



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos**

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA ATUALIZAÇÃO TAXONÔMICA DE
ESPÉCIES DE *Trichophyton* MANTIDAS NA MICOTECA URM**

Recife

2018

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA ATUALIZAÇÃO TAXONÔMICA DE
ESPÉCIES DE *Trichophyton* MANTIDAS NA MICOTECA URM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Orientador (a): Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Reis Machado

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Oliveira, Tatiana Felix de

Abordagem polifásica na atualização taxonômica de espécies de
Trichphyton mantidas na micoteca URM/ Tatiana Félix de Oliveira- 2018.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Coorientador: Alexandre Reis Machado

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia
de Fungos, Recife, 2018.

Inclui referências

1. Dermatófitos 2. Biologia- classificação 3. Filogenia I. Magalhães,
Oliane Maria Correia (orient.) II. Machado, Alexandre Reis (coorient.) III.
Título

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-253

TATIANA FELIX DE OLIVEIRA

**ABORDAGEM POLIFÁSICA NA ATUALIZAÇÃO TAXONÔMICA DE
ESPÉCIES DE *Trichophyton* MANTIDAS NA MICOTECA URM**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 08 / 03 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Dra. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Cristina Maria de Souza Motta

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Jadson Diogo Pereira Bezerra

Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por permitir tantas realizações na minha vida, por conseguir passar por tantos obstáculos e permanecer sempre firme nas minhas decisões. Sou muito abençoada por Ele por mais essa conquista. Agradeço aos meus pais Mônica Felix e Jair Oliveira por todo o esforço que sempre fizeram por mim, eu sou eternamente grata por tê-los em minha vida, os amo incondicionalmente. Ao meu irmão Rodolfo Felix pelo companheirismo de sempre. Aos meus avós Lindalva Oliveira e Milton Felix que são um exemplo de vida pra mim, sempre foram tão presentes como meus pais são, estão lá no céu mas sei que estão olhando por mim sempre, sinto tanta falta e essa conquista eu dedico especialmente à eles. Agradeço à toda minha família, por tanto carinho e amor, vocês são essenciais na minha vida. Às minhas amigas que sempre estão comigo me apoiando em todos os momentos, agradeço por todo companheirismo e amizade verdadeira, amo todas. Aos meus companheiros de bancada e pesquisa de todos os dias do Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, agradeço muito por todo auxílio nesse trabalho, são muito especiais pra mim. Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Oliane Magalhães, pela oportunidade, por todo ensinamento, paciência e por sempre estar disposta a ajudar em tudo, não tenho nem palavras para agradecer. Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Alexandre Machado, pelo aprendizado recebido, pela disponibilidade para auxiliar nos experimentos e pelas explicações, serei eternamente grata. Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco e ao Departamento de Micologia onde foi desenvolvido esse trabalho e também à Micoteca URM por fornecer as culturas para que o estudo fosse realizado e pela disponibilização do Laboratório de Biologia Molecular. Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fornecimento da bolsa de estudo durante todo esse período. Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho, gratidão por ter conseguido mais um objetivo na minha vida.

RESUMO

Os fungos dermatófitos pertencem ao filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales e família Arthrodermataceae. O gênero *Trichophyton* pertence à esse peculiar grupo de fungos, sendo um gênero com uma grande variedade fenotípica e uma baixa variabilidade genética, sendo portanto, de difícil identificação. A sua taxonomia sempre foi baseada em características morfofisiológicas, o que gerava dúvidas devido à heterogeneidade fenotípica entre as espécies. Os estudos moleculares tem sido um grande progresso na taxonomia desse grupo de fungos, especificamente do gênero *Trichophyton*, visto que dentro desse gênero há a problemática dos complexos de espécies. O objetivo do estudo foi aplicar abordagem taxonômica polifásica para legitimar e atualizar taxonomicamente 44 culturas de *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* mantidas na Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A análise molecular foi baseada no sequenciamento das regiões gênicas β -tubulina e ITS. Foram realizadas análises das características fenotípicas de colônia central e características micromorfológicas. Para determinação das características fisiológicas foram observadas atividade ureásica e crescimento em meio contendo caseína. Com a análise molecular, sete culturas que estavam identificadas como *T. mentagrophytes* foram identificadas como *T. interdigitale*, duas como *T. rubrum* e uma como *T. quinckeanum*. Todas as culturas identificadas como *T. rubrum* legitimadas. Das culturas identificadas como *T. tonsurans*, nove foram legitimadas e sete foram reclassificadas como *T. rubrum* (três culturas) e *T. interdigitale* (quatro culturas). As culturas das espécies *T. interdigitale* e *T. tonsurans* apresentaram uma grande variabilidade fenotípica e micromorfológica. A detecção da urease conseguiu separar *T. interdigitale* de *T. rubrum*, mas não conseguiu separar *T. tonsurans*. No teste da caseína, foi possível identificar mas não conseguiu separar as espécies *T. interdigitale* e *T. rubrum*, porém não conseguiu identificar e nem separar *T. tonsurans*. Pode-se concluir a partir da utilização das diferentes metodologias, que a identificação de espécies de *Trichophyton* baseada em caracteres morfofisiológicos pode ser duvidosa para algumas espécies, assim, os métodos moleculares são indicados como uma alternativa viável e segura para auxiliar nessa importante tarefa.

Palavras-chave: Dermatófitos. Revisão taxonômica. Filogenia.

ABSTRACT

The dermatophyte fungi belong to the phylum Ascomycota, class Eurotiomycetes, order Onygenales and family Arthrodermataceae. The genus *Trichophyton* belongs to this peculiar group of fungi, being a genus with a great phenotypic variety and a low genetic variability, being therefore difficult to identify. Its taxonomy has always been based on morphophysiological characteristics, which raised doubts due to the phenotypic heterogeneity between the species. Molecular studies have been a great progress in the taxonomy of this group of fungi, specifically of the genus *Trichophyton*, since within this genus there is the problematic of the species complexes. The aim of the study was to apply polyphase taxonomic approach to legitimize and taxonomically update 44 cultures of *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* and *T. tonsurans* kept in the URM Micoteca of the Federal University of Pernambuco. The molecular analysis was based on the sequencing of the β -tubulin and ITS gene regions. Analyses of phenotypic characteristics of central colony and micromorphological characteristics were performed. To determine the physiological characteristics, urease activity and growth in casein-containing medium were observed. With molecular analysis, seven cultures that were identified as *T. mentagrophytes* were identified as *T. interdigitale*, two as *T. rubrum* and one as *T. quinckeanum*. All cultures identified as *T. rubrum* legitimized. Of the cultures identified as *T. tonsurans*, nine were legitimized and seven were reclassified as *T. rubrum* (three cultures) and *T. interdigitale* (four cultures). The cultures of the species *T. interdigitale* and *T. tonsurans* presented a great phenotypic and micromorphological variability. Urease detection was able to separate *T. interdigitale* from *T. rubrum*, but failed to separate *T. tonsurans*. In the casein test, it was possible to identify but could not separate *T. interdigitale* and *T. rubrum* species, but could not identify or separate *T. tonsurans*. It can be concluded from the use of different methodologies that the identification of *Trichophyton* species based on morphophysiological characters may be doubtful for some species, thus, molecular methods are indicated as a viable and safe alternative to assist in this important task.

Key words: Dermatophyte. Taxonomic revision. Phylogeny.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características macro e micromorfológicas das espécies de <i>Trichophyton</i>	20
Tabela 2 - Relação do substrato/hospedeiro com o ano de depósito das culturas de <i>Trichophyton</i>	29
Tabela 3 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas anteriormente identificadas como <i>Trichophyton mentagrophytes</i> mantidas na Micoteca URM	35
Tabela 4 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas identificadas como <i>Trichophyton rubrum</i> mantidas na Micoteca.....	38
Tabela 5 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas identificadas anteriormente como <i>Trichophyton tonsurans</i> mantidas na Micoteca URM.	41

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de formas típicas e atípicas de culturas identificadas como <i>Trichophyton interdigitale</i> em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) <i>T. interdigitale</i> URM 6211, colônia branca algodonosa com o reverso creme amarronzado (C) e (D) <i>T. rubrum</i> URM 2875, colônia branca pulverulenta com o reverso marrom no centro (E) e (F) <i>T. rubrum</i> URM 3239, colônia acinzentada cotonosa, um pouco cerebriforme com o reverso amarronzado (G) e (H) <i>T. quinckeanum</i> URM 5538, colônia branca cotonosa com o reverso creme.	36
Figura 2- Micromorfologia de culturas típicas e atípicas de culturas identificadas como <i>Trichophyton interdigitale</i> . Presença de microconídios globosos (A); Presença de microconídios globosos e piriformes (B) e (C); Presença de macroconídio (B); Presença de microconídios piriformes (D).	37
Figura 3- Micromorfologia da cultura identificada como <i>Trichophyton quinckeanum</i> . Presença de microconídios globosos agrupados (A); Presença de hifas espessas (B).	37
Figura 4- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de culturas identificadas como <i>Trichophyton rubrum</i> em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) URM 6753 colônia acinzentada pulverulenta com o reverso vermelho; (C) e (D) URM 4726 colônia branca cotonosa cerebriforme com o reverso creme; (E) e (F) URM 4258 colônia branca pulverulenta com o reverso marrom.	39
Figura 5- Micromorfologia de culturas de <i>Trichophyton rubrum</i> com os microconídios piriformes clavados ao redor das hifas (A) e microconídios piriformes sem estar clavados em torno das hifas (B).	40
Figura 6- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de culturas típicas e atípicas identificadas como <i>Trichophyton tonsurans</i> na Micoteca URM em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) URM 450 (<i>T. interdigitale</i>) colônia branca algodonosa com o reverso marrom amarelado; (C) e (D) URM 700 (<i>T. interdigitale</i>) colônia branca algodonosa com o reverso creme amarelado; (E) e (F) URM 5544 colônia branca pulverulenta com o reverso marrom no centro; (G) e (H) URM 4743 colônia branca cotonosa com o reverso creme; (I) e (J) URM 4944 colônia branca cotonosa com o reverso marrom.	42

Figura 7- Micromorfologia de culturas típicas e atípicas identificadas como <i>Trichophyton tonsurans</i> com a presença de microconídios de formas variadas (piriformes, esféricos) (B); e macroconídio (C); presença de numerosos microconídios globosos e esféricos (A); e microconídios piriformes clavados em torno da hifa (D). (A) URM 771 (<i>T. interdigitale</i>) (B) URM 4965 (<i>T. tonsurans</i>) (C) URM 4948 (<i>T. tonsurans</i>) (D) URM 4963 (<i>T. tonsurans</i>).	42
Figura 8- (A) Resultado positivo do teste de urease para a cultura de <i>Trichophyton interdigitale</i> ; (B) Resultado negativo do teste de urease para a cultura de <i>Trichophyton rubrum</i>	44
Figura 9- (A) Ágar caseína com padrão de crescimento 1+ de culturas de <i>Trichophyton</i> ; (B) Ágar caseína com padrão de crescimento 4+ de culturas de <i>Trichophyton</i>	44
Figura 10- Árvore filogenética das espécies de <i>Trichophyton</i> obtida por inferência bayesiana da região gênica β -tubulina. Os valores de probabilidade posterior estão mostrados sobre os nós.	46
Figura 11- Árvore filogenética das espécies de <i>Trichophyton</i> obtida por inferência bayesiana das regiões gênicas β -tubulina e ITS combinadas. Os valores de probabilidade posterior estão mostrados sobre os nós. A árvore foi enraizada com a espécie <i>Microsporum gypseum</i> CBS147.	47

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo Geral	14
1.2.2 Objetivos Específicos.....	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 HISTÓRICO DA TAXONOMIA DOS DERMATÓFITOS	15
2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Trichophyton</i>	18
2.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Trichophyton</i>	20
2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Trichophyton</i>	22
2.5 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Trichophyton</i>	23
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS	25
3.2 REATIVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA	26
3.2.1 Análise molecular e filogenética.....	26
3.2.2 Análise Fenotípica	27
3.2.3 Análise fisiológica	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 VIABILIDADE DAS CULTURAS.....	29
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA.....	31
4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	32
4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA	43
5 CONCLUSÃO	48

REFERÊNCIAS.....49

1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são fungos que invadem e se propagam em peles queratinizadas de mamíferos, incluindo humanos, causando doenças infectocontagiosas, conhecidas como dermatofitoses. As dermatofitoses são infecções fúngicas de cabelo, pele e unhas causadas por esses fungos filamentosos queratinofílicos e estão entre as infecções cutâneas mais frequentemente diagnosticadas em todo o mundo, sendo uma preocupação de saúde em várias regiões geográficas (Maraki; Mavromanolaki, 2016; Wu et al, 2009). Esta doença tem sido uma das principais preocupações tanto para a área veterinária como da saúde pública, uma vez que implica em muitos custos devido a sua natureza crônica, demandando terapias de longa duração, como também pela morbidade de causam (Cafarchia et al., 2013; Ahmadi et al., 2016). Os dermatófitos pertencem aos grupos mais antigos e mais frequentemente encontrados de microorganismos que foram reconhecidos como agentes de micoses superficiais (de Hoog et al., 2017).

Os dermatófitos estão classificados no filo Ascomycota, classe Eurotiomycetes, ordem Onygenales e família Arthrodermataceae segundo Hibbett et al. (2007), tendo como principais representantes os gêneros anamorfos *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, e teleomorfo *Arthroderma*, que apresentam extrema importância médica (Cafarchia et al., 2013).

As espécies de interesse médico mais frequentemente isoladas no Brasil são: *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. tonsurans* (Fisher e Cook, 2001; Lacaz et al., 2002; Sidrim e Rocha, 2004).

Durante anos a taxonomia dos dermatófitos tem sido conduzida apenas por métodos morfológicos baseados nas características fenotípicas e, quando necessário, por métodos fisiológicos, porém é muitas vezes considerada complexa, principalmente devido ao alto grau de semelhanças morfológicas entre as espécies, exigindo prática, conhecimento científico e a aplicação de diferentes abordagens durante o processo de identificação (Dabrowska, 2014). Contudo, nos últimos anos, a utilização de ferramentas moleculares tem apontado um progresso considerável na identificação e classificação destes fungos, como também tem contribuído significativamente para os

avanços na sua taxonomia, ecologia, epidemiologia e entendimento dos processos evolutivos (Putignani et al., 2010; Cafarchia et al., 2013).

Os atuais avanços na taxonomia molecular têm apontado *T. mentagrophytes* como um complexo de espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas, com diferentes fases sexuadas, sendo sua identificação molecular fundamental para uma ampla compreensão das implicações clínica e epidemiológica e da heterogeneidade genética desse complexo (Cafarchia et al., 2011, 2013; Ahmadi et al., 2016; Pchelin et al., 2016).

Análises de polimorfismos através de técnicas de PCR-RFLP para a região transcrita interna (ITS) e região do espaçamento não transcrita (NTS) (Jackson et al., 1999), análises da repetição da região interna variável (VIR) e NTS (Anzawa et al., 2011) têm se mostrado por muito tempo como ferramentas valiosas para identificação de espécies de dermatófitos, porém técnicas baseadas em análises de polimorfismos em gel de agarose podem estar sujeitas a variações e apresentar problemas de repetitividade entre os ensaios. Os avanços recentes nas técnicas moleculares tornaram o sequenciamento de regiões gênicas ou mesmo do genoma completo de fungos mais viáveis e acessíveis, tem possibilitado a obtenção de resultados mais confiáveis e reprodutíveis nos trabalhos taxonômicos (Cafarchia et al., 2013).

Recentemente, análises filogenéticas de várias regiões gênicas como ITS, β -tubulina (BT2), fator de alongamento da tradução (TEF-1 α), e calmodulina se mostraram como marcadores genéticos úteis para a identificação de espécies de dermatófitos, além de possibilitar a separação dos complexos de espécies envolvendo esse importante grupo de patógeno de humanos e animais. Mas ainda sugere-se que estudos de outros *loci* são necessários para confirmação dos resultados (Cafarchia et al., 2013; Ahmadi et al., 2016).

Dessa forma, as análises filogenéticas de diferentes regiões gênicas do genoma de fungos, aliadas às análises morfológicas e fisiológicas, compõem assim uma abordagem polifásica que oferece uma identificação mais precisa das espécies, sendo indispensáveis para atualização da taxonomia de culturas mantidas em coleções. Os dados sobre as culturas de dermatófitos utilizadas neste estudo irão atualizar a taxonomia no banco de dados da Coleção de Culturas - Micoteca URM, proporcionando possibilidades para pesquisadores e usuários, os quais terão aquisição a um maior

número de linhagens com identificação polifásica. Além disso, uma identificação precisa destes isolados fornecerá base para futuros estudos e serão cruciais para o desenvolvimento de técnicas de controle e prevenção para o estabelecimento de terapias antifúngicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Aplicar abordagem taxonômica polifásica para legitimar e atualizar taxonomicamente culturas de *Trichophyton* mantidas na Micoteca URM.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Confirmar a viabilidade das culturas de *Trichophyton* mantidas na Micoteca URM;
- Caracterizar através de análises filogenéticas, fenotípicas e fisiológicas culturas de *Trichophyton* mantidas na Micoteca URM;
- Legitimar e atualizar taxonomicamente por meio de taxonomia polifásica culturas de *Trichophyton* mantidas na Micoteca URM.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA TAXONOMIA DOS DERMATÓFITOS

A micologia médica se iniciou com o estudo dos fungos dermatófitos por Robert Remak, em 1839, ao estudar a etiologia do Favus, conhecida como tineia que são micoses superficiais. A taxonomia desses fungos foi iniciada em 1841 com os estudos de Robert Remak e David Gruby. David Gruby, em 1843 redescobriu a etiologia do Favus, criando o gênero *Microsporum* e reafirmando a etiologia fúngica de todas as tineas (Elewski, 2000). O gênero *Trichophyton* foi descrito em 1845 pelo sueco Malmsten e o gênero *Epidermophyton* por Sabouraud, em 1907. Raymond Jacques Andrien Sabouraud, dermatologista formado no Instituto Pasteur, é considerado o fundador da micologia médica moderna através de seu tratado Lês Tignes, publicado em 1910, que o complicado problema de classificação e identificação dos fungos dermatófitos foi esclarecido, baseando-se na morfologia e fisiologia destes microrganismos (Arora et al., 1991; Tartor; El Damaty; Mahmmoud, 2016).

Em 1934, Emmons propôs uma nova classificação para os dermatófitos baseando-se em aspectos microscópicos dos conídios formados e na capacidade que esses fungos apresentavam de crescer em meios especiais, principalmente nos meios contendo grãos de cereais, e a partir dessas características o gênero *Achorium* foi unificado ao gênero *Trichophyton* (Sidrim et al., 2004b). Sendo assim, os dermatófitos são taxonomicamente classificados nos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* (Ahmadi et al, 2015).

A espécie *T. tonsurans* foi descrita em 1845 por Malmsten, *T. mentagrophytes* foi descrita em 1896 por Blanchard e *T. rubrum* foi descrita por Sabouraud em 1911. Na taxonomia recentemente proposta, o gênero *Trichophyton* contém 16 espécies, mas poucas são relevantes para diagnósticos de rotina (Ahmadi et al., 2016).

Em 1959, Dawson e Gentles descreveram o estado perfeito (teleomorfo ou sexuado) de alguns dermatófitos e de fungos geofílicos não patogênicos (fungos afins), permitindo grande avanço na taxonomia dos dermatófitos (Rippon, 1988). Os dermatófitos no estado sexuado ou teleomorfo foram reclassificados no gênero *Arthroderma* (Currey, 1854) ou *Nannizzia* (Stockdale, 1961). Weitzman et al., em 1995, concluíram, através de estudos morfológicos que *Nannizzia* e *Arthroderma* constituíam

um só gênero, tendo sido adotada na taxonomia a denominação *Arthroderma* (Weitzman, Summebell, 1995).

As formas assexuadas das espécies de dermatófitos são relativamente bem diferenciadas pela macromorfologia das colônias e pela presença ou ausência de macro e microconídios (número, forma e tamanho). Estes recursos morfológicos e biológicos permitiram o estabelecimento de diferentes espécies sob características morfológicas e biológicas (Garces et al., 2016). Os dermatófitos são um grupo único, altamente especializado e estreitamente inter-relacionado de fungos filamentosos (Mirhendi et al., 2015). Podem estar associados a seres humanos (antropofílicos) e outros animais (zoofílico) em seu habitat natural, enquanto o terceiro grupo ocorre no solo (geofílico) (de Hoog, et al., 2017). Muitas populações sofrem de dermatofitoses, embora a biologia destes fungos seja amplamente desconhecida. As razões são parcialmente atribuídas à pouca adequabilidade dos dermatófitos à manipulação genética. No entanto, os avanços neste campo ao longo da última década tornou possível conduzir estudos genéticos a extensões satisfatórias (Takahata et al., 2016).

Filogeneticamente eles compreendem um grupo heterogêneo com relativamente baixa variação genética, combinada com uma alta diversidade fenotípica (Mirhendi et al., 2014). A identificação é complicada e útil devido à variabilidade morfológica e polimorfismo demonstrado pelos dermatófitos (Tartor; El Damaty; Mahmmoud; 2016). Para resolver as relações evolutivas entre dermatófitos, métodos baseados em biologia molecular foram usados desde o início de 1980 (de Hoog et al., 2017).-Apesar de sua importância médica, poucos estudos estão disponíveis sobre a variabilidade intraespecífica e interespecífica de *Trichophyton* e outros dermatófitos, assim como para os aspectos de sua filogenia (Nascimento; Rossi, 2001)

Para a identificação preliminar de dermatófitos, o estudo das características micro e macromorfológicas das colônias é essencial e, em alguns casos deve-se usar critérios fisiológicos e nutricionais (Garces et al., 2016). A partir do ano de 1994, o conceito filogenético das espécies revolucionou impressionantemente a taxonomia dos dermatófitos e, para facilitar a identificação precisa destes fungos, o foco mudou para a utilização de métodos moleculares (Ahmadi et al., 2014).

Assim, embora a morfologia seja essencial para taxonomia em geral, é por si só insuficiente para identificação ou diferenciação de espécies, porque além de compartilhar uma série de características morfológicas, algumas espécies também apresentam variações atípicas na sua cultura (Nascimento; Rossi, 2001). A morfologia atípica, o pleomorfismo, o requisito para meios especializados, o tempo de incubação prolongado, a incapacidade de esporulação e os resultados confusos da abordagem fenotípica, tornam os dermatófitos notoriamente difíceis de identificar exigindo o desenvolvimento de métodos mais simples e acurados de identificação. Até um tempo atrás, a nomenclatura dos dermatófitos era instável; no entanto, a "neotipificação" de Gräser et al. (2000) reformou recentemente a nomenclatura para dar cumprimento aos dados genéticos disponíveis (Ahmadi et al., 2015).

Nas últimas duas décadas, a sequenciação de DNA e a sistemática molecular geraram novos conceitos de espécies em dermatófitos. Isto causou uma redução no número de táxons reconhecidos e, por outro lado, levou à descoberta de algumas espécies crípticas e novas. No entanto, a definição de fronteiras taxonômicas de algumas espécies ainda é discutida, por exemplo, o complexo de espécies de *T. mentagrophytes* (Mirhendi et al., 2015).

Durante a última década, registraram-se progressos na sistemática moderna dos dermatófitos, no entanto, algumas questões ainda não foram elucidadas. Existem problemas com a caracterização de dermatófitos que não são apenas relevantes para análise filogenética e identidade de análise taxonômica, mas também à microbiologia clínica e epidemiologia, uma delas é a definição de espécies pertencentes ao complexo *T. mentagrophytes*. Conceitos diferentes de espécies baseadas em características fenotípicas, ecológicas e os dados biológicos foram comparados com a filogenia. As características clássicas podem não só ser instáveis e/ou imprecisas, mas também a linha de base genética para conceitos fenotípicos podem não estar claras (Fréalte et al., 2007).

Houve mudanças na taxonomia dos dermatófitos devido à utilização das técnicas moleculares, como alguns desses nomes são agora considerados espécies em vez de variedades, como por exemplo, a espécie *T. interdigitale* (Beguin et al., 2012) que possui algumas cepas antropofílicas ou zoofílicas, que eram classificados como parte do complexo *T. mentagrophytes* que incluía as variedades: *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*, *T. mentagrophytes* var. *nodulare*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. mentagrophytes* var. *granulosum*, *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum*, *T.*

mentagrophytes var. *erinacei*, que foram elevadas à categoria de espécie (Garces et al., 2016).

Análises filogenéticas e utilização de espécies filogenéticas baseadas em conceitos a partir de regiões do rDNA como a região ITS (*Internal Transcribed Spacers*) tem melhorado a taxonomia, mas a confirmação e refinamento usando outros genes ainda estão para ser desenvolvidos. Os primeiros estudos moleculares de membros dos dermatófitos utilizaram como base a região ITS do rDNA (Garces et al., 2016; Makimura et al., 1998), mas outros genes vem sendo utilizados ao longo dos anos, tais como LSU (Partial Large Subunit), β -tubulina (BT2), quitina sintase 1 (CHS1), DNA topoisomerase II (TOP-II) e fator de elongação da tradução 1- α (Tef-1 α) com intuito de facilitar a identificação dos dermatófitos (Abastabar et al., 2014; Ahmadi et al., 2016; de Hoog et al., 2017). Alguns estudos mais recentes indicam o gene calmodulina como um bom marcador para análise genética de dermatófitos (Ahmadi et al., 2016), porém um estudo de Hoog et al. (2017) mostrou que as regiões gênicas ITS, LSU e β -tubulina combinadas foram suficientes para a separação das espécies de *Trichophyton* e definiu isolados de referência para comparação.

Assim sendo, a caracterização de novos marcadores genéticos para o grupo dos dermatófitos é necessário, visto que ainda buscam-se genes mais apropriados para a filogenia (Koc et al., 2017). Com a dificuldade na identificação dos dermatófitos, os métodos morfofisiológicos aliados aos métodos moleculares, compondo uma taxonomia polifásica, se tornam de extrema importância fornecendo uma identificação acurada, tendo em vista que as espécies são estreitamente relacionadas (Graser; Scott; Summerbeel, 2008).

2.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Trichophyton*

Raimond Sabouraud, um dos mais conhecidos e um dos primeiros micologistas médicos, iniciou sua pesquisa científica com estudos de dermatófitos em torno de 1890. As contribuições de Sabouraud incluíram seus estudos sobre a taxonomia, morfologia e métodos de cultura dos dermatófitos. Em 1934, Chester Emmons modernizou o esquema taxonômico de Sabouraud e estabeleceu a classificação dos dermatófitos com base na morfologia dos esporos e estruturas acessórias (Graser;

Scott; Summerbeel, 2008). O crescimento das espécies do gênero *Trichophyton* pode ocorrer em diversos tipos de meio, o mais utilizado é o Sabouraud Dextrose Ágar (SDA), crescendo bem à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com crescimento entre 7 e 14 dias de incubação (Ates et al., 2008).

A forma antropofílica de *T. mentagrophytes* no meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) tem crescimento entre 7 e 14 dias, geralmente cresce de forma plana com aspecto aveludado, bordas brancas e uma área central cor de creme. Isolados zoofílicos produzem colônia plana com rápido crescimento de aspecto granular, de cor amarelada. Às vezes a colônia pode ser na cor marrom-avermelhada. O micélio pode ser escasso e a aparência granular é devido à produção de inúmeros microconídios (Ates et al., 2008).

Inúmeras variações na morfologia da colônia são observadas no complexo *T. mentagrophytes*, como o aspecto aveludado ou cotonoso, coloração podendo variar do branco ao amarelado ou cor de creme, com a pigmentação do reverso podendo estar presente ou ausente. As características microscópicas típicas de *T. mentagrophytes* são a presença de numerosos microconídios, alguns macroconídios e hifas em espiral. Podendo apresentar corpos nodulares, clamidosporos, micélio em raquete, hifas semelhante a chifre também podem ser observadas (Oyeka, 2000).

As colônias de *T. rubrum* no meio SDA, à temperatura ambiente com 14 dias de incubação em seu isolamento primário são cotonosas e brancas, tornando-se aveludadas, com o reverso apresentando pigmentação de avermelhada a rosa-púrpura. Muitas vezes, a coloração no início do crescimento é amarela, escurecendo gradativamente até se tornar vermelha. Os microconídios são clavados, estando dispostos ao longo das hifas ou em cachos. Geralmente, os cultivos primários produzem raros macroconídios (Yo et al., 2016).

As colônias de *T. tonsurans* no meio SDA, à temperatura ambiente com 14 dias de incubação, normalmente apresentam a superfície central elevada ou umbilicada, pregueada, de cor amarelada nas depressões, podendo ser aveludada a pulverulenta, com tonalidades variadas como branca, branco-amarelada, amarela, cinza, acastanhada ou marrom. O reverso da colônia apresenta pigmento variável de marrom-amarelado, ocre a vermelho ou vermelho-escuro. Possuem microconídios clavados de tamanhos e formas variadas, sésseis ou em pedúnculos curtos são produzidos em grande número. Podem ser observados conídios dilatados (“formas em balão”), conídios filiformes ou encurvados, dispostos lateralmente em hifas irregulares (Yo et al., 2016).

A identificação morfológica não é apenas demorada, mas também não é fácil para pessoas sem treinamento adequado porque os isolados clínicos às vezes apresentam formas atípicas. Apesar das características macro e micromorfológicas serem importantes na identificação, nas últimas décadas não podem ser consideradas como única característica para classificação ou identificação (de Hoog et al., 2017).

Tabela 1 - Características macro e micromorfológicas das espécies de *Trichophyton*

Espécie	Macromorfologia	Micromorfologia
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa, com pigmento que vai do amarelo ao marrom no verso	Macroconídios do gênero, microconídios globosos numerosos
<i>Trichophyton rubrum</i>	Colônia branca, granular ou cotonosa com pigmento vermelho no verso	Microconídios em gota dispostos ao longa da hifa e macroconídios, que quando existem, são comuns do gênero
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Colônia acastanhada com pigmento vermelho-verruiginoso no verso	Microconídios numerosos e polimórficos, usualmente clavados ou alongados

Fonte: O autor (2018).

2.3 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO

Trichophyton

Georg & Camp (1956) descreveram métodos para diferenciar alguns fungos com características morfológicas semelhantes, como os dermatófitos. Testes fisiológicos podem ser úteis em situações em que as técnicas morfológicas convencionais não conseguem fornecer uma identificação adequada de um isolado (Philpot, 1977). Os testes fisiológicos usuais incluem as exigências nutricionais, como

por exemplo, a prova Ágar-caseína e o teste da perfuração do pêlo, os testes de assimilação de carboidratos e as atividades enzimáticas, sendo a prova da urease mais utilizada (Sidrim & Rocha, 2004).

Para verificar a atividade de diversas enzimas normalmente são utilizadas técnicas de difusão em ágar com o uso de meios sólidos, sendo os resultados expressados pela formação de halos, resultantes da hidrólise dos substratos específicos ou pela mudança de cor do indicador contido no meio de cultura (Price et al., 1982).

Ensaio adicionais incluem o teste de urease que é largamente utilizado na identificação dos dermatófitos, sendo particularmente útil na diferenciação de *T. mentagrophytes* (urease positiva) das demais espécies de *Trichophyton*, sendo um método rápido e viável de separar principalmente as espécies *T. mentagrophytes* e *T. rubrum* (Philpot, 1967). Esse teste é processado em meio de Christensen, e identifica a presença ou ausência da enzima urease que é produzida por algumas espécies de fungos (Sidrim & Moreira, 1999; Sidrim & Rocha, 2004). Este teste baseia-se na capacidade de determinadas espécies de dermatófitos produzirem a enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio (Cabañes, 2001).

O teste de assimilação de carboidratos, também denominado auxonograma, consiste na capacidade que uma espécie de fungo apresenta de crescer aerobiamente na presença de determinado carboidrato, fornecido como única fonte de carbono. O teste é realizado em meio sólido acrescido da suspensão do microrganismo a ser testado. Os seguintes carboidratos podem ser fornecidos ao meio: insulina, ramnose, L-arabinose, celobiose, dextrose, sacarose, rafinose, dulcitol, melobiose, trealose, galactose, maltose, xilose, inositol e lactose. As espécies do gênero *Trichophyton* apresentam um perfil de assimilação diferente e a leitura é feita após 14 dias, mediante visualização de halos de crescimento que se formam ao redor do carboidrato assimilado (Brilhante et al., 2005).

A prova de requerimentos vitamínicos também é utilizada na identificação, para diferenciação de cepas baseadas em exigências nutricionais. Os meios de cultura utilizados são enriquecidos com ácido nicotínico, tiamina, histidina e inositol, sendo utilizada a caseína como base do meio, em que é realizada uma quantificação subjetiva e comparativa do crescimento fúngico (Sidrim & Moreira, 1999; Sidrim & Rocha, 2004).

Apesar da importância dos métodos morfofisiológicos, a utilização de métodos moleculares é essencial para a identificação de dermatófitos, sendo recomendável o

sequenciamento de regiões gênicas, que representa um meio de identificação bastante valioso e rápido (Graser; Scott; Summerbell, 2008).

2.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO

Trichophyton

Os vários problemas com as culturas com grande variabilidade fenotípica, dificuldade de esporulação, inerentes ao lento crescimento dos dermatófitos, conseqüentemente a demora na identificação, levou vários grupos a desenvolver métodos de PCR confiáveis e adequados para identificá-los rapidamente (Verrier e Monod, 2017).

Para os dermatófitos, os métodos baseados em PCR têm sensibilidade e especificidade promissoras e demonstraram um valor potencial para a identificação precoce e genotipagem de isolados fúngicos. Os dermatófitos variam significativamente em diversos níveis taxonômicos em todo o mundo, além da genotipagem (Koc et al., 2017).

Os primeiros artigos moleculares usaram as subunidades pequenas (SSU) e grandes ribossômicas (LSU) como marcadores. Em uma série de trabalhos, Gräser et al. (2000) aplicaram a região ITS do rDNA mais variável e conseguiram resolver um grande número de espécies, assim, regiões do rDNA provaram ser úteis como um método padrão ouro na identificação e análise filogenética (Ahmadi et al., 2016) (Hoog et al., 2017)

Este sistema molecular foi confirmado várias vezes em estudos posteriores e com diferentes marcadores moleculares como BT2 e TEF1. β -tubulina é uma proteína globular monomérica envolvida na geração de microfilamentos e recentemente tem sido usada com sucesso para delinear espécies de dermatófitos e em outros grupos de fungos. O *loci* inclui alguns íntrons, que são conhecidos por serem bons estimadores para distinção de espécies estreitamente relacionadas (Rezaei-Matehkolaei et al., 2014).

A principal topologia da família Arthrodermataceae parece ser molecularmente estável, mas não corresponde inteiramente à morfologia, pois *Trichophyton* parece ser polifilético. Conforme observado em artigos anteriores de Gräser et al. (2000) as espécies antropofílicas são confinadas a alguns grupos derivados,

as espécies zoofílicas de hospedeiros de mamíferos domesticados estão localizadas no meio da árvore filogenética, enquanto as espécies geofílicas estão localizadas em uma posição ancestral e os grupos mais baixos ainda são instáveis. Embora a abordagem molecular tenha sido capaz de resolver os principais traços da evolução dos fungos dermatófitos pode haver falha nos detalhes, como na elucidação dos complexos envolvendo as espécies, devido à heterogeneidade fenotípica e semelhança entre os genótipos desse grupo. Pequenas ambiguidades de sequenciamento ou dados faltantes neste grande conjunto de dados podem desfocar as pequenas diferenças entre as espécies emergidas recentemente. Além disso, a definição de fronteiras taxonômicas de algumas espécies ainda permanece discutível, por exemplo, complexos de espécies de *T. mentagrophytes* (Mirhendi et al., 2015). O complexo *Trichophyton rubrum* inclui duas espécies antropofílicas, *T. rubrum* e *T. violaceum* que são praticamente indistinguíveis através de análise de biologia molecular (Garces et al., 2016)

As técnicas moleculares podem ser ferramentas de diagnóstico importantes para os micologistas que trabalham com *T. tonsurans*, pois apresenta uma grande heterogeneidade fenotípica entre as cepas (Sidrim et al., 2013). Vários estudos recentes utilizando técnicas de biologia molecular examinaram isolados de *T. tonsurans*, detectando assim diferentes tipos moleculares entre os isolados (de Hoog et al., 2017).

Portanto, com a escassez de pesquisas disponíveis sobre essas espécies, são necessários estudos polifásicos combinando dados moleculares, ecológicos, fenotípicos e de ciclo de vida para estabelecer com certeza a validade taxonômica de cada táxon. Portanto, as espécies delimitadas com base na taxonomia polifásica permanecem com conceitos essenciais para a nomenclatura confiável (de Hoog et al., 2017)

2.5 TAXONOMIA DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Trichophyton*

Trichophyton mentagrophytes é um complexo de espécies antropofílicas e zoofílicas com diferentes teleomorfos, levando a uma confusão em relação à denominação de espécies, sendo um organismo muito variável e muitas características não são consistentes como a presença ou ausência de pigmentação, tempo de incubação e esporulação, como também a forma e arranjo dos microconídios (Ahmadi et al., 2016, Oyeka, 2000). O complexo *T. mentagrophytes*, após *T. rubrum*, é o segundo agente

etiológico mais frequente de dermatofitoses em humanos e outros animais. Até recentemente, a identificação desse grupo de patógenos se baseava principalmente na macro e micromorfologia de isolados e suas características fisiológicas (perfuração do cabelo, teste de urease). Estes métodos são muito demorados (levando até quatro semanas), e devido à aparência pleomórfica de colônias e alterações na morfologia resultantes da subcultura, os resultados são muitas vezes equivocados (Ziółkowska et al., 2015).

Trichophyton mentagrophytes tinha quatro variedades: *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (antropofílico), *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (zoofílico), *T. mentagrophytes* var. *quinckeanum* (zoofílico) e *T. mentagrophytes* var. *erinacei* (zoofílico). Com base no conhecimento atual a partir de dados da análise de biologia molecular, a qual tem proposto modificações na classificação, assim foram propostas as espécies que fazem parte do complexo *T. mentagrophytes*: *T. mentagrophytes*, *T. quinckeanum*, *T. interdigitale* e *T. erinacei* (Tartabini et al., 2013).

O complexo *Trichophyton mentagrophytes lato sensu* é constituído pelas quatro espécies mencionadas anteriormente, e também inclui algumas culturas identificadas como *Trichophyton* sp., anamorfo de *Arthroderma benhamiae*, morfológicamente indistinguíveis dos outros membros do complexo *T. mentagrophytes* (Tartabini et al., 2013).

Os dermatófitos do complexo *T. mentagrophytes* são particularmente difíceis de identificar com base nas suas características morfológicas e as relações inter-espécies dentro deste grupo não são claras. Este complexo consiste em três fases sexuais: *Arthroderma vanbreuseghemii*, *A. simii* e *A. benhamiae*. Além disso, *T. interdigitale*, uma espécie conhecida pelos seus conídios globosos, foi incluída junto a estas espécies, outros estados anamórficos podem ser encontrados neste complexo: *T. schoenleinii* e *T. quinckeanum*. Um estudo de Beguin et al. (2012) resumiu as alterações taxonômicas dentro do complexo *T. mentagrophytes* e reanalisou a delimitação de espécies neste complexo utilizando análise filogenética multilocus. A análise de sequências de regiões de rDNA e, em particular, análise da região ITS (*Internal Transcribed Spacers*), que foi mais adequada ao gene que codifica o rRNA da subunidade menor (RNAr 18S), já foram utilizadas com sucesso para avaliar as relações filogenéticas dentro do complexo *T. mentagrophytes* (Fréalles et al., 2007).

Trichophyton rubrum é um dermatófito humano comum sendo o agente causador de 80-93% das infecções fúngicas da pele e unhas (Schmidt, 2017). Infecta de forma recorrente os seres humanos e geralmente persiste por muito tempo, causando preocupações de saúde pública (Kwon et al., 2016). As espécies mais prevalentes do complexo *T. rubrum* foram descritas por Castellani em 1910, quando todos os outros principais dermatófitos já eram conhecidos há várias décadas. Sugere-se que a espécie tenha evoluído no final do século XIX como causa de *tinea corporis* crônica (Graser et al., 2000).

Estudos realizados na década de 2010 demonstraram que *Trichophyton rubrum* é composto pelas fases anamórficas, *T. rubrum* e *T. violaceum* e que os genótipos de *T. rubrum* mostram uma distribuição mundial, excluindo o continente africano. Algumas mudanças também têm sido propostas para espécies do complexo *T. rubrum/T. violaceum* (*T. soudanense*, *T. gourvilii*, *T. megninii* e *T. raubitschekii*) que podem ser agrupados através de análise molecular na espécie única *T. rubrum* (de Hoog et al., 2017).

Trichophyton tonsurans é um dermatófito cosmopolita, embora a prevalência varia consideravelmente, de acordo com a região geográfica. Esta espécie é altamente prevalente na África e na América do Sul e é originário na América do Norte, sendo relatado frequentemente no Norte e Nordeste do Brasil. É responsável pela maioria de infecções fúngicas pediátricas e é frequentemente isolada de portadores assintomáticos (Sidrim et al., 2013). Várias espécies bem estabelecidas e clinicamente diferentes, como *T. equinum/T. tonsurans* pareciam ser indistinguíveis em análises multilocus. Ou seja, através de análises moleculares *T. equinum* ainda não pode ser distinguido de *T. tonsurans*, mesmo essas espécies sendo zoofílica e antropofílica, respectivamente (de Hoog et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE CULTURAS

Foram utilizadas 78 culturas de *Trichophyton*, sendo 26 de *T. tonsurans*, 26 de *T. rubrum* e 26 de *T. mentagrophytes*, previamente identificadas através de análises morfológicas e preservadas sob óleo mineral (Sherf, 1943) e/ou água destilada

esterilizada (Castellani, 1939), provenientes da Coleção de Culturas - Micoteca URM, do Departamento de Micologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

3.2 REATIVAÇÃO E AUTENTICAÇÃO TAXONÔMICA

As culturas preservadas foram reativadas com a transferência de um fragmento para caldo glicosado e mantidas a temperatura ambiente ($TA = 28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Posteriormente, após oito dias de crescimento, os fungos foram transferidos para o meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) contido em tubos de ensaio, mantidos a TA para estudos quanto à pureza e autenticação taxonômica.

3.2.1 Análise molecular e filogenética

Para análise molecular, as culturas obtidas foram inoculadas em Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e incubadas à 25°C durante 14 dias. O micélio foi removido com um escalpelo e colocado em microtubos de 2 mL contendo 4 microesferas, e levadas ao equipamento FASTPREP para maceração. O DNA genômico foi extraído utilizando o UltraClean Microbial DNA isolation kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

Inicialmente, a região gênica BT2 (β -tubulina) utilizando os primers T1 e Bt2b, foi amplificada para todos os isolados utilizando as condições de PCR como descrito por Ahmadi et al. (2016). Após a análise preliminar das sequências de β -tubulina, culturas representativas de cada espécie foram escolhidas para a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacers) utilizando os primers ITS1 e ITS4 (Ahmadi et al., 2016). A PCR foi executada utilizando a enzima Go Taq Master Mix (6,25 μL), os primers (0,5 μL), água livre de nuclease (4,25 μL) e as amostras de DNA (1 μL) totalizando um volume de 12,5 μL . Para o ciclos de amplificação as condições foram as seguintes: 6 min de pré-incubação inicial a 94°C , seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, consistindo na desnaturação; logo após, o anelamento a 58°C por 30s e extensão a 72°C por 1 min, com uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram purificados sendo utilizada a enzima Exosap illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences) e posteriormente sequenciados na plataforma de

sequenciamento do LABCEN/CCB, na Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil). As sequências de nucleotídeos foram editadas com o software BioEdit (Hall, 2014) e as sequências consenso depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para a análise filogenética, as sequências obtidas foram adicionadas ao conjunto de sequências de referência disponibilizados por de Hoog et al. (2017) e alinhadas no programa MUSCLE® (Edgar, 2004) disponível no software MEGA v. 6 (Tamura et al., 2013).

A análise de Inferência Bayesiana (BI) foi efetuada aplicando o método da cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) utilizando o programa Mr. Bayes v.3.1.1 (Ronquist e Huelsenbeck, 2003). Os modelos de substituição de nucleotídeos foram selecionados através do Mr. MODELTEST 2.3 (Posada e Buckley, 2004), sendo estimados separadamente para cada região gênica e selecionados de acordo com Akaike Information Criterion (AIC). O modelo GTR+I foi selecionado para a região ITS e o modelo K80+G para a região gênica BT2.

A análise iniciou aleatoriamente até 10 000 000 de gerações, sendo amostrada uma árvore a cada 1 000 gerações, resultando em 10 000 árvores. As primeiras 2500 árvores com menores valores de probabilidade foram descartadas da análise. Os valores de probabilidade posterior (Rannala e Yang, 1996) foram determinados da árvore consenso através das 7500 árvores remanescentes. A árvore foi visualizada no software FigTree (Rambaut, 2009) e exportada para edição gráfica.

3.2.2 Análise Fenotípica

Após a reativação das culturas pela equipe da Micoteca URM, as mesmas foram submetidas à autenticação taxonômica através da análise das características fenotípicas da colônia, a partir de inóculo central em placa de Petri contendo meio SDA, incubada à TA durante 14 dias. Posteriormente, foi observada a morfologia macroscópica, como aspecto da colônia (topografia, coloração, pigmentação, dentre outras particularidades do verso e reverso). Para a análise microscópica foi realizada a técnica da cultura em lâmina (Dalmau, 1929) em placa de Petri contendo o meio SDA, por 14 dias e incubada à TA. A seguir, a lamínula foi retirada e colocada numa lâmina

com o corante lactofenol azul de algodão (azul de Amann) para visualização das características microscópicas do tamanho, forma e arranjo dos esporos, assim como estruturas de ornamentação. A autenticação das culturas foi procedida segundo Sidrim e Rocha (2004).

3.2.3 Análise fisiológica

Para determinação das características fisiológicas foram observadas a atividade ureásica, e como exigência nutricional crescimento em meio contendo caseína. Na prova da urease foram inoculados fragmentos da colônia no meio Ágar ureia de Christensen (Christensen, 1946) e incubados à temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por 96 horas. O resultado foi considerado positivo quando houve a mudança do meio de amarelo para róseo e foi considerado negativo quando o meio se manteve amarelo. A detecção de urease foi utilizada para diferenciar *T. rubrum* de *T. interdigitale* (Lacaz et al., 2002).

Para a prova da caseína, teste de requerimentos vitamínicos, primeiramente foi feita uma suspensão das cepas de dermatófitos em 10 ml de solução salina com Tween 20%, usando como padrão a turvação 2 da escala de Mac Farland. Esta suspensão foi semeada em todas as placas contendo meio de cultura enriquecido, o ágar base caseína, e após repicagem, incubada a temperatura ambiente, por 15 dias. Logo após o período de incubação, as leituras foram feitas comparativamente, foi realizada uma quantificação subjetiva e comparativa do crescimento fúngico presente em cada placa. O teste da caseína, que é uma prova de requerimentos vitamínicos, permite identificar *T. tonsurans*, separando de *T. rubrum* e *T. interdigitale* (Lacaz et al., 2002).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE DAS CULTURAS

Do total de 78 culturas das três espécies estudadas do gênero *Trichophyton*, mantidas na Micoteca URM, 44 (56,4%) estão viáveis e 34 (43,6%) não cresceram nos meios de cultura e condições de incubação utilizadas (inviáveis). De 26 cepas identificadas como *T. mentagrophytes*, 10 (38,5%) foram viáveis e 16 (61,5%) inviáveis, das 26 culturas de *T. rubrum* 18 (69,2%) foram viáveis e oito (30,8%) inviáveis, e das 26 culturas de *T. tonsurans*, 16 (61,5%) foram viáveis e 10 (38,5%) inviáveis. A taxa de viabilidade dos isolados das três espécies mantidas na Micoteca URM foi de 56,4%, considerada uma boa taxa de viabilidade considerando que muitas culturas estão estocadas durante muito tempo, as mais antigas desde 1954 as mais recentes desde 2010 (Tabela 2). Pode-se considerar que os métodos de preservação utilizados que são sob óleo mineral (Sherf, 1943) e água destilada esterilizada (Castellani, 1939) minimizam as mutações ou a variabilidade das características básicas da cultura original, sendo métodos simples, não requerendo equipamento sofisticado e de baixo custo, como Romeiro (1996) relata em seu estudo. O resultado do estudo foi semelhante aos trabalhos de Teramoto; Martins; Cunha (2011) e Diogo; Sarpieri; Pires (2005) que relataram que os métodos de preservação de (Sherf, 1943) e (Castellani, 1939) apresentaram bons resultados para longos períodos de preservação.

Tabela 2 - Relação do substrato/hospedeiro com o ano de depósito das culturas de *Trichophyton*

Isolado URM	Identificação anterior	Substrato/Hospedeiro	Ano de depósito
2875	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Solo	1985
3239	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Couro cabeludo	1992
4156	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas	1999
4422	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Couro cabeludo	2002
5431	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas	2007
5432	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas	2007
5538	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Não informado	2007

5541	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Não informado	Não informado
6211	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas ungueais	2010
6272	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Escamas epidérmicas	2010
4194	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	1999
4258	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2000
4726	<i>Trichophyton rubrum</i>	Interdigitais	2003
4730	<i>Trichophyton rubrum</i>	Mão	2003
5143	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas (coxa)	2005
5144	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas (glúteo)	2005
5145	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas (virilha)	2005
5307	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2006
5413	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2007
5543	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2007
5905	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2009
5906	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2009
5907	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2009
5908	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2009
6205	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2010
6206	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas	2010
6213	<i>Trichophyton rubrum</i>	Escamas epidérmicas (coxa)	2010
6753	<i>Trichophyton rubrum</i>	Rim transplantado	2012
450	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Escamas epidérmicas	1955
700	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	1957
771	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	1957
4288	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Escamas epidérmicas	2000
4741	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Nádegas	2004
4743	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2004
4944	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2004
4945	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2004
4947	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2004
4948	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Unha	2004
4963	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2005
4965	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2005
4967	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Couro cabeludo	2005
5544	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Escamas epidérmicas	2007
5558	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Fragmento de unha	2007
5904	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Escamas epidérmicas	2008

Fonte: O autor (2017).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FILOGENÉTICA

As culturas foram avaliadas quanto a informação de dados BLASTn e análises filogenéticas para autenticação ou atualização da identificação taxonômica. Das culturas identificadas morfolologicamente como *T. mentagrophytes*, sete foram filogeneticamente autenticadas para *T. interdigitale*, duas para *T. rubrum* e uma transferida para o complexo *T. quinckeanum/T. schoenleinii* (Tabela 3). Das 18 culturas identificadas morfolologicamente como *T. rubrum* todos foram legitimadas com base nas análises das sequências do gene β -tubulina (Tabela 4). Das 16 culturas identificadas como *T. tonsurans*, nove foram legitimadas, quatro transferidas para *T. interdigitale* e três para *T. rubrum* (Tabela 5).

De acordo com a árvore filogenética construída a partir do sequenciamento das regiões gênicas β -tubulina e ITS rDNA, foi possível separar as espécies dentro dos complexos existentes. *Trichophyton tonsurans* e *T. equinum* pertencem ao mesmo clado (Figuras 10 e 11) e são filogeneticamente muito próximas, concordando com o estudo de Ahmadi et al. (2016) que relataram que essas duas espécies mostraram semelhança filogenética de 100% quando utilizada uma outra região gênica. Estando de acordo também com o estudo de Pchelin et al. (2016) que obteve um único clado para essas duas espécies. Dessa forma, possivelmente essas espécies são sinônimas. Porém, para a confirmação dessa hipótese, um estudo taxonômico com um maior número de culturas dessas duas espécies deve ser realizado.

Trichophyton rubrum e *T. violaceum* pertencem ao mesmo clado (Figuras 10 e 11), evidenciando uma semelhança filogenética muito grande, e corroborando com o estudo de Garces et al. (2016) que descreveram que as duas espécies são intimamente relacionadas filogeneticamente, compondo um clado único. *Trichophyton quinckeanum* e *T. schoenleinii* pertencem ao mesmo clado, filogeneticamente muito próximas (Figuras 10 e 11). Resultado semelhante foi constatado por Beguin et al. (2012) que mencionaram que as duas espécies formam um grupo monofilético altamente suportado, não sendo encontrada variabilidade intraespecífica. As culturas de *Trichophyton interdigitale* formaram um clado separado próximo do complexo *T. mentagrophytes* (Figuras 10 e 11), concordando com o trabalho de Beguin et al. (2012) que relatam que os isolados dessa espécie formaram um grupo separado, filogeneticamente, diferente dos outros complexos ou espécies.

Quanto à necessidade da correta identificação dos dermatófitos e de acordo com os problemas que envolvem a aplicação de diferenciação baseada na morfologia das espécies de fungos, é recomendado o sequenciamento das regiões gênicas utilizadas nesse estudo, como ITS e β -tubulina (Ahmadi et al., 2015).

Pode-se analisar e concordar com o estudo de Tartor; El Damaty; Mahmmoud; (2016) que as ferramentas de identificação clássicas aliadas à ferramenta de identificação molecular são fundamentais na identificação de espécies de *Trichophyton* e que através de análises filogenéticas a problemática envolvendo os complexos desse grupo pode ser esclarecida.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

As culturas identificadas como *T. interdigitale* apresentaram a morfologia macroscópica bem diversificada, com aspectos de colônias variados que vão do algodinoso (Figura 1A), pulverulento (Figura 1C) ou cotonoso (Figura 1E). Os diâmetros das colônias variaram entre 2,6 cm e 7 cm (Tabela 2). O reverso possuindo pigmentação em algumas cepas (Figuras 1B, D, F) e em outras com a pigmentação ausente (Figura 1H) apresentando morfologias típicas e atípicas (Tabela 3; Figura 1). Esses resultados quanto a diversidade morfológica estão de acordo com Ziółkowska et al. (2015) que reforçaram no seu estudo que as colônias apresentam aparência pleomórfica. Ainda, resultados semelhantes foram obtidos por Ahmadi et al. (2016), Beguin et al. (2012) e Oyeka (2000) que relatam a diversidade morfológica de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* e que muitas características não são consistentes.

Na morfologia microscópica a maioria das culturas de *T. interdigitale* apresentaram hifas hialinas, numerosos microconídios globosos pequenos (Figura 2A), mas houve também a presença de microconídios esféricos, subesféricos (Figuras 2B e C) e piriformes (Figura D) em algumas culturas, macroconídios foram observados em poucas culturas (Figura 2B). A presença de numerosos microconídios globosos pequenos constada neste trabalho também foram descritos no estudo de Mesquita et al. (2016), bem como a presença de microconídios esféricos no estudo de Kimura et al. (2015). A observação de macroconídios não é uma característica obrigatória descrita para o gênero *Trichophyton* (Lacaz et al., 2002).

Na morfologia microscópica da cultura identificada como *T. quinckeanum* foi observada a presença de microconídios globosos agrupados (Figura 3A) e hifas predominantemente espessas (Figura 3B).

As culturas de *T. rubrum* apresentaram uma variedade na morfologia, com culturas de aspectos aveludadas (Figura 4A), cotonoso e algodinoso (Figura 4C), com os diâmetros das colônias variando de 2,3cm a 8cm (Tabela 4). A maioria é plana (Figura 4A) porém, poucas culturas apresentaram a topografia cerebriforme (Figura 4C). A maioria dos isolados apresentou a pigmentação avermelhada a rosa-púrpura característica no reverso (Figura 4B), alguns isolados não apresentaram pigmentação (Figura 4D) e outros apresentaram uma pigmentação marrom (Figura 4F e Tabela 5). Os resultados do presente estudo corroboram com os trabalhos de Ahmadi et al. (2016) que relatam a alta heterogeneidade fenotípica e com o estudo de Ates et al. (2008) que destacaram que a pigmentação característica do reverso pode não ser observada.

Na morfologia microscópica, as culturas de *T. rubrum* apresentaram hifas hialinas, microconídios pequenos, piriformes e clavados, dispostos ao longo das hifas (Figura 5A e B). Nosso estudo está de acordo com o trabalho de Yo et al. (2016) que observaram a presença de numerosos microconídios piriformes e clavados em torno das hifas.

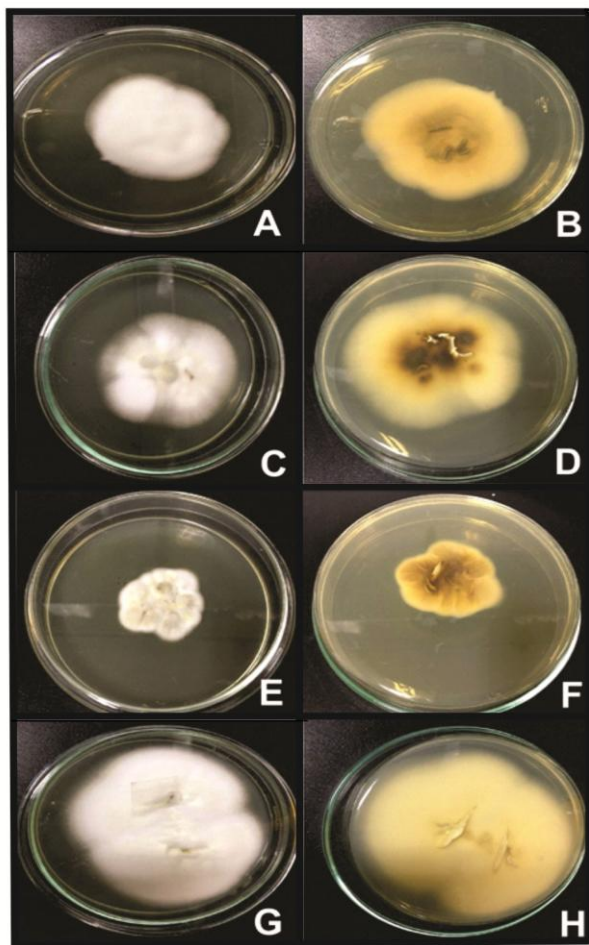
As culturas de *T. tonsurans* também apresentaram uma morfologia variada, com a superfície das colônias elevadas ou umbilicadas e pregueadas, mas também algumas culturas se apresentaram de forma plana, podendo ser aveludada a pulverulenta (Figuras 6A, C, E) ou cotonosa (Figura 6G) com tonalidades branca (Figuras 6A, C, E) e branco-amarelada (Figura 6G), com o diâmetro das colônias variando entre 3 cm e 7 cm (Tabela 5). A maioria do reverso das colônias apresentou a pigmentação característica marrom (Figuras 6F, J) ou marrom-amarelado (Figuras 6B, D), contudo poucas culturas não apresentaram pigmentação (Figura 6H), apresentando morfologias típicas e atípicas (Figura 6). Nossos resultados estão em partes de acordo com o estudo de Yo et al. (2016) que relatam o aspecto variável das colônias, mas não retrata o aspecto plano das mesmas e nem a ausência de pigmentação no reverso. De acordo com Jacob et al. (2012) e Ates et al. (2008) são observadas alterações em uma mesma espécie na sua morfologia (padrão de colônia, pigmentação e taxa de crescimento), corroborando com os nossos estudos.

Na morfologia microscópica, as culturas de *T. tonsurans* desse estudo apresentaram hifas hialinas, numerosos microconídios globosos e esféricos (Figura 7A), de tamanhos e formas variadas (globosos, esféricos e piriformes) (Figura 7B), poucas culturas apresentaram microconídios exclusivamente piriformes (Figura 7D) e macroconídios foram observados em poucas culturas (Figura 7C). O estudo está de acordo com o trabalho de Shimoyama et al. (2016) que descrevem a presença de microconídios piriformes e globosos em culturas de *T. tonsurans*.

Tabela 3 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas anteriormente identificadas como *Trichophyton mentagrophytes* mantidas na Micoteca URM

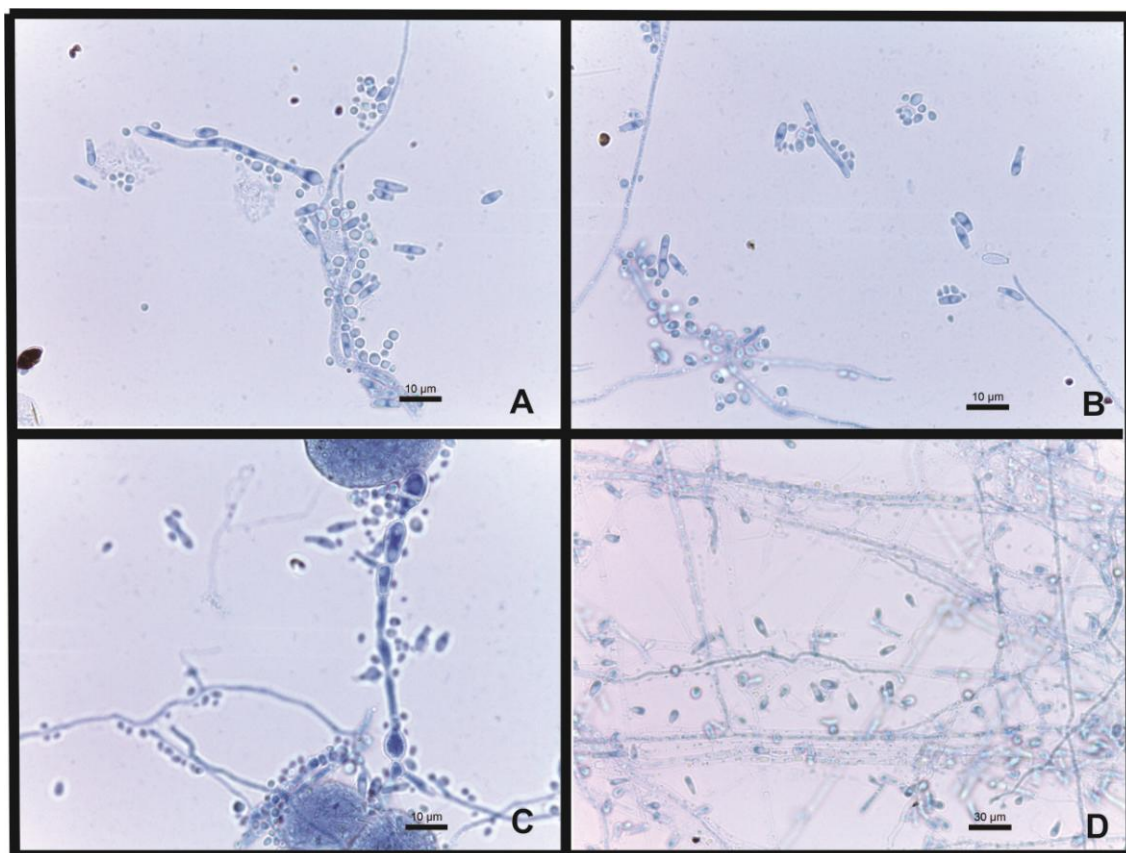
Isolado URM	Identificação Molecular	Características Macroscópicas Verso / Reverso / Aspecto / Diâmetro	Características microscópicas Forma dos microconídios	Testes fisiológicos Urease / Caseína	Identificação anterior
2875	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca /Marrom / Pulverulenta /4,5cm	Microconídios piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
3239	<i>Trichophyton rubrum</i>	Acinzentada /Amarronzado / Cotonosa /3,4cm	Microconídios piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
4156	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Creme / Algodonosa /4cm	Microconídios globosos e subesféricos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
4422	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Amarelo / Algodonosa /5,1cm	Microconídios globosos e subesféricos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
5431	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Amarelo / Algodonosa /4cm	Microconídios globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
5432	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Amarelo / Algodonosa /4,5cm	Microconídios globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
5538	<i>Trichophyton quinckeanum</i>	Branca /Creme / Cotonosa /5,5cm	Microconídios subesféricos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
5541	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Amarelo / Algodonosa /5,5cm	Microconídios globosos e piriformes	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
6211	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Creme amarronzado / Algodonosa /4,3cm	Microconídios globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
6272	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca /Amarelo / Algodonosa /7cm	Microconídios globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>

Figura 1- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de formas típicas e atípicas de culturas identificadas como *Trichophyton interdigitale* em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) *T. interdigitale* URM 6211, colônia branca algodonosa com o reverso creme amarronzado (C) e (D) *T. rubrum* URM 2875, colônia branca pulverulenta com o reverso marrom no centro (E) e (F) *T. rubrum* URM 3239, colônia acinzentada cotonosa, um pouco cerebriforme com o reverso amarronzado (G) e (H) *T. quinckeanum* URM 5538, colônia branca cotonosa com o reverso creme.



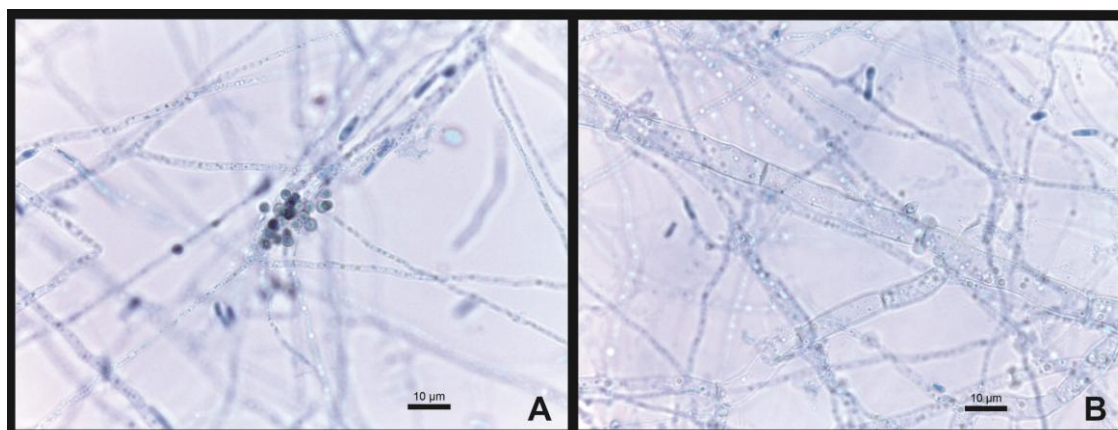
Fonte: O autor (2017).

Figura 2- Micromorfologia de culturas típicas e atípicas de culturas identificadas como *Trichophyton interdigitale*. Presença de microconídios globosos (A); Presença de microconídios globosos e piriformes (B) e (C); Presença de macroconídio (B); Presença de microconídios piriformes (D).



Fonte: O autor (2018).

Figura 3- Micromorfologia da cultura identificada como *Trichophyton quinckeanum*. Presença de microconídios globosos agrupados (A); Presença de hifas espessas (B).

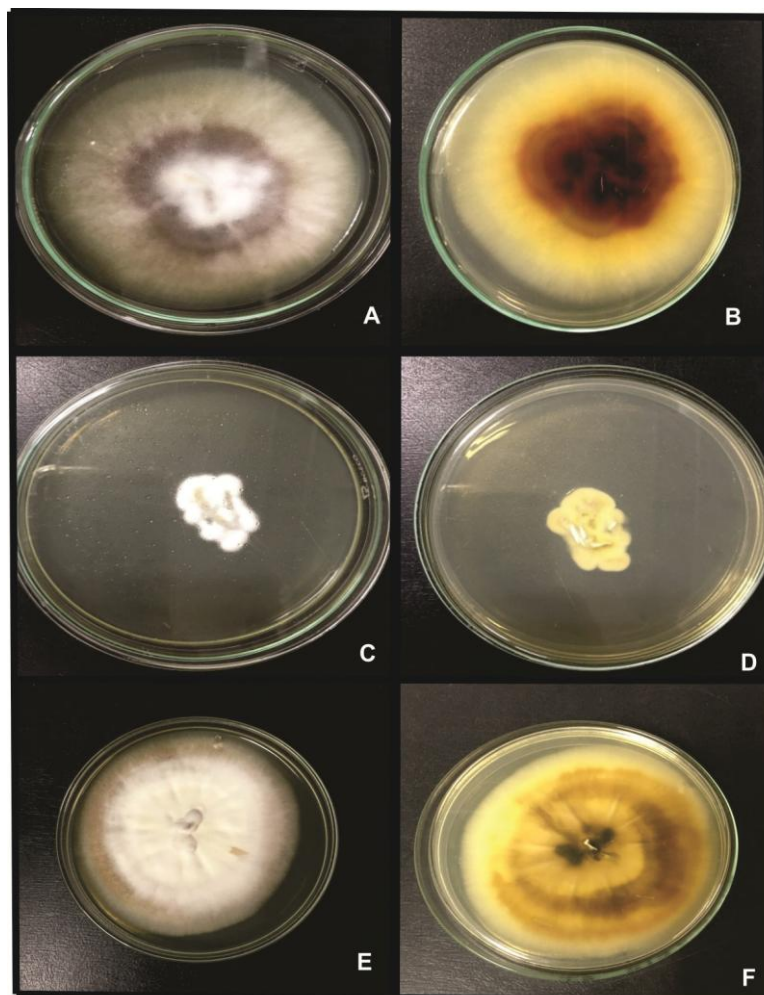


Fonte: O autor (2018).

Tabela 4 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas identificadas como *Trichophyton rubrum* mantidas na Micoteca

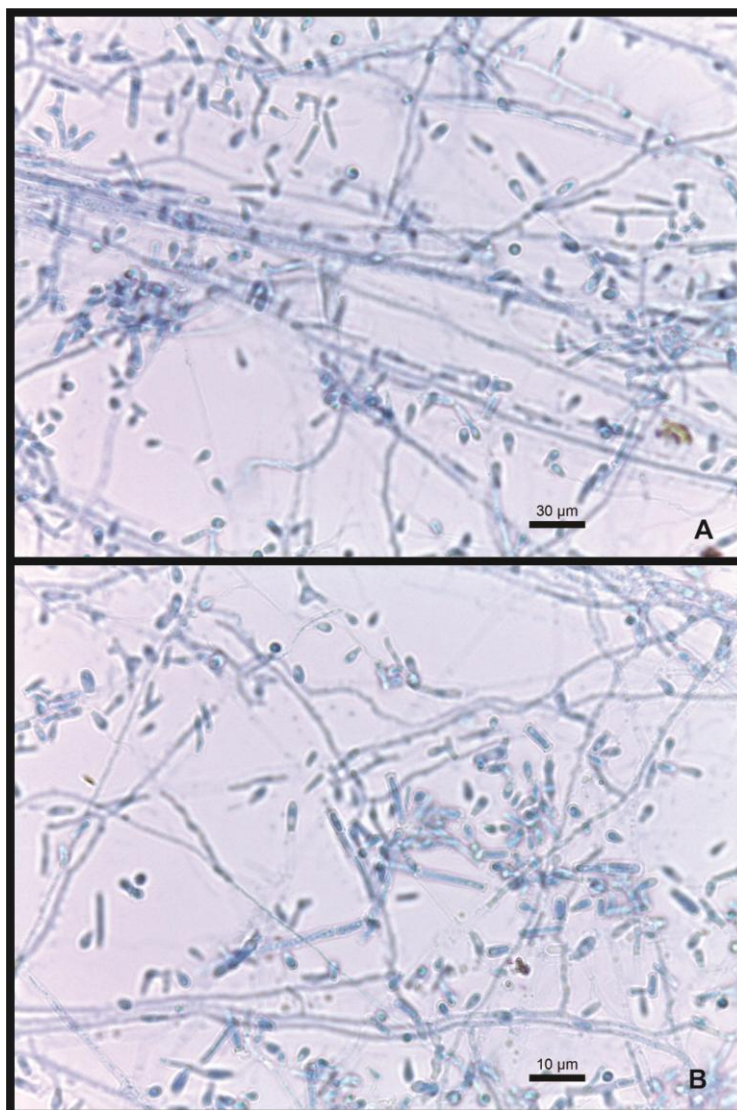
Isolado URM	Identificação molecular	Características macroscópicas	Características microscópicas	Testes fisiológicos Urease / Caseína	Identificação anterior
		Verso / Reverso / Aspecto / Diâmetro	Forma dos microconídios		
4194	<i>Trichophyton rubrum</i>	Crema/Vermelho/Pulverulenta/5,5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
4258	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom/Pulverulenta /4,4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
4726	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Crema /Cotonosa/3cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
4730	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom/Cotonosa/3,2cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5143	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Cotonosa/5,4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5144	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/4,5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5145	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/4,8cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5307	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5413	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5543	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5905	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Cotonosa/3,5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5906	<i>Trichophyton rubrum</i>	Acinzentada/Vermelha/Pulverulenta/3,2cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5907	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/3cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
5908	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom/Cotonosa/8cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
6205	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom/Pulverulenta/4,3cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
6206	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
6213	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Vermelho/Pulverulenta/5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>
6753	<i>Trichophyton rubrum</i>	Acinzentado/Vermelho/Pulverulenta/4,7cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton rubrum</i>

Figura 4- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de culturas identificadas como *Trichophyton rubrum* em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) URM 6753 colônia acinzentada pulverulenta com o reverso vermelho; (C) e (D) URM 4726 colônia branca cotonosa cerebriforme com o reverso creme; (E) e (F) URM 4258 colônia branca pulverulenta com o reverso marrom.



Fonte: O autor (2017).

Figura 5- Micromorfologia de culturas de *Trichophyton rubrum* com os microconídios piriformes clavados ao redor das hifas (A) e microconídios piriformes sem estar clavados em torno das hifas (B).

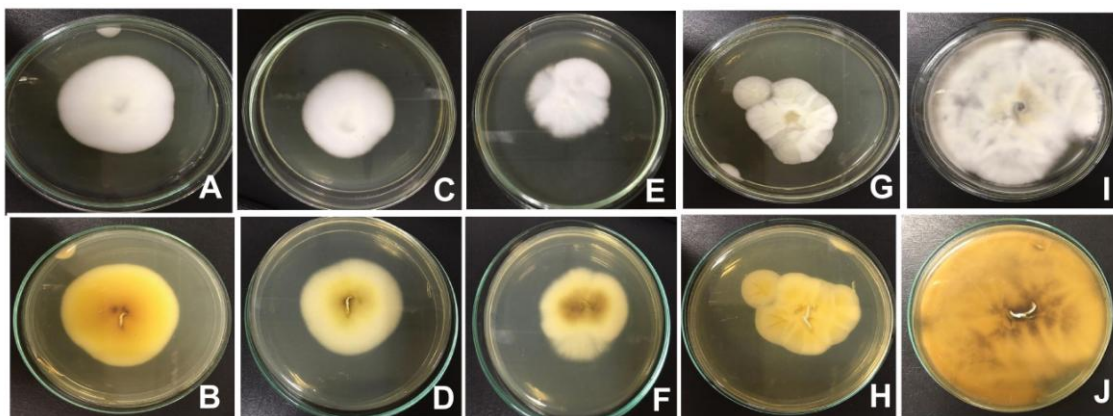


Fonte: O autor (2018).

Tabela 5 - Caracterização morfofisiológica e identificação molecular de culturas identificadas anteriormente como *Trichophyton tonsurans* mantidas na Micoteca URM.

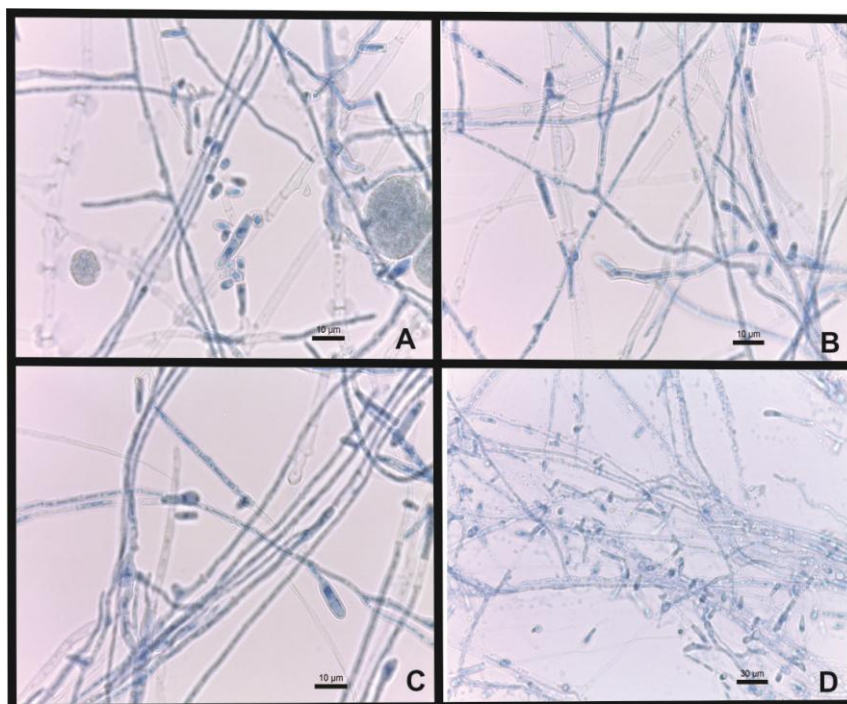
Isolado URM	Identificação molecular	Características macroscópicas Verso/Reverso/Aspecto/Diâmetro	Características microscópicas Forma dos microconídios	Testes fisiológicos Urease/Caseína	Identificação anterior
450	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca/Marrom amarelado/Algodonosa/4,5cm	Globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
700	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca/ Amarelado/Algodonosa/4,7cm	Globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
771	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca/Marrom (centro)/Algodonosa/5cm	Globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4288	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/Marrom/Cotonosa/3,5cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4741	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/Creme/Cotonosa/4cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4743	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/Creme/Cotonosa/3,2cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4944	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/Marrom/Cotonosa/7cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4945	<i>Trichophyton interdigitale</i>	Branca/Creme/Pulverulenta/3,7cm	Globosos	Positivo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4947	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/Creme/Cotonosa/3,5cm	Esféricos e piriformes	Negativo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4948	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/ Marrom amarelado/Cotonosa/3cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4963	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/ Creme/Cotonosa/3,7cm	Esféricos e piriformes	Negativo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4965	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/ Marrom/Cotonosa/3,9cm	Esféricos e piriformes	Positivo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
4967	<i>Trichophyton tonsurans</i>	Branca/ Marrom/Cotonosa/3,7cm	Esféricos e piriformes	Negativo / 1+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
5544	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom /Pulverulenta/4cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
5558	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca/Marrom /Pulverulenta/5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>
5904	<i>Trichophyton rubrum</i>	Branca /Marrom/Cotonosa/4,5cm	Piriformes	Negativo / 4+	<i>Trichophyton tonsurans</i>

Figura 6- Morfologia macroscópica (verso e reverso) de culturas típicas e atípicas identificadas como *Trichophyton tonsurans* na Micoteca URM em meio Sabouraud Dextrose Ágar com 14 dias de crescimento. (A) e (B) URM 450 (*T. interdigitale*) colônia branca algodonosa com o reverso marrom amarelado; (C) e (D) URM 700 (*T. interdigitale*) colônia branca algodonosa com o reverso creme amarelado; (E) e (F) URM 5544 colônia branca pulverulenta com o reverso marrom no centro; (G) e (H) URM 4743 colônia branca cotonosa com o reverso creme; (I) e (J) URM 4944 colônia branca cotonosa com o reverso marrom.



Fonte: O autor (2017).

Figura 7- Micromorfologia de culturas típicas e atípicas identificadas como *Trichophyton tonsurans* com a presença de microconídios de formas variadas (piriformes, esféricos) (B); e macroconídio (C); presença de numerosos microconídios globosos e esféricos (A); e microconídios piriformes clavados em torno da hifa (D). (A) URM 771 (*T. interdigitale*) (B) URM 4965 (*T. tonsurans*) (C) URM 4948 (*T. tonsurans*) (D) URM 4963 (*T. tonsurans*).



Fonte: O autor (2018).

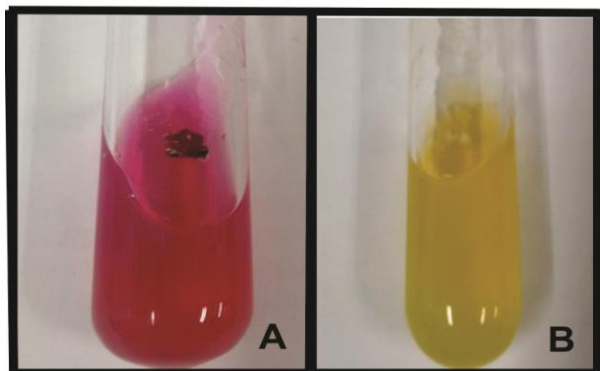
4.4 CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA

Na prova da urease, das 10 culturas anteriormente identificadas como *T. mentagrophytes*, sete foram *T. interdigitale*, duas *T. rubrum* e uma *T. quinckeanum* (1), oito apresentaram resultado positivo, assimilando a ureia e ocorrendo a mudança de coloração do meio do amarelo para o rosa (Figura 8A), duas culturas foram negativas (Tabela 3 e Figura 8B). Todas as 18 culturas de *T. rubrum* não foram capazes de assimilar a ureia, tendo assim, resultado urease negativa (Tabela 4 e Figura 8B). Das 16 culturas anteriormente identificadas como *T. tonsurans*, nove foram *T. tonsurans*, quatro *T. interdigitale* e três *T. rubrum*, 10 apresentaram resultado de urease positiva (Figura 8A) e seis foram urease negativa (Figura 8B e Tabela 5).

Os resultados da detecção ureásica do nosso estudo permitiram identificar *T. rubrum*, estando de acordo com Araujo et al. (2003). De acordo com Adamski et al. (2014), culturas de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale* são urease positiva, estando nossos resultados em concordância, pois as duas culturas que apresentaram resultados negativos foram identificadas através de análise molecular como *T. rubrum*. Os resultados obtidos confirmam a relevância do teste da urease para diferenciar as espécies *T. interdigitale* de *T. rubrum*, mas não consegue separar *T. tonsurans*. De acordo com Philpot (1967) é um teste útil na diferenciação de *T. mentagrophytes* das demais espécies, sendo um método rápido e viável para separar *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Mas no nosso estudo observamos que é um teste viável para separar também *T. interdigitale* de *T. rubrum*, sendo um resultado bastante interessante. Diferenças entre culturas de *T. tonsurans* constatadas nos nossos resultados quanto ao teste da urease, estão de acordo com o estudo de Sidrim et al. (2013) que relataram também variabilidade nos resultados de testes realizados com *T. tonsurans*.

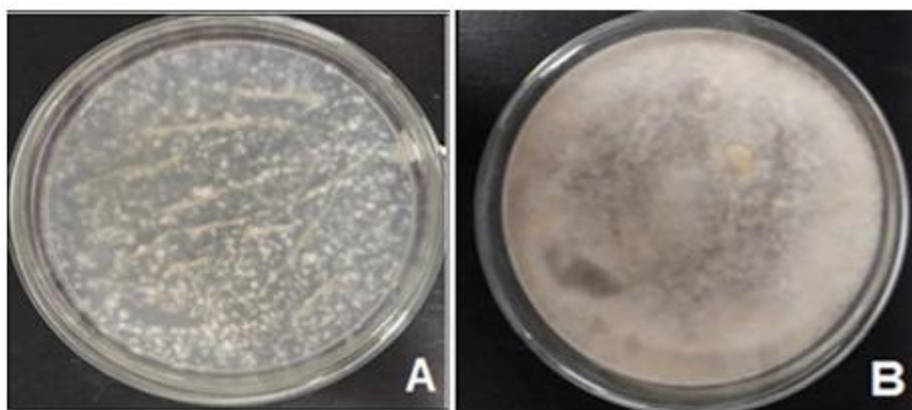
No teste da caseína, todas as culturas identificadas como *T. interdigitale* e *T. rubrum* tiveram crescimento 4+ (Figura 9B), as culturas de *T. tonsurans* tiveram padrão de crescimento diferente, sendo oito culturas com padrão de crescimento 1+ (Figura 9A) e outras oito com padrão de crescimento 4+ (Figura 9B). Os resultados obtidos mostram que esta característica fisiológica não permite diferenciar nenhuma das espécies deste estudo, contrapondo-se as recomendações de Lacaz et al. (2002) que considera que o teste da caseína identifica *T. tonsurans*, separando-a de *T. rubrum* e *T. mentagrophytes*.

Figura 8- (A) Resultado positivo do teste de urease para a cultura de *Trichophyton interdigitale*; (B) Resultado negativo do teste de urease para a cultura de *Trichophyton rubrum*.



Fonte: O autor (2017).

Figura 9- (A) Ágar caseína com padrão de crescimento 1+ de culturas de *Trichophyton*; (B) Ágar caseína com padrão de crescimento 4+ de culturas de *Trichophyton*.



Fonte: O autor (2017).

Os resultados de culturas com microconídios piriformes clavados em torno das hifas e urease negativa são critérios micromorfofisiológicos para identificação de *T. rubrum*. Culturas com microconídios predominantemente globosos e urease positiva não são critérios micromorfofisiológicos para identificação de *T. mentagrophytes* e *T. interdigitale*, pois de acordo com Beguin et al. (2012) são características taxômicas comuns as duas espécies. Culturas com microconídios de formas variadas são características comuns a *T. tonsurans*, contudo não são conclusivas e os testes fisiológicos utilizados para essa espécie não apresentaram padrão conclusivo.

Os critérios micromorfofisiológicos não são conclusivos para identificação de

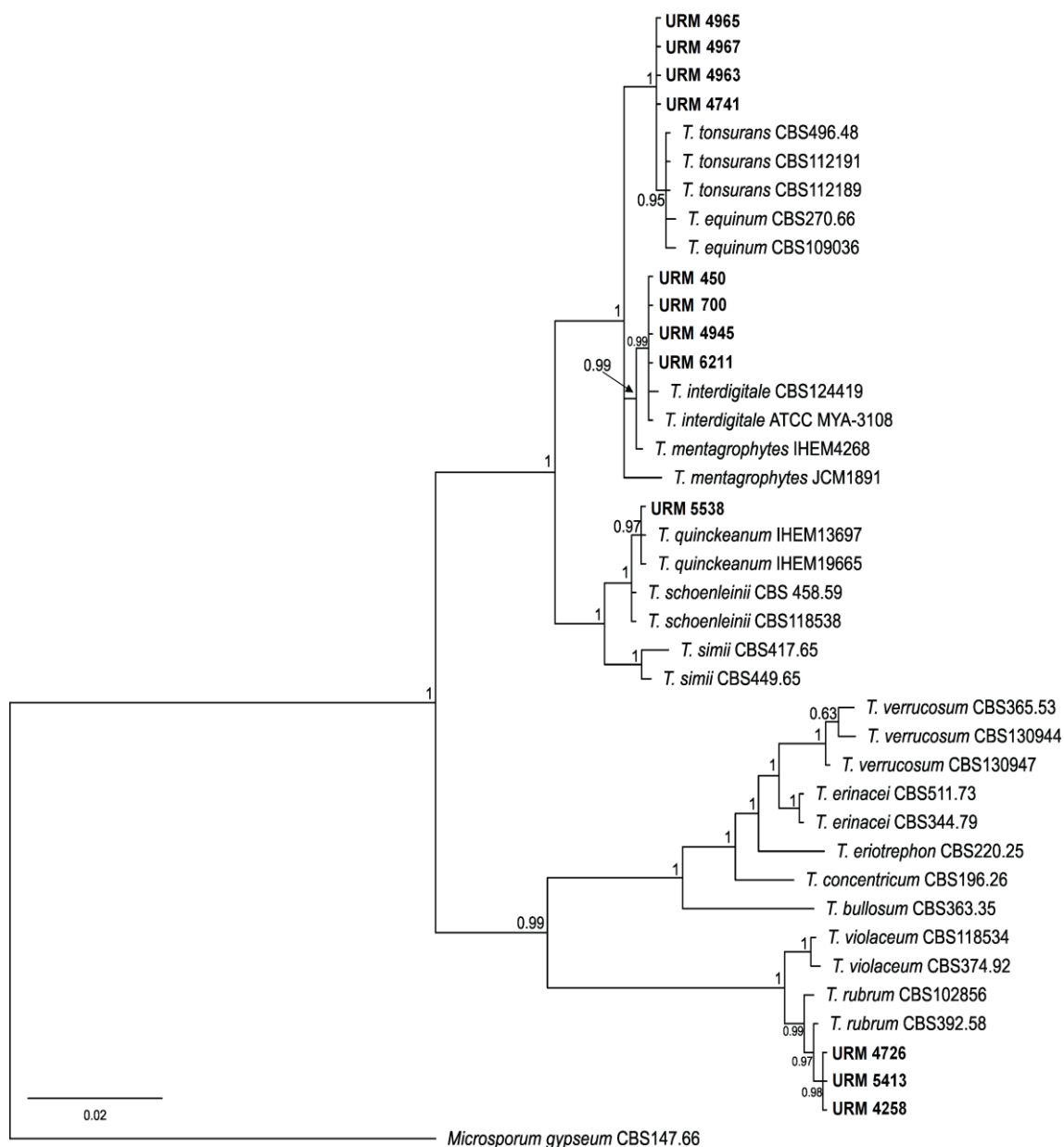
culturas de *T. interdigitale* e *T. tonsurans*, sendo necessário a análise molecular para confirmação da identificação.

Figura 10- Árvore filogenética das espécies de *Trichophyton* obtida por inferência bayesiana da região gênica β -tubulina. Os valores de probabilidade posterior estão mostrados sobre os nós.



Fonte: O autor (2017).

Figura 11- Árvore filogenética das espécies de *Trichophyton* obtida por inferência bayesiana das regiões gênicas β -tubulina e ITS combinadas. Os valores de probabilidade posterior estão mostrados sobre os nós. A árvore foi enraizada com a espécie *Microsporum gypseum* CBS147.



Fonte: O autor (2017).

5 CONCLUSÃO

- Os métodos de preservação sob óleo mineral e água destilada esterilizada são eficazes para manutenção da viabilidade de culturas de dermatófitos pertencentes ao gênero *Trichophyton*.
- Microconídios piriformes clavados em torno das hifas e urease negativa são critérios taxonômicos micromorfofisiológicos conclusivos para identificação de *T. rubrum*.
- Microconídios predominantemente globosos e urease positiva não são critérios taxonômicos micromorfofisiológicos conclusivos para identificação de *T. interdigitale*.
- Microconídios de formas variadas, teste de urease e crescimento em meio com caseína não são critérios taxonômicos micromorfofisiológicos conclusivos para identificação *T. tonsurans*.
- A análise filogenética das sequências de DNA é essencial na identificação acurada de espécies de *Trichophyton*, proporcionando a separação dentro dos complexos existentes, permitindo auxiliar em estudos de diagnose.
- A região gênica β -tubulina isoladamente possibilita uma identificação preliminar das espécies de *Trichophyton*. Para estudos taxonômicos é necessário a adição de mais regiões gênicas para reforçar o suporte dos nós nas árvores filogenéticas.

REFERÊNCIAS

- ABASTABAR, Mahdi; MIRHENDI, Hossein; REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; SHIDFAR, Mohammad; KORDBACHEH, Parivash; MAKIMURA, Koichi. Restriction Analysis of β -Tubulin Gene for Differentiation of the Common Pathogenic Dermatophytes. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Tehran, v.28, n.2, p.91-96, jan. 2014.
- ADAMSKI, Zygmunt; KOWALCZYK, Michal; ADAMSKA, Kinga; KUBISIAK-RZEPCZYK, Honorata; BOWSZYC-DMOCHOWSKA, Monika; BANASZAK, Agnieszka; BARTKIEWICZ, Pawel; ZABA, Ryszard. The First Non-African Case of *Trichophyton rubrum* var. *raubitschekii* or a Urease-Positive *Trichophyton rubrum* in Central Europe? **Mycopathologia**, Poznan, v.178, p. 91-96, aug. 2014.
- AHMADI, Behzad; MIRHENDI, Hossein; SHIDFAR, Mohammad; NOURIPOUR-SISAKHT, Sadegh; JALALIZAND, Nilufar; GERAMISHOAR, Mohsen; SHOKOOHI, Gholam. A comparative study on morphological versus molecular identification of dermatophyte isolates. **Journal of Medical Mycology**, Tehran, v.0, p. 1-18, oct. 2014.
- AHMADI, Behzad; MIRHENDI, Hossein; MAKIMURA, Koichi; de HOOG, G. S., SHIDFAR, Mohammad; NOURIPOUR-SISAKHT, Sadegh; JALALIZAND, Nilufar. Phylogenetic analysis of dermatophyte species using DNA sequence polymorphism in calmodulin gene. **Medical Mycology**, Tehran, v.54, n.5, p. 1-15, jul. 2016.
- ANZAWA, Kazushi; MOCHIZUKI, Takashi; NISHIBU, Akiko; ISHIZAKI, Hiroshi; KAMEI, Katsuhiko; TAKAHASHI, Yoko; FUJIHIRO, Machiko; SHINODA, Hidekazu. Molecular epidemiology of *Trichophyton tonsurans* strains isolated in Japan between 2006 and 2010 and their susceptibility to oral antimycotics. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.64, n.6, p. 458-462, jan. 2011.
- ARAÚJO, A.J.G.; BASTOS, O.M.P.; SOUZA, M.A.J.; OLIVEIRA, J.C. Occurrence of onychomycosis among patients attended in dermatology offices in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.78, p. 299-308, 2003a.
- ARORA, Kumar; AJELLO, Andrea; MUKERJI, Kavaka. **Handbook of Applied Mycology: Humans, Animals and Insects**. Vol. 2. New York: Mercel Dekker Inc, 1991.783 p.
- ATES, Aylin; OZCAN, Kadri; ILKIT, Macit. Diagnostic value of morphological, physiological and biochemical tests in distinguishing *Trichophyton rubrum* from *Trichophyton mentagrophytes* complex. **Medical Mycology**, Adana, v.46, n.8, p. 811-822, dec. 2008.
- BEGUIN, Hugues; PYCK, Nancy; HENDRICKX, Marijke; PLANARD, Chantal; STUBBE, Dirk; DETANDT, Monique. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. **Medical Mycology**, Brussels, v.50, n. 8, p.871-882, nov. 2012.

BRILHANTE, Raimunda; CORDEIRO, Rosemeyre; MEDIANO, D.J.A.; ROCHA, Marcos; MONTEIRO, Antônio; CAVALCANTE, Carolina; MEIRELLES, T.E.F.; SIDRIM, José. Onychomycosis in Ceara (Northeast Brasil): epidemiological and laboratory aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.100, n. 2, p. 131-135, 2005.

CABAÑES, Javier. Identificación de hongos dermatofitos. In: REMÁN, J., MANTÍN-MAZUELOS, E., CALVO, M. C. R. (Eds). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, 2001.

CARFACHIA, Claudia; WEIGL, Stefania; FIGUEREDO, Luciana; OTRANTO, Domenico. Molecular identification and phylogenesis of dermatophytes isolated from rabbit farms and rabbit farm workers. **Veterinary Microbiology**, v.154, n. 3-4, p.395-402, jan.2011.

CARFACHIA, Claudia; LATTA, Roberta; LATROFA, Maria; GRASER, Yvonne; OTRANTO, Domenico. Molecular epidemiology, phylogeny and evolution of dermatophytes. **Infection, Genetics and Evolution**, v.20, p.336-351, dec.2013.

CASTELLANI, A. - Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **J. trop. Med. Hyg**, 42: 225-226, 1939.

CHRISTENSEN, Blake. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. **Journal Bacteriol**. v.52, p.461-466, 1946.

DABROWSKA, Iwona; DWORECKA-KASZAK, Bozena. The application of MALDI-TOF MS for dermatophyte identification. **Annals of Parasitology**, Warsaw, v.60, n.3, p. 147-150, may.2014.

DALMAU, L. M. **Annual. Parasitol. Human. Compendium**, 7: 536, 1929.

De HOOG, Sybren; DUKIK, Karolina; MONOD, Michel; PACKEU, Ann; STUBBE, Dirk; HENDRICKX, Marijke; KUPSCH, Christiane; STIELOW, Benjamin; FREEKE, Joanna. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. **Mycopathologia**, Utrecht, v.182, p.5–31, oct.2017

DHIB, Imen; KHAMMARI, Amir; YAACOUB, Faten; HADJ SLAMA, Ben; SAID, Edward; ZEMNI, Sami; FATHALLAH, Judith. Relationship Between Phenotypic and Genotypic Characteristics of *Trichophyton mentagrophytes* Strains Isolated from Patients with Dermatophytosis. **Mycopathologia**, Sousse, v.182, n.5-6, p.487-493, jan. 2017.

DIOGO, Hilda; SARPIERI, Aldo; PIRES, Mário. Preservação de fungos em água destilada. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, São Paulo, v.80, n.6, p. 591-594, feb.2005.

EDGAR, Robert. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v.32, n.5, p.1792–1797, mar.2004.

ELEWSKI, Bom. Onychomycosis. Treatment, quality of life, and economic issues. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.1, n.1, p.19-26, jan.2000.

FISHER, Frances; COOK, Norma. Micologia: Fundamentos e Diagnóstico. Rio de Janeiro: **Revinter**, Rio de Janeiro, vol. 1, 2001. 337p.

FRÉALLE, Emilie; RODRIGUE, Marion; GANTOIS, Nausicaa; ALIOUAT, Cécile-Marie.; DELAPORTE, Emmanuel; CAMUS, Daniel; DEI-CAS, Eduardo; KAUFFMANN-LACROIX, Catherine; GUILLOT, Jacques; DELHAES, Laurence. Phylogenetic analysis of *Trichophyton mentagrophytes* human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. **Microbiology**, Lille, v.153, p.3466–3477, may.2007.

GARCES, Garcia; HRYCYK, Marluce; GIACOBINO, Juliana; MACHADO, Gil; ARANTES, Thales; THEODORO, R.C.; BOSCO, Sandra; BAGAGLI, Eduardo. Molecular identification and phylogenetical analysis of dermatophyte fungi from Latin America. **Mycoses**, v.59, n.12, p.787-797, jul.2016.

GRASER, F. A.; KUIJPERS, W.; PRESBER, S.; DE HOOG, G. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (9): 3329-3336, 2000.

GRÄSER Yvonne; SCOTT, James; SUMMERBELL, Richard. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. **Mycopathologia**, v.166,n.5-6, p.239-56, mar.2008.

GEORG, Lucille.; CAMP, Laverne. Routine nutritional tests for the identification of dermatophytes. **Archives Dermatology Syphil**, v.67, n.2, p.355-361, aug.1956.

GOßKER, Markus; REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; MIRHENDI, Hossein.; GRÄSER, Yvonne; PACKEU, Ann; MARIJKE, Hendrickx; BEGUIN, Hugues; MARTINY, Deluil; VANDENBERG, O.; DETANDT, Monique. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. **Medical Mycology**, Brussels, v.51, n.6, p.580-585, mar. 2013.

HALL, Thomas. 2014. BioEdit v7.0.9: Biological sequence alignment editor for in 95/98/2K/XP/7. Disponível em: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit.html>. Acesso em: maio de 2016.

HIBBETT, David. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v.111, n.5, p.509-547, 2007.

JACKSON-FISHER, George. DNA-Based detection of human pathogenic fungi: Dermatophytes, opportunists, and causative agents of deep mycoses. In: Gherbawy, Y., Voigt, K. (eds.) **Molecular identification of fungi**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 357-416, 1999.

JACOB, Tiago; PERES, Nalu; PERSINOTI, Gabriela; SILVA, Larissa; MAZUCATO, Mendelson; ROSSI, Antonio; MARTINEZ-ROSSI, Nilce. rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology**, v.50, n.4, p.368-377, may.2012.

KAC, Victor. Molecular approaches to the study of dermatophytes. **Journal Medical Mycology**, Paris, v.38, n. 5, p.329-336, may. 2000.

KAMINSKI, Henry; The routine use of modified Borelli's Lactrimel agar (MBLA). **Mycopathologia**, v.91, n. 1, p.57-59, jul. 1985.

KANO, Takeshi; HASEGAWA, Tsuyoshi. Historic topics on classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex. **Medical Mycology**, v.55, n.2, p.73-77, mar.2014.

KARDJEVA, Velichka; SUMMERBELL, Richard; KANTARDJIEV, Todor; DEVLIOU-PANAGIOTIDOU, Despina; SOTIRIOU, Eleni; GRA`SER, Yvonne. Forty-Eight-Hour diagnosis of onychomycosis with subtyping of *Trichophyton rubrum* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.4, p.1419–1427, jan. 2006.

KAWASAKI, Masako. Verification of a taxonomy of dermatophytes based on mating results and phylogenetic analyses. **Medical Mycology**, Kanazawa, v.52, n.4, p.291-295, 2011.

KIMURA, Utako; YOKOYAMA, Kae; HIRUMA, Masataro; KANO, Rui; TAKAMORI, Kenji; SUGA, Yasushi. Tinea faciei caused by *Trichophyton mentagrophytes* (Molecular type *Arthroderma benhamiae*) Mimics impetigo: a case report and literature review of cases in Japan. **Medical Mycology**, Urayasu, v.56, n.1, p.1-5, dec. 2015.

KOBYLAK, Natalia; BYKOWSKA, Barbara; NOWICK, Roman; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, Anna. Real-time PCR approach in dermatophyte detection and *Trichophyton rubrum* identification. **Biochimica Polonica**, v.62, n.1, p.119-122, dec. 2015

KOC, Nedret; ATALAY, Mustafa; INCI, Melek; SARIGUZEL, Fatma; SAV, Hafize. Identification and molecular epidemiology of dermatophyte isolates by repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the DiversiLab system in Turkey. **Mycoses**, v.60, n.5, p.348-354, may.2017.

KWON, Hyunjung; LEE, Ritchey; PARK, Jessica. Investigating Effects of Nano-to Micro-Ampere Alternating Current Stimulation on *Trichophyton rubrum* Growth. **Annals Dermatology**, v.28, n.5, p.575–578, oct. 2016.

LACAZ, Carlos; PORTO, Edward; MARTINS, José; VACCARI, Heins; MELO, Takahashi. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 9 ed., 2002, 1104p.

LACAZ, Carlos; PORTO, Edward; MARTINS, José; **Micologia Médica**. Sarvier, 8 ed., São Paulo, 1991, 695p.

MAKIMURA, Koichi; MOCHIZUKI, Takuro; HASEGAWA, Masaaki; UCHIDA, Ken-ichi; SAITO, Hajime; YAMAGUCHI, Hiroki. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2629-2633, dec. 1998.

MARAKI, Sofia; MAVROMANOLAKI, Viktoria. Epidemiology of onychomycosis in Crete, Greece: a 12-year study. **Mycoses**, v.59, n.12, p.798-802, jul. 2016.

MESQUITA, João; VASCONCELOS-NÓBREGA, Carmen; OLIVEIRA, Jorge; COELHO, Catarina; VALA, Helena; FRATTI, Marina; ARABATZIS, Michael; VELGRAKI, Aristeia; MICHEL, Monod. Epizootic and epidemic dermatophytose outbreaks caused by *Trichophyton mentagrophytes* from rabbits in Portugal, 2015. **Mycoses**, v.59, n.10, p.668-73, oct. 2016.

MIRHENDI, Hossein; MAKIMURA, Koichi; De HOOG, Sybren; REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; NAJAFZADEH, Mohammad; UMEDA, Yasushi; AHMADI, Behzad. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. **Medical Mycology**, v.53, n.3, p. 215–224, apr. 2015.

MURRAY, Iain. Some Aspects of the Biochemical Differentiation of Pathogenic Fungi: a Review. **Journal of General Microbiology**, v.52, n.2 p.1 3-22 1, apr. 1968.

NASCIMENTO, Adriana; MARTINEZ-ROSSI, Nilce. 18S-rDNA Sequencing, Enzyme Patterns and Morphological Characterization of *Trichophyton* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, Ribeirão Preto, v.32, p.179-186, jul. 2001.

NASRIN, Sheikhi; SAEED, Zaker; MIRZAAHMADI, Sina; SAHAR, Abdulaziz. Genotyping and molecular characterization of dermatophytes isolates collected from clinical samples. **Archives of Pulmonology and Respiratory Care**, v.3, n.2, p.52-57, jun. 2017.

OYEKA, Ike-Cyprian. *Trichophyton mentagrophytes* a keratinophilic fungus. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v.78, p. 60-65, dez. 2000.

PCHELIN, Ivan; ZLATOGURSKY, Vasily; RUDNEVA, Mariya; CHILINA, Galina; REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; LAVNIKEVICH, Dmitry; VASILYEVA, Natalya; TARASKINA, Anastasia. Reconstruction of phylogenetic relationships in dermatomycete genus *Trichophyton* Malmsten 1848 based on ribosomal internal transcribed spacer region, partial 28S rRNA and beta-tubulin genes sequences. **Mycoses**, v.59, n.9, p.566-575, sep. 2016.

PHILPOT, Chelsey. The differentiation of *Trichophyton mentagrophytes* from *Trichophyton rubrum* by a single urease test. **Sabouraudia**, v.5, p.189-193, feb. 1967.

PHILPOT, Chelsey. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. **Sabouraudia**, v.15, n.2, p.141-150, jul. 1977.

POSADA, D'margo.; BUCKLEY, Thomas. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. **Systematic Biology**, v.53, n.5, p.793–808, oct. 2004.

PRICE, Margaret; WILKINSON, Ian; GENTRY, Layne. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**. v.20, n.1, p.7-14, mar.1982.

PUTIGNANI, Lorenza; AREZZO, S.D., PAGLIA, M.G., VISCA, P. DNA-Based detection of human pathogenic fungi: Dermatophytes, opportunists, and causative agents of deep mycoses. In: Gherbawy, Y., Voigt, K. (eds.) **Molecular identification of fungi**. Springer- Velag Berlin Heidelberg, pp. 357-416, 2010.

RANNALA, Bruce; YANG, Ziheng. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. **Journal of Molecular Evolution**, California, v.43, n.3, p. 304–311, apr. 1996.

RAMBAUT, Andrew. **FigTree 1.2.2**. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>>. Acesso em: 22 maio. 2009.

REZAEI-MATEHKOLAEI, Ali; MIRHENDI, Hossein; MAKIMURA, Koishi; De HOOG, Sybren; SATOH, Kazuo; NAJAFZADEH, Mohammad; SHIDFAR, Mohammad; Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. **Medical Mycology**, v.52, n. 7, p.674-688, oct. 2014.

RIPPON, Jhon. Dermatophytosis and dermatomycosis. In: Rippon JW. **Medical mycology**. 3a ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1988. p.169-275.

ROMEIRO, Roberto. **Preservação de culturas de bactérias fitopatogênicas**. Mimeografado. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitopatologia. UFV. Viçosa, MG. 1996, 11p.

RONQUIST, Fredrik; HEULSENBECK, John. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, Uppsala, v.19, n.12, p.1572–1574, aug. 2003.

SCHMIDT, Michael. Boric Acid Inhibition of *Trichophyton rubrum* Growth and Conidia Formation. **Biol Trace Elem Res**. v.180, n.2, p.349-354, dec. 2017

SIDRIM, Julio; ROCHA, Marcos. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 388p.

SIDRIM, Julio; MEIRELES, T. E. F., OLIVEIRA, L. M.P., DIÓGENES, M. J. N. Aspectos clínico-laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C. & ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**, 1ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004b. p.41-49.

SIDRIM, Julio; ROCHA, Marcos; LEITE, João; MARANHÃO, F.C.A; LIMA, R.A.C.; CASTELO-BRANCO, D.S.C.M.; BANDEIRA, T.J.P.G.; CORDEIRO, R.A.;

BRILHANTE, Raimunda. *Trichophyton tonsurans* strains from Brazil: phenotypic heterogeneity, genetic homology, and detection of virulence genes. **Can. J. Microbiol**, v.59, p.754-760, 2013.

SIDRIM, Julio; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**, 1 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan S.A., 1999. p.50-61.

SHERF, Frontier. A method for maintaining *Phytomonas sepedomica* for long periods without transf. **Phytopathology**, v.31, p.30-32, may.1943.

TAKAHATA, Sho; KUBOTA, Natsuki; TAKEI-MASUDA, Naomi; YAMADA, Tsuyoshi; MAEDA, Mari; ALSHAHNI, Mohamed; ABE, Shigeru; TABATA, Yuji; MAEBASHIA, Kazunori. Mechanism of Action of ME1111, a Novel Antifungal Agent for Topical Treatment of Onychomycosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.2, p.873–880, nov.2016.

TAMURA Koichiro; STECHER Glen; PETERSON Daniel; FILIPSKI Alan; KUMAR Sudhir. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725-2729, oct.2013.

TARTABINI, Mirta; BONINO, Guillermo; RACCA, Liliana; LUQUE, Alicia. Estudio taxonómico de aislamientos clínicos de *Trichophyton* en Rosario, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v.45, n.4, p.248-253, oct.2013.

TARTOR, Yasmine; EL DAMATY, Mamdouh; HEND, Mahmmoud; YASSER, Seirawan. Diagnostic performance of molecular and conventional methods for identification of dermatophyte species from clinically infected Arabian horses in Egypt. **Vet Dermatol**, v.27, n.5, p.401-e102, oct. 2016.

TERAMOTO, Atsushi; MARTINS, Martin; CUNHA, Marcos. Avaliação de métodos para preservação de isolados de *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei. **Pesq. Agropec. Trop**, v.41, n.2, p.296-298, jun. 2011.

VERRIER, Joseph; MONOD, Maxime. Diagnosis of dermatophytosis using molecular biology. **Mycopathologia**, v.182, n.1-2, p.193-202, jun. 2017.

WEITZMAN, Ian; SUMMERBELL, Richard. The dermatophytes. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.2, p.240-259, apr. 1995

WHITE, Terence; FINDLEY, Kia; SCHEYNIUS, Annika; BOEKHOUT, Tholen; SAUNDERS, Chemieler. Fungi on the skin: Dermatophytes and *Malassezia*. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.4, n.3, p.198-202, jan. 2014.

WU, Yuan; YANG Jian; YANG, Fan; LIU, Tao; LENG, Wenchuan; CHU, Yonglie; JIN, Qi. Recent dermatophyte divergence revealed by comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial genomes. **Bio Med. Central Genomics**, v.10, n.21, p.238-252, may. 2009.

YO, Ayaka; YAMAMOTO, Mikachi; NAKAYAMA, Takako; ISHIKAWA, Jun; MAKIMURA, Koichi. Detection and identification of *Trichophyton tonsurans* from clinical isolates and hairbrush samples by loop-mediated isothermal amplification system. **Journal of Dermatology**, v.43,n.9,p.1037-43, sep. 2016.

YOSHIDA, Eri; MAKIMURA, Koichi; MIRHENDI, Hossein; KANEKO, Takehiko; HIRUMA, Masataro; KASAI, Tatsuya; UCHIDA, Katsuhisa. Rapid identification of *Trichophyton tonsurans* by specific PCR based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) 1 region. **Journal of Dermatological Science**; v.42, n.3, June, p.225-230, jun.2006.

ZIÓŁKOWSKA, Grazyna; NOWAKIEWICZ, Aneta; GNAT, Sebastian; TROŚCIAŃCZYK, Aleksandra; ZIĘBA, Przemysław; DZIEDZIC, Barbara. Molecular identification and classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains isolated from humans and selected animal species. **Mycoses**, v.58, n.3, p.119-126,jan. 2015.