LBV	Porto Alegre	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
4LBV	Porto Alegre	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado	Não
6LBV	Porto Alegre	Felina	Persa	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não
M1	Cuiabá	Felina	Persa	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado	Não
A43	Curitiba	Canino	Mestiço	Jovem	Macho	Extradomiciliado	Sim
P1	Porto Alegre	Canino	Poodle	Adulto	Macho	Intradomiciliado	Não

* Dados não recolhidos.

APÊNDICE C - Anamnese dos animais assintomáticos incluídos no estudo

Registro	Cidade	Espécie	Raça	Idade	Sexo	Moradia
A3	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A25	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A27	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A29	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A30	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A31	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A33	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A34	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A35	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A62	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H1	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H2	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H6	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H24	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H26	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
H29	Curitiba	Felina	SRD	*	*	Extradomiciliado
A36	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A44	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado
A45	Curitiba	Felina	SRD	Jovem	Fêmea	Intradomiciliado
A47	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A49	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Intradomiciliado
A50	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Intradomiciliado
A9	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A11	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A13	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A14	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A15	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A16	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A18	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A19	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A21	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A22	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A23	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A69	Curitiba	Felina	SRD	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A48	Curitiba	Canina	Mestiço	Jovem	Fêmea	Extradomiciliado
A67	Curitiba	Canina	Basset Hound	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A70	Curitiba	Canina	Labrador Retriever	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A71	Curitiba	Canina	Mastiff	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A72	Curitiba	Canina	Labrador Retriever	Jovem	Macho	Extradomiciliado
A73	Curitiba	Canina	Basset Hound	Adulto	Fêmea	Extradomiciliado
A74	Curitiba	Canina	Basset Hound	Jovem	Fêmea	Extradomiciliado
A75	Curitiba	Canina	Afghan Hound	Adulto	Macho	Extradomiciliado
A76	Curitiba	Canina	Mastiff	Adulto	Macho	Extradomiciliado

APÊNDICE D - Sinais clínicos e anamnese das pacientes humanos incluídos no estudo

Registro	Cidade	Idade	Sexo	Tipo de <i>Tinea</i>	Contato com animal
A77	Curitiba	7 anos	Masculino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A78	Curitiba	10 anos	Masculino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A80	Curitiba	1 ano	Masculino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A81	Curitiba	6 anos	Feminino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A82	Curitiba	5 anos	Feminino	<i>Tinea capitis</i>	Sim
A83	Curitiba	3 meses	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - dorso	Não
A86	Curitiba	4 anos	Masculino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A88	Curitiba	31 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - braços	Não
A89	Curitiba	8 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - tronco, braços e/ou pernas	Não
A90	Curitiba	3 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - tórax	Sim
A92	Curitiba	4 anos	Masculino	<i>Tinea capitis</i>	Não
A93	Curitiba	37 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - região lombar	Sim
A95	Curitiba	24 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - pernas	Não
A96	Curitiba	42 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - tronco, braços e/ou pernas	Não
A97	Curitiba	9 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - tronco	Não
A98	Curitiba	6 anos	Masculino	<i>Tinea faciei</i>	Não
A99	Curitiba	1 ano	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - pernas	Não
A100	Curitiba	26 anos	Masculino	<i>Tinea corporis</i> - braços	Não
P4	Porto Alegre	24 anos	Feminino	<i>Tinea corporis</i> - braços	Sim