MAURO CINTRA GIUDICE

**Avaliação das atividades enzimáticas
(queratinase e elastase) e biotipagem
molecular de amostras de *Microsporum
gypseum* isolados de diferentes fontes e
regiões geográficas do Brasil**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas - Universidade
de São Paulo, para obtenção de
Título de Doutor em Ciências
(Microbiologia).

São Paulo

2008

MAURO CINTRA GIUDICE

**Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e
biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum*
isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil**

Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção de Título de
Doutor em Ciências (Microbiologia).

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Walderez
Gambale

São Paulo

2008

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Giudice, Mauro Cintra.

Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e
biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isolados
de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil / Mauro Cintra
Giudice. -- São Paulo, 2008.

Orientador: Walderez Gambale.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Micologia.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the activity of
extracellular proteolytic enzymes (keratinase and elastase), and
molecular analysis of samples of *Microsporum gypseum* strains isolated
from different sources and geographical regions of Brazil.

Descritores: 1. Elastase 2. Queratinase 3. *Microsporum gypseum*
4. PCR-RFPL 5. Sequenciamento 6. Brasil I. Gambale, Walderez
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Pós
Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB148/2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato : Mauro Cintra Giudice

Tese : Avaliação das atividades enzimáticas (queratinase e elastase) e biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isolados de diferentes fontes e regiões geográficas do Brasil.

Orientador : Prof. Dr. Walderez Gambale

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado () Reprovado

Examinador(a) : Assinatura :
Nome:
Instituição :

Examinador(a) : Assinatura :
Nome:
Instituição :

Examinador(a) : Assinatura :
Nome:
Instituição :

Examinador(a) : Assinatura :
Nome:
Instituição :

Presidente: Assinatura :
Nome:
Instituição :

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 066, referente ao projeto intitulado **"Isolamento, obtenção da fase sexuada, determinação do perfil enzimático e biotipagem molecular de amostras de *Microsporum gypseum* isoladas de diferentes regiões"** sob a responsabilidade de **Mauro Cintra Giudice**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPESH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 13 de setembro de 2004.

Profa. Dra. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

À minha mãe, presente e pronta a me ajudar.

Aos meus irmãos, minha cunhada, meus sobrinhos, meus amigos.

Ao Prof. Dr. Walderez Gambale pela disposição e pela dedicação na orientação deste trabalho.

Aos colegas que dispuseram de algum tempo livre para colaborar com este trabalho, dedicando-se à coleta de amostras em diferentes locais do Brasil.

AGRADECIMENTOS

Aos profissionais e colegas do Laboratório de Micologia do Instituto Adolfo Lutz, de todos os tempos, especialmente à Dra. Márcia Melhem e Sandra Brasil, que já em 1986 me apresentaram à Micologia.

Aos amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus Araraquara, onde parte da minha formação acadêmica foi realizada.

Aos colegas do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina LIM-53, da Universidade de São Paulo, que sempre estiveram colaborando com meu aprendizado.

Aos amigos do Complexo Hospitalar do Mandaqui e do Laboratório Fleury, locais onde pude aprimorar e aplicar meus conhecimentos.

Às Faculdades Oswaldo Cruz e à Faculdade de Medicina do ABC, locais em que posso, até hoje, ensinar o que aprendi.

Aos colegas do LIM 54 – Bacteriologia, do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde hoje colaboro e aprendo cada vez mais.

Ao Prof. Dr. Carlos da Silva Lacaz, homem íntegro, dedicado e um grande cientista ao qual procuro espelhar-me.

A todos os meus alunos e ex-alunos, dos quais a paciência foi importante para aprender sobre a Micologia.

A Cristiane Minussi pelo apoio em todos os momentos, especialmente pelo auxílio na análise estatística.

A Glauce Mary Gomes Rittner que foi fundamental no árduo caminho de compreender e de executar as técnicas de biologia molecular.

A minha amiga especial Adriana de Araújo Reis Menezes que esteve presente desde o início desta empreitada e juntos conseguimos conquistar mais esta etapa acadêmica. Você merece um agradecimento especial, pois nestes últimos anos mais que aprender a ciência, aprendi a valorizar a vida.

Aos amigos do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (Laboratório de Micologia): Luciana, Flávia, Georgea, Ériques, Amanda, Débora, Elza, Paula, Marcos, Flávio, Bosco, Lilica, Marcelo, Glauce, Cássia, Alexandre, Valda, Luciana Thomaz, Márcia, Adelaide.

Aos Professores dos Laboratórios de Micologia do ICB que me receberam e auxiliaram o meu aprendizado: Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula, Prof. Dr. Benedito Corrêa, Prof. Dr. Carlos Peleschi Taborda, Prof. Dr. Mário Henrique de Barros e Prof. Dr. Flávio Alterthum.

Às alunas de iniciação científica Fernanda Marques Américo e Fabiana Aparecida Fonseca que sempre estiveram presentes e dispostas a ajudar.

À Shirlei Vieira Marques, por me ajudar, tecnicamente e emocionalmente e sempre acreditar que tudo daria certo.

Às funcionárias da secretaria do ICB, Alice, Naide, Aninha. A dedicação e de cada uma de vocês foi especial.

Aos funcionários do Setor de Esterilização do ICB.

Aos funcionários da biblioteca do ICB, pelos serviços prestados.

E finalmente aos meus amigos do dia-a-dia que estiveram suportando minhas decepções e estimulando-me cada vez que eu precisei. Rosi, Roseli, Rita, Zenil, Glória, Elsa, Rita Andrade, Rainer, Fernanda, Inneke, Anna Laura, Alexandre e Orozco,

A valorosa revisão textual da minha amiga e companheira Rosi Silva.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Programa de Apoio a Núcleos de Excelência - (FAPESP- PRONEX) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

Este trabalho foi preparado de acordo com as Diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, do Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2004.

“Há um poema budista que fala da felicidade humana usando a metáfora da água. ‘Se você deseja tranquilizar seu espírito e fazer com que ele recupere sua pureza original, deve proceder como se quisesse purificar um jarro de água barrenta do rio. Primeiro é preciso deixar assentar no fundo os sedimentos do barro, de modo que a água fique transparente: isto corresponde ao estado de espírito antes de ser perturbado pelas paixões e pelos temores. É aí, com atenção e cuidado, que você deve escoar a água cristalina em outra jarra, sem agitar o que ficou no fundo.’ E o poema conclui assim: ‘Quando o espírito está tranquilo e concentrado numa perfeita unidade, então todas as coisas podem ser vistas na sua unidade natural, no estado perfeito em que foram criadas e permanecem pela eternidade’.”

“Uma pequena história chinesa conta que um rapaz costumava maravilhar-se com o brilho das montanhas ao pôr-do-sol. Mais tarde, como estudante de filosofia, o jovem não conseguia mais interessar-se pela paisagem que via pela janela. Foi preciso que na maturidade, ele se esquecesse do que havia aprendido sobre o mundo, os homens e o sofrimento, para que pudesse de novo maravilhar-se com o brilho das montanhas ao pôr-do-sol. Da história, os antigos chineses concluíam que há duas formas de ignorância: a que se desconhece toda a teoria e só identifica a beleza, e aquela que não vê, senão seus interesses imediatos e sabe todos os discursos para justificá-los. A primeira pode ser chamada de virtude.”

Luiz Carlos Lisboa

RESUMO

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

Foram pesquisados *Microsporium gypseum* provenientes de diferentes fontes (clínica humana, clínica veterinária e do solo) e de diferentes regiões geográficas do Brasil. O isolamento do dermatófito do solo foi obtido através da técnica de isca de cabelos, usando crina de cavalo. Amostras veterinárias foram obtidas através do processamento de amostras clínicas na rotina laboratorial. Amostras clínicas humanas foram obtidas de coleção de culturas. Foram analisadas 692 amostras de solo e a taxa de recuperação foi de 19,2%. A atividade queratinolítica e elastinolítica foi avaliada quantitativamente em 138 amostras de *Microsporium gypseum*. Estudo de biotipagem molecular foi realizado através da técnica de PCR-RFLP com a enzima *MvaI*. O seqüenciamento da região ITS1 do rDNA foi realizado em amostras representativas. Amostras de *Microsporium gypseum* isoladas de amostras clínicas e do solo mostraram diferenças quantitativas significantes na expressão das enzimas estudadas. A restrição enzimática dos produtos da PCR do rDNA para a região ITS1 não mostrou distinção entre amostras clínicas humanas nem entre as amostras de solo isoladas de diferentes regiões geográficas. O seqüenciamento das amostras representativas mostrou a presença de duas espécies teleomórficas do complexo *Microsporium-gypseum-fulvum* (*Arthroderma gypseum* e *A. incurvatum*). As atividades enzimáticas sugerem um importante papel na patogenicidade e uma provável adaptação desta espécie de fungo ao parasitismo animal. A análise fenotípica e molecular das espécies de *Microsporium* podem auxiliar a identificação e o conhecimento de mecanismos de virulência destes fungos

Palavras-chave: Brasil; Elastase; Queratinase; *Microsporium gypseum*; RFLP; Sequenciamento.

ABSTRACT

GIUDICE, M.C. **Evaluation of the activity of extracellular proteolytic enzymes (keratinase and elastase), and molecular analysis of samples of *Microsporium gypseum* strains isolated from different sources and geographical regions of Brazil.** 2008. 149 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A survey of *Microsporium gypseum* was conducted from different sources (human, animal and soil) and geographical regions of Brazil. The isolation of dermatophyte from soil was performed by hair baiting technique and the species were identified by morphology. In total, 692 soil samples were analyzed and the recuperating percentage was 19.2%. The activities of keratinase and elastase were quantitatively performed in 138 samples. The PCR-RFLP with *MvaI* enzyme and sequencing of the ITS1 region of rDNA were performed in representative samples. *M. gypseum* strains, isolated from both soil and clinic samples, showed significant quantitative differences in the expression of both keratinase and elastase. The enzymatic restriction of the products of PCR of rDNA, to the ITS1 region was not different among the clinic human samples and neither in the soil of the different geographic regions. The sequencing of the representative samples revealed the presence of two teleomorphic species of *M. gypseum-fulvum* complex (*Arthroderma gypseum* and *A. incurvatum*). The enzymatic activities may play an important role in the pathogenicity and a probable adaptation of this fungus to the animal parasitism. Using the phenotypical and molecular analysis, the *Microsporium* identification and their teleomorphic states will provide a useful and reliable identification system.

Key Words: Brazil; Elastase; Keratinase; *Microsporium gypseum*; RFLP; Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Curva de expressão da atividade enzimática (elastase) em relação ao tempo de incubação para as amostras de *Microsporium gypseum* selecionadas.....54

Figura 2 Curva de expressão da atividade enzimática (queratinase) em relação ao tempo de incubação para as amostras de *Microsporium gypseum* selecionadas.....54

Figura 3 Média das atividade queratinolítica em UK (unidade de queratinase) e elastinolítica em UE (unidade de elastase), de cepas de *Microsporium gypseum* por origem das amostras , 2007.....57

Figura 4. Amplificação da região ITS1 do rDNA de *Microsporium gypseum* com primers específicos ITS1 e ITS2 (λ - padrão de peso molecular; linhas 1, 2, 3, 4 e 9 - amostras clínicas veterinárias; linhas 5, 6, 7 e 8 - amostras clínicas do solo; linhas 10 e 11 - amostra clínica humana; linha 12 – controle negativo).....59

Figura 5. Amplificação da região ITS1 e ITS2 do rDNA de *Microsporium gypseum* com primers específicos ITS1 e ITS2 e ITS3 e ITS4, respectivamente (λ - padrão de peso molecular; linhas 1 a 4 cepas de origem veterinária; linha 5 – controle negativo).....60

Figura 6. Restrição enzimática (RFLP) com a enzima *MvaI* da porção ITS1 e do produto total (incluindo as regiões ITS1 e ITS2) do rDNA de *Microsporium gypseum* com primers específicos ITS1 e ITS2 e ITS1 e ITS4, respectivamente (λ - padrão de peso molecular; linha 1 amostra de origem clínica humana; linhas 2 e 4 amostras isoladas do solo de São Paulo; linha 3 amostra isolada do solo de Rondônia; linha 5 – controle negativo).....61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição do número de amostras de solo analisadas e frequências absoluta e relativa de positividade por região administrativa e por Estado da Federação. São Paulo, Brasil, 2007.....52

Tabela 2 Valores absolutos da diferença da absorbância para elastase e para queratinase em relação ao controle, amostras ICB98 e CL 25.....53

Tabela 3 Distribuição absoluta e relativa da atividade queratinolítica (em UK - unidade de queratinase), de cepas de *Microsporum gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários e de amostras do solo de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.....55

Tabela 4 Distribuição absoluta e relativa da atividade elastinolítica (em UE - unidade de elastase), de cepas de *Microsporum gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários e de amostras do solo de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.....56

Tabela 5 Mediana das atividades queratinolítica em UK (unidade de queratinase) e elastinolítica UE (unidade de elastase), de amostras de *Microsporum gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários, de amostras do solo e de todas as amostras de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.....58

LISTA DE SIGLAS

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

ICB – Instituto de Ciências Biomédicas

ITS - Internal transcribed spacers

NTS – Non transcribed spacers

PCR – Primer Chain Reaction

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

rDNA – ácido desoxirribonucléico ribossomal

RFLP - Restriction fragment length polymorphism

RNA – ácido ribonucléico

RNAse –ácido ribonuclease

rpm – rotações por minuto

UE – Unidade de elastase

UK – Unidade de queratinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	<i>Microsporum gypseum</i>	19
1.2	Biologia dos dermatófitos	19
1.3	Aspectos ecológicos dos dermatófitos	21
1.4	Dermatófitos no Brasil	22
1.5	Dermatofitoses por <i>Microsporum gypseum</i>	26
1.6	Isolamento de dermatófitos do solo	28
1.7	Produção de enzimas por dermatófitos	31
1.8	Técnicas de biologia molecular para biotipagem de dermatófitos	34
2	OBJETIVOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1	Meios de cultura e soluções	39
3.2	Fluxograma de trabalho	43
3.3	Isolamento de <i>Microsporum gypseum</i> de amostras do solo	44
3.4	Seleção de cepas de <i>Microsporum gypseum</i> de amostras animais	44
3.5	Determinação do perfil enzimático das cepas	45
3.6	Biotipagem molecular	47
3.7	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Isolamento de amostras do solo	51
4.2	Curva de expressão enzimática	53
4.3	Determinação da atividade enzimática	55
4.4	Biotipagem molecular	58
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	ANEXOS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Microsporium gypseum*

O gênero *Microsporium* possui cerca de 18 diferentes espécies (SIMPANYA, 2000). Seus representantes produzem macroconídios e microconídios. Os macroconídios são multisseptados com parede celular fina, equinulados e em forma de fuso, mas a espessura da parede, a presença de equinulação e a forma do macroconídio são variáveis entre as espécies deste gênero. Os microconídios são piriformes com cerca de 2 a 3 μm e a espécie-tipo é o *Microsporium audouinii* Gruby, 1843.

Os estudos de cruzamento entre representantes do gênero têm mostrado que uma espécie anamorfa representa um complexo de espécies teleomórficas. *Microsporium gypseum-fulvum* é um destes complexos que engloba três espécies sexuadas de dermatófitos: *Arthroderma incurvata*, *Arthroderma gypsea* e *Arthroderma fulva* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000).

Microsporium gypseum Guiart e Grigorakis, 1928, em meios de cultivo adequado apresenta colônia inicialmente filamentosa e branca, tornando-se pulverulenta com tonalidade parda ou canela, por causa da grande produção de macroconídios em superfície. No reverso apresenta coloração marrom-clara, ou às vezes escura. Ao exame microscópico observam-se abundantes macroconídios fusiformes com três a nove células, sendo mais comum entre quatro a seis e de paredes delgada. Os microconídios são escassos e clavados. Produzem órgãos de perfuração do pêlo e são capazes de hidrolisar a uréia *in vitro*. (LACAZ et al., 2002; SIDRIM e ROCHA, 2004).

Trata-se de espécie geofílica que pode infectar o homem através do contato com o solo contaminado ou através do contato do homem com animais infectados.

1.2 Biologia dos dermatófitos

Os dermatófitos são fungos filamentosos hialinos e septados que compreendem um grupo de microrganismos com características morfológicas e fisiológicas especializadas, entre elas a de causar uma doença denominada de

dermatofitose ou tinea (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000; LACAZ et al., 2002). Além disso, os dermatófitos possuem duas propriedades importantes: são queratinofílicos e queratinolíticos, ou seja, eles têm a habilidade de digerir a queratina *in vitro*, quando saprófitas, utilizando esta proteína como substrato, e alguns dermatófitos podem invadir tecidos queratinizados (humanos e de outros animais) provocando a doença (SIMPANYA, 2000).

Baseado nos estágios dos ciclos de vida dos dermatófitos, eles podem ser divididos em dois grupos: fungos anamórficos e fungos teleomórficos. O estágio anamorfo é aquele em que ocorre a reprodução somática ou assexuada. O estágio teleomorfo tem sido encontrado em algumas espécies de dermatófitos e compreende a fase de reprodução sexuada. As características morfológicas da forma assexuada dos dermatófitos têm sido usadas como base para a classificação das diferentes espécies deste grupo (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000).

No período de 1841 a 1844, Gruby descreveu e isolou os agentes responsáveis pelo parasitismo ectótrico e endótrico, denominando-os, respectivamente, de *Microsporum audouinii* e *Trichophyton tonsurans* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995). Posteriormente, em 1910, Raymond Sabouraud publicou a obra “Les Teignes” (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 2002), apresentando estudos de taxonomia, de morfologia e os métodos de cultivo de dermatófitos, bem como o tratamento da doença. Na fase anamórfica, os dermatófitos se reproduzem por esporulação simples, produzindo artroconídios, macroconídios e microconídios a partir de células conidiogênicas especializadas (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SIMPANYA, 2000). Inúmeros arranjos morfológicos das hifas (hifas pectinadas, em candelabro, corpos nodulares etc.) e estruturas especializadas, tais como clamidoconídios, também são produzidos em algumas espécies. Todas estas características, associadas algumas vezes a requerimentos nutricionais, são usadas para identificar os gêneros e as espécies deste grupo.

De acordo com as características morfológicas e fisiológicas, os dermatófitos, na fase anamorfa, são classificados em três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, Subdivisão Deuteromycotina, Classe Hyphomycetes, Ordem Hyphomycetales, Família Moniliaceae

(MATSUMOTO e AJELLO, 1987) e a descrição dos gêneros segue o esquema de Emmons, baseando-se na estrutura conidial e na conidiogênese (LONDERO, 1990).

A existência da fase teleomórfica, ou fase sexual do ciclo de vida dos dermatófitos, foi descrita quando cleistotécios com ascósporos foram obtidos na recuperação de *Microsporum gypseum* de amostras de solo, através do uso da técnica de isca de cabelos (Técnica de Vanbreuseghem) (SIMPANYA, 2000). Anteriormente, a fase teleomorfa dos dermatófitos compreendia os gêneros *Nannizzia* e *Arthroderma* respectivamente relacionados aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, na fase anamorfa. No entanto, através de estudos morfológicos e moleculares, verificou-se não haver diferenças significativas que justificassem agrupá-los em dois gêneros distintos, predominando, portanto, *Arthroderma* (MC GINNIS, 1980; WEITZMAN et al., 1986; WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

A fase teleomorfa dos dermatófitos, principalmente de espécies geofílicas e zoofílicas dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, produzem ascos e ascósporos e são classificados no gênero *Arthroderma*, Família Arthrodermataceae, Ordem Onygenales, Classe Ascohymenomycetes e Subdivisão Ascomycotina (MATSUMOTO e AJELLO, 1987).

1.3 Aspectos ecológicos dos dermatófitos

Ecologicamente, os dermatófitos são divididos em espécies antropofílicas, zoofílicas e geofílicas, com base nos habitats a que estão associados primariamente (BÁRSENA-ASENSIO e CABO, 1996).

As espécies antropofílicas estão vinculadas ao homem, raramente infectando outros animais. As espécies zoofílicas freqüentemente estão associadas a animais, mas ocasionalmente infectam o homem ou são isoladas do solo. Por fim, as geofílicas estão ligadas a material queratínico (pêlos, penas etc.) em decomposição, disperso no solo, podendo causar doença no homem e em outros animais.

Filogeneticamente, os fungos saprofíticos do solo, através de adaptações progressivas, originaram os outros grupos, dado o desenvolvimento da capacidade de degradar a queratina, bem como a

freqüente associação de animais e do homem a ambientes onde os fungos estão presentes (FURTADO et al., 1987; BÁRSENA-ASENSIO e CABO et al., 1996).

Espécies zoofílicas são isoladas de pele ou pêlo de animais aparentemente saudáveis, mais freqüentemente do que em animais com franco desenvolvimento da doença, do homem e do solo. A infecção humana pode se dar indiretamente, através do contato íntimo com animais domésticos (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Os dermatófitos geofílicos desenvolvem-se em material queratínico em decomposição no solo, associando-se ecologicamente aos zoofílicos. No entanto, diferem destes pela grande capacidade de permanecerem no solo e por serem regularmente encontrados em ambientes pouco modificados, mas com animais constantemente presentes. A sua distribuição também parece ser influenciada pelo pH do solo e geralmente preferem pH próximos do neutro (BÖHME e ZIEGLER, 1969; SIMPANYA, 2000).

Poucos dermatófitos geofílicos são capazes de causar dermatofitoses em algumas espécies de animais, incluindo o homem. Os principais dermatófitos geofílicos são os representantes do complexo *Microsporum gypseum-fulvum* (SIMPANYA, 2000). De acordo com Georg, 1960, isolados de *Microsporum gypseum* provenientes do solo são menos patogênicos do que aqueles obtidos de animais e somente os isolados altamente virulentos são capazes de produzir doença. No entanto, amostras com baixo potencial de infectividade podem ter essa infectividade aumentada após a passagem por hospedeiros com baixa resistência (SIMPANYA, 2000).

Os representantes do complexo *Microsporum gypseum-fulvum* são cosmopolitas e apresentam graus de patogenicidade distintos, sendo *A. fulva* o menos patogênico (SIMPANYA, 2000).

1.4 Dermatófitos no Brasil

Considerando ainda os aspectos ecológicos dos dermatófitos, algumas espécies têm distribuição geográfica limitada e outras, cosmopolitas estando presentes em diferentes regiões do planeta. A veiculação dos fungos para espaços geográficos distintos está associada à movimentação migratória de

populações (BADILLET, 1988; LACAZ et al., 2002), às grandes guerras, à aglomeração de pessoas e ao uso comum de espaços físicos que propiciam a dispersão de conídios fúngicos, bem como à agregação de populações com características socioculturais comuns (RIPPON, 1988).

O processo de formação de novas espécies (especiação) entre os dermatófitos, determinado pela impossibilidade de ocorrência simultânea de espécies numa mesma área geográfica, parece ter sido comum entre os antropofílicos e rara entre os zoofílicos, pois aqueles possuem muitas espécies com áreas de endemidade bem definidas. No entanto, espécies antropofílicas cosmopolitas, como *T. rubrum* e *T. tonsurans*, no passado revelaram ter distribuição restrita, tendo sido distribuídos, principalmente, através de movimentos de hospedeiros humanos contaminados (RIPPON, 1988).

Fatores ambientais, tais como, composição do solo, temperatura e umidade atmosférica, podem estar relacionados à endemidade de certos dermatófitos em regiões específicas. *M. gypseum* e *T. ajelloi* são freqüentemente isolados de solo onde o conteúdo de matéria orgânica é mais abundante. *T. terrestre* e espécies de *Chrysosporium* são isoladas a partir de solos de composição empobrecida (ALVAREZ et al., 1986).

Em solos com pH neutro ou alcalino há um desenvolvimento acentuado de espécies de dermatófitos. Correlacionando-se este fato com a ação enzimática de proteinases de dermatófitos, que apresentam atividade em pH variando de 4,0 a 10,0, Alvarez et al. (1986), sugerem que a baixa freqüência destes fungos em solos ácidos pode estar associada à inibição da atividade enzimática nestas condições.

As espécies *M. canis*, *M. gypseum*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* são os agentes mais freqüentes de dermatofitoses humanas no Brasil. Destes agentes, *T. rubrum* e *T. tonsurans* são antropofílicos, *M. gypseum*, geofílico e *M. canis* e *T. mentagrophytes*, zoofílicos, sendo que há variedades deste último também antropofílicas. *Microsporum gypseum* é, entre os dermatófitos geofílicos, o que mais freqüentemente infecta o homem e outros animais (LONDERO e RAMOS, 1989).

Alguns estudos brasileiros de prevalência de dermatófitos em demonstram que *T. rubrum* é o agente mais freqüente nas regiões e épocas

avaliadas, mas relatam, ainda, isolamento de *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* associados a diferentes formas clínicas. Nestes estudos clínicos não há relatos de isolamento de *Microsporum gypsum* como agente de micoses cutâneas (FURTADO et al., 1987, PONTES et al., 2002, BRILHANTE et al., 2005,).

Gambale et al. (1987) estudaram 172 casos humanos com suspeita clínica de micoses superficial e os dermatófitos isolados com maior frequência na pele foram *Trichophyton rubrum* (34%), *T. mentagrophytes* (13%), seguido de *Epidermophyton floccosum* (3%). *Microsporum gypsum* foi isolado em 5% dos casos apenas em unhas.

Mais recentemente, Chinelli et al. (2003), estudando um período de 10 anos, descrevem os agentes de dermatofitoses mais prevalentes como sendo *Trichophyton rubrum* (48,7%), seguido de *Microsporum canis* (20,9%), *Trichophyton tonsurans* (13,8%), *Trichophyton mentagrophytes* (9,7%), *Epidermophyton floccosum* (4,1%) e *Microsporum gypsum* (2,5%).

Moraes et al. (2006) estudaram a incidência de tinea capitis em São Paulo (capital), avaliando 4.500 crianças e obtiveram positividade em 132 casos. *Microsporum canis* (70,5%) e *Trichophyton tonsurans* (23,2%) foram os agentes mais comuns, seguidos de *T. mentagrophytes* (3,6%), *M. gypsum* (1,8%) e *T. rubrum* (0,9%).

Siqueira et al. (2006) avaliaram a ocorrência de dermatófitos em estudantes universitários com e sem lesão de dermatofitose e, 80% das 103 amostras foram positivas para dermatófitos, sendo *Trichophyton rubrum* (80%), o agente mais freqüente, seguido por *T. mentagrophytes* (20%).

No Distrito Federal, Reis et al. (1992) observaram 3466 casos de dermatofitose num período de 17 anos e obtiveram 58,8% de isolamento de *T. rubrum* em diferentes manifestações clínicas. *T. tonsurans* foi isolado em 10,07%, compreendendo 54,99% dos casos de tinea capitis, seguido de *M. canis* (40,92%) nesta manifestação clínica. *M. gypsum* foi observado em 0,29% dos casos sendo obtidos de tinea capitis e também de tinea corporis.

As dermatofitoses em Goiânia foram estudadas por Costa et al. (2002) e num total de 445 (22,8%) amostras positivas, as culturas tiveram *Trichophyton rubrum* como a espécie mais freqüente (49,4%) seguida de *Trichophyton mentagrophytes* (30,8%) e *Microsporum canis* (12,6%).

Wanke et al. (1991) no Rio de Janeiro estudaram os fatores de risco de ocorrência de dermatofitoses em população adulta e obtiveram *T. rubrum* como a espécie mais prevalente, principalmente em tinea pedis, associando o uso de calçados apertados e a diabetes como fatores de risco para a doença, não relatando o isolamento de *M. gypseum* neste estudo.

Fernandes et al. (2001) avaliaram o papel dos dermatófitos em infecções cutâneas na infância, no Estado do Rio de Janeiro e os dermatófitos mais prevalentes foram *Microsporum canis*, seguido de *Trichophyton tonsurans* em 24 casos, *T. mentagrophytes* em 26 casos, *T. rubrum*. *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* foram isolados em dois e um casos, respectivamente.

Em estudo comparativo entre duas populações (Rio de Janeiro-RJ e Aracajú-SE), Costa et al. (1991) observaram a predominância de dermatófitos nas duas populações, tendo sido as dermatofitoses de pele glabra e tinea pedis as mais comuns manifestações clínicas da doença em ambas as cidades. No Rio de Janeiro houve predominância de *T. rubrum*, não havendo isolamento de *T. tonsurans*, fungo mais freqüente na população de Aracaju, ficando *T. rubrum* em segundo lugar.

T. tonsurans, dermatófito raro na Região Sul do Brasil, foi relatado em Porto Alegre (RS) em uma microepidemia em internato de meninos, acometendo 19 crianças em lesões de pele glabra e couro cabeludo (BASSANESSI et al. 1986).

Severo et al. (1989) descreveram um surto de infecção por *M. gypseum* em crianças de uma creche e também o isolamento do fungo do solo proveniente de uma caixa de areia onde as crianças brincavam. Os autores enfatizam a importância da cultura no exame micológico como fator preponderante para a caracterização do fungo e o estabelecimento da fonte de infecção.

Mezzari (1998) avaliou a freqüência de dermatófitos na região metropolitana de Porto Alegre e *Trichophyton rubrum* foi o mais importante (55,33%) seguido por *T. mentagrophytes* (21,46%). Os dados obtidos pelo autor foram comparados com estudos anteriores realizados no interior do estado nos 32 anos precedentes e, nestes estudos, *T. verrucosum*, *T. simii*,

Microsporum persicolor, *T. schöenleinii*, *M. nanum* e *M. cookei* foram encontrados apenas no interior e *T. violaceum* foi isolado apenas na capital.

Dos Santos et al. (1997) relataram os dermatófitos encontrados na cidade de Florianópolis (Santa Catarina) e o fungo mais prevalente foi *Trichophyton rubrum* (58.6%), seguido por *T. mentagrophytes* (25.3%), *Epidermophyton floccosum* (7.2%), *Microsporum canis* (4.8%), *T. tonsurans*, *T. violaceum* (1.6%) e *M. gypseum* (0.8%).

1.5 Dermatofitoses por *Microsporum gypseum*

Alguns poucos relatos do isolamento de *Microsporum gypseum* são encontrados na literatura, causando lesões incomuns, refratárias a tratamentos ou em pacientes com alguma doença de base (PORRO et al., 1997; GIUDICE et al., 1997; FERNANDES et al., 1998; LUQUE, et al., 2001; GALHARDO et al., 2004; CRIADO et al., 2005; PROCHNAU et al., 2005; MACHADO et al., 2005, DA SILVA et al., 2005)

Já foram relatadas algumas microepidemias por *Microsporum gypseum* em diversos locais do mundo - Costa do Marfim, Inglaterra, Brasil e Colômbia - (LONDERO e RAMOS, 1989, COSTA et al., 1994) com formas clínicas bem diversas.

Lopes et al. (1992) estudaram as dermatofitoses humanas causadas por *M. gypseum* no interior do Rio Grande do Sul, obtendo prevalência de 1,0% das micoses cutâneas. Em 71 casos de dermatofitose por este agente, os pacientes do sexo masculino foram os mais acometidos e a faixa etária variou de 2 a 60 anos de idade, predominando o intervalo de 0-10 anos (n=31). Destes casos, 68 viviam em zona urbana e 3 em zona rural.

Hayashi et al. (1983), documentaram, no período de 1931 a 1980, no Japão, 271 casos de infecção por *M. gypseum*, descritos por diversos autores. Foram relacionados à distribuição geográfica, faixa etária, aspectos clínicos e localização, prevalecendo a ocorrência desta doença em regiões com cidades grandes, como Tóquio. A faixa etária mais afetada foi a de crianças com até 10 anos de idade e lesões de pele glabra, principalmente na forma de tinea corporis.

Um surto de tinea corporis por *M. gypseum* que afetou 13 crianças de 1 a 15 anos de idade foi relatado por Sierra de Arroyave et al. (1977), na Colômbia. O agente etiológico foi isolado do solo de um terreno baldio freqüentado pelas crianças.

Onsberg (1978) descreveu 90 casos de dermatofitoses por *M. gypseum* na Dinamarca, observados no período de 1933 a 1977, distribuindo-os entre sexo, faixa etária e regiões do corpo afetadas. O autor enfatiza um achado de tinea unguium por *M. gypseum* em uma criança com um ano de idade.

Chmel et al., 1970, estudando 1387 pequenos mamíferos da região da Eslováquia, obtiveram 2,1% de isolamento de *M. gypseum* a partir de animais saudáveis. No mesmo estudo relatam a ocorrência de 52,4% de dermatofitoses por *M. gypseum* em população de crianças em idade escolar, além de avaliarem a distribuição geográfica destas ocorrências.

Ginter (1989) estudou a dermatofitose por *M. gypseum* na Áustria, desde 1977, observando uma evidente predominância entre as mulheres, além de considerar aspectos clínicos ecológicos e epidemiológicos desta infecção. Descreveu, também, a ocorrência de um caso de tinea unguium por *M. gypseum*.

As infecções humanas por *M. gypseum* são esporádicas o que pode sugerir uma resistência natural à infecção ou ao pequeno poder patógeno do fungo (GORDON et al., 1967). Manifestações clínicas atípicas e refratárias a tratamentos tópico ou sistêmico já foram descritas na literatura em pacientes portadores do vírus HIV, relacionando-se epidemiologicamente à fonte de infecção geofílica (GIUDICE et al., 1997; FERNANDES et al., 1998; LUQUE et al., 1991)

Um caso de tinea corporis causado por *M. gypseum* em paciente do sexo feminino, apresentando numerosas lesões com aparência eczematosa, localizadas em bordos de ferimentos da parte interna da coxa, provocados por queda, foi descrito por Knöpfel et al. (1991)

Schmidt et al. (1991) descreveram um caso de tinea capitis inflamatória causada por *M. gypseum* em criança com 5 anos de idade, evidenciando aspectos epidemiológicos e terapêuticos desta infecção, além de alertarem a necessidade do reconhecimento do agente da tinea capitis para o direcionamento correto da conduta terapêutica.

1.6 Isolamento de dermatófitos do solo

O isolamento de dermatófitos e espécies correlatas do solo têm sido feito por diferentes pesquisadores e pode ser obtido através da técnica de isca de cabelos, onde pêlos estéreis são parasitados pelo agente existente no solo contaminado (SIMPANYA, 2000; LACAZ et al., 2002).

Segundo Chmel (1972) *apud* Simpanya (2000) ⁽¹⁾, os dermatófitos iniciaram seu processo evolutivo como fungos saprófitas em solo com vegetais em decomposição ou outras substância orgânicas, no entanto, o entulho é considerado hoje o principal reservatório para os fungos queratinofílicos.

Em virtude das diferentes comunidades fúngicas no ambiente e por causa da grande quantidade de resíduos no solo, alguns métodos diferentes são propostos para o isolamento de fungos queratinofílicos do solo. Cada procedimento deve avaliar a qualidade dos resíduos disponíveis e, para os fungos queratinofílicos, amostras obtidas de superfície parecem ser mais proveitosas, especialmente quando se removem os detritos mais expostos (SIMPANYA, 2000).

Apesar de não existir um padrão específico quanto à quantidade de solo a ser coletada, quanto menor a quantidade, menor a chance de recuperação de fungos queratinofílicos. Alguns autores têm sugerido a coleta de 50 gramas para cada procedimento, ou seja, 50 gramas/placa de Petri. Para incrementar o isolamento sugerem o processamento das amostras em até 24 horas após a coleta, caso não seja possível, deve-se refrigerá-la de 0 a 4 °C até a realização da técnica. No entanto, não se mostra clara a padronização quanto à estocagem das amostras coletadas, o que pode variar muito, de acordo com o tipo de solo amostrado (SIMPANYA, 2000).

¹CHMELL, L. et al. The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil. *Sabouraudia*. v.10, p. 26-34, 1972

Existem muitas variações na técnica de iscas (Método de Vambeuseghem). As principais delas mudam o substrato de fonte de queratina (penas de aves, crina de cavalo, lã de carneiro, pêlos humanos, espinhos de ouriços terrestres, ou pelames de cobaia) (SIMPANYA, 2000). O uso das diferentes fontes de queratina pode estar relacionado às afinidades diferentes de algumas espécies de dermatófitos pelos diferentes tipos de queratina, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Mercantini et al. (1989), estudando o solo antártico, obtiveram o isolamento de *M. gypseum* em áreas inabitadas, durante trabalhos de construção de bases e regiões onde havia passagem de animais da região e *T. terrestre* em áreas de trabalho de pesquisadores, juntamente com animais locais.

Sharma et al. (2008) conduziram um estudo para avaliar a biodiversidade microbiana na região da Índia central. Foram encontrados *Microsporum persicolor* como o mais freqüente, além de *Microsporum fulvum* e *Microsporum gypseum*.

Gugnani et al. (2007) avaliaram a presença de fungos patogênicos em solos de tocas de ratos de bambus, na Índia e no Nepal, através da técnica de diluição, não usando a técnica de isca com queratina. Em 215 amostras de solo foram isolados 23 espécimes de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e dois de *Microsporum gypseum*, entre os dermatófitos.

Ulfing et al. (2006) pesquisaram diferentes amostras de solo, provenientes de aterro sanitário público, com o objetivo de isolar fungos queranitolíticos, obtendo 76,56% de positividade. Entre as espécies de dermatófitos isoladas, reportaram *Microsporum racemosum*, *M. cookei* e *M. gypseum*. Os autores relacionam o isolamento destes fungos com o alto grau de acidez do solo, com a presença de bactérias do grupo coliforme e a deficiência de água como os principais fatores que influenciam a presença destes microrganismos.

Deshmukh e Verekar (2007) avaliaram 32 amostras de solo coletadas em locais próximos a crateras de meteorito onde existe um lago, na Índia. Usando o método de Vambreuseghem, isolaram e identificaram espécies de *Aphanoascus* e *Chrysosporium*, *Auxarthron* e *Ctenomyces*. Neste estudo não foi encontrado *Microsporum gypseum*, nem outras espécies de dermatófitos.

Deshmukh et al. (2004) analisaram 125 amostras de solo de 20 diferentes salinas da região de Mumbai, na Índia, através da técnica de isca com crina estéril de cavalos e obtiveram o isolamento de *Microsporum gypseum* em 7,2% das amostras. O isolamento deste fungo em zonas costeiras é associado por estes autores com o pH do solo e com condições nutricionais e climáticas que podem favorecer a sua sobrevivência e adaptação às zonas costeiras, o que sugere que esta espécie pode ser tolerante a altas concentrações de cloreto de sódio.

Deshmukh (1985), utilizando-se do método de isca de cabelos, obteve na área de Mussoorie, na Índia, 11,53% de isolamento de *M. gypseum* e 2,55% de *T. terrestre*. A presença destes fungos foi maior em áreas de bosques e jardins.

Na Índia, *Microsporum gypseum* foi isolado, através da técnica de isca de cabelos, de 11 amostras de poeira de vários hospitais e em 21 amostras de solo de áreas públicas com taxa de recuperação de 4,2% e 5,4%, respectivamente (VIDYASAGAR et al., 2005)

Hedayati et al. (2004) analisaram 23 amostras de solo obtidas de vasos de plantas de quatro diferentes hospitais iranianos com o objetivo de isolar fungos patogênicos. Usaram duas técnicas diferentes de isolamento: semeadura direta do solo em ágar Sabouraud com cloranfenicol e a técnica de isca de cabelos. Apenas através da técnica de isca foi possível obter o isolamento de *M. gypseum* em dois dos hospitais avaliados.

Em solo de fazendas de criação de aves na Índia foi pesquisada a presença de fungos queratinofílicos usando como isca de queratina de penas de aves esterilizadas por autoclavagem e em 64% houve isolamento de *Microsporum gypseum* (PERIASAMY et al., 2004)

Em outra pesquisa, também na Índia, através da mesma metodologia utilizada no trabalho anterior, foram isolados, em amostras de solo de fazendas de aves, vários dermatófitos, entre outros fungos não queratinofílicos: *Chrysosporium keratinophilum* (73%), *Trichophyton mentagrophytes* (68,2%), *Microsporum gypseum* (64%), *Myceliophthora vellerea* (32%), *Arthroderma tuberculatum* (27.3%) e *Geomyces pannorum* (23%) (AMBU, et al., 2004).

Oyeka e Okoli (2003) estudaram e isolaram, através da técnica de isca de cabelos, dermatófitos em solo de diferentes regiões da Nigéria, sendo que

em uma das regiões, fizeram coletas de poeira de carpete por meio de um aspirador. De 60 amostras foram isolados *Microsporum gypseum* (36,7%) e *Trichophyton mentagrophytes* (11,7%) e outros fungos não dermatófitos: *Aspergillus flavus* (83,3%); *Fusarium* sp. (60%) e *Chrysosporium indicum* (8,3%). Da poeira do carpete, foram isolados *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *A. flavus*, *Fusarium* sp. e *Hendersonula toruloidea*.

Deshmukh e Agrawal (2003) avaliaram 112 amostras de solo da região de Jammu, na Índia, através do método de Vambreuseghem usando pêlos humanos como isca e isolaram 13 espécies de seis gêneros, das quais *Microsporum gypseum* foi a mais freqüente (21,5%) seguido por *Keratinomyces ajelloi* (15,4%). Os outros dermatófitos encontrados foram: *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. terrestre*.

No Brasil, relatos de isolamento de dermatófitos do solo são escassos, muitas vezes apresentados associados ou não à descrição de casos clínicos (CASTRO et al., 1961; DA COSTA et al., 1962; VILELA e MORAES, 1962; FISCHMAN e RAMOS, 1967; SEVERO et al., 1989; GIUDICE et al., 1997).

Goulart et al. (1986) relatam o isolamento de *Microsporum gypseum* em solo da cidade do Rio de Janeiro. Foram amostradas regiões populosas, menos populosas e praias da cidade e, de 500 amostras, 102 foram positivas para dermatófitos. Os autores apresentaram estes dados como significativos para implementação de programas de saúde pública na região.

Mais recentemente, Krakhecke et al. (2005) avaliaram a sensibilidade aos antifúngicos em amostras de *Microsporum gypseum* provenientes do solo e de animais aparentemente saudáveis, no entanto os autores não relatam a origem nem a forma de obtenção dos fungos estudados.

1.7 Produção de enzimas por dermatófitos

As características morfológicas, associadas ou não a testes nutricionais e bioquímicos, são utilizadas para a identificação dos dermatófitos (LACAZ et al., 2002). Padrões de atividades enzimáticas de dermatófitos, isolados de diferentes fontes, também têm sido empregados para caracterizá-los, provavelmente pelo fato de estas enzimas estarem implicadas na patogênese da dermatofitose (SIMPANYA e BAXTER, 1996; MUHSIN e SALIH, 2001).

Várias enzimas têm sido demonstradas e eventualmente correlacionadas com a virulência dos dermatófitos, como a queratinase (YU e HARMON, 1968; TAKIUCHI et al., 1982; LEE et al., 1987; APODAKA e MCKERROW, 1988; MIGNON et al., 1998; VIANI et al., 2001), a elastase (RIPPON, 1967 KOTAHARY et al., 1984; APODAKA e MCKERROW, 1988; SIMPANYA e BAXTER, 1996; LÓPES-MARTINEZ et al., 1994; VIANI et al. 2001), a DNase (LÓPES-MARTINEZ et al., 1994; VIANI et al., 2001) e a colagenase (RIPPON e VARADI, 1968; LUPAN e NZIRAMASANGA 1986; OKEKE e MÜLLER, 1991; IBRAHIM-GRANET et al., 1996; VIANI et al., 2007). Em relação a *Microsporum gypseum* há poucos trabalhos na literatura sobre este assunto.

Gupta e Ramnani (2006) afirmam que as queratinases são proteases capazes de degradar substratos queratínicos, porém a exata natureza da queratinólise é ainda desconhecida. Afirmam ainda que o papel patogênico da queratinase produzida por dermatófitos é bem conhecida.

Weary et al. (1965), estudando duas cepas de *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*, demonstraram a atividade queratinolítica do micélio e discutiram a necessidade de melhores estudos sobre as enzimas extracelulares destes microrganismos.

Yu et al. (1971) purificaram pela primeira vez uma queratinase de peso molecular de cerca de 48 kDa, em um dermatófito do gênero *Trichophyton*, em filtrado de cultura estacionário seguido de agitação. Os autores purificaram outras duas queratinases de pesos moleculares estimados em 44 kDa e 23 kDa associados à parede celular de *T. mentagrophytes*.

Takiuchi et al. (1982) demonstraram em eletroforese uma queratinase de peso molecular aproximado de 45 kDa para *Microsporum canis*. A atividade imunogênica contra esta proteína foi avaliada e concluíram que esta queratinase era imunologicamente idêntica às queratinases detectadas em *Microsporum gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*.

Okafor e Ngwogu (2000) testaram a atividade queratinolítica de cepas de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. audouinii* e *M. gypseum*, isolados de crianças com dermatofitose, e detectaram a enzima em todas as cepas, sendo que as de *Microsporum gypseum* produziram esta enzima em maior quantidade.

Rippon e Varadi (1968) demonstraram a atividade elastinolítica em amostras de *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *T. verrucosum*, *T. schoenleinii* e *T. soudanenses* e não encontrou atividade desta enzima em amostras de *T. rubrum*, *T. concentricum*, *E. floccosum*, *M. audouinii*, *M. canis* e *M. gypseum*. Esses autores correlacionaram, ainda, a produção de elastase com o estágio sexual dos dermatófitos.

Apodaka e Mckerrow (1989) demonstraram as atividades azocolítica, queratinolítica e elastinolítica do sobrenadante de cultura em amostras de *T. rubrum* cultivadas em meio com vários substratos, isolando uma proteinase de 27 kDa com atividade em azocol, colágeno tipo III, pró-colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e fraca atividade em elastina e queratina.

Muhsin et al. (1997) pesquisaram em meios sólidos a excreção de elastase, queratinase, proteinase, fosfolipase e lipase em 123 amostras de dermatófitos e leveduras e em todos os dermatófitos houve detecção de queratinase, lipase e proteinase. Elastase foi demonstrada em *T. mentagrophytes*, *T. verrucosum* e *M. gypseum*.

Ensaio espectrofotométrico para quantificar a atividade enzimática, especialmente a queratinase, têm sido empregados por alguns autores tanto em fungos filamentosos como em outros organismos, incluindo nematódeos, helmintos, bactérias filamentosas (SCOTT e UNTEREINER, 2004).

Abdel-Rahman (2000) avaliou a expressão enzimática de proteases exocelulares em isolados clínicos de *Trichophyton tonsurans*. A quantificação foi realizada para colagenase e gelatinase pelo uso de um kit contendo conjugado fluorescente. A queratinase foi determinada avaliando-se a degradação da queratina por espectrofotometria com uso de keratin azure.

Em 2001, Viani et al. (2001), empregando método qualitativo, descreveram a presença da atividade elastinolítica em 23,3% das cepas de *M. canis* isoladas de animais com dermatofitose e em apenas 6,7% das cepas isoladas de animais assintomáticos. Em estudo seqüencial, Viani et al. (2007) mostraram diferença estatisticamente significativa entre cepas provenientes de animais com e sem dermatofitose, sugerindo que a elastase (como a queratinase) influencia as reações teciduais das dermatofitoses.

1.8 Técnicas de biologia molecular para biotipagem em dermatófitos

Mais recentemente, técnicas de biologia molecular têm sido aplicadas aos dermatófitos com a finalidade de diagnóstico, identificação laboratorial e como marcadores epidemiológicos, mostrando bons resultados para a diferenciação interespecífica, ao contrário do observado para a diferenciação intra-específica, em que os resultados não são satisfatórios, principalmente pela grande homogeneidade genética entre os membros deste grupo (BOCK et al., 1994; KANO et al., 1997; KANO et al., 1998; MAKIMURA et al., 1999; KIM et al. 1999; BLANZ et al., 2000; FAGGI et al., 2001).

Kano et al. (1997), utilizando técnica de RAPD e análise de hibridização com sonda de DNA, conseguiram distinguir *M. canis* de *M. gypseum*.

Harmsen et al. (1999) sugeriram que o estudo da região ITS (seqüências intergênicas) pode ser de grande valia para a identificação de espécies de dermatófitos, porém, como não foi encontrada nenhuma variação intra-específica neste grupo, o uso desta técnica para biotipagem das espécies é limitado.

Usando o seqüenciamento das regiões ITS1 do DNA ribossômico, Makimura et al. (1999) conseguiram montar uma filogenia, separando todas as espécies estudadas de dermatófitos.

Yu et al. (2004) usaram técnicas moleculares para biotipar amostras de *M. canis* isolada de espécimes clínico e ambientais, usando técnicas de RAPD, amplificação específica de espaços não transcritos (NTS) de r-DNA e seqüenciamento da região ITS do r-DNA, porém não encontraram diferenças entre as cepas.

A análise de restrição com ou sem sondas tem mostrado seu valor para diferenciação em outras espécies de fungos como *Candida albicans* e outros fungos filamentosos (VICENT, et al., 1986; ANDERSON et al., 1987; MOODY et al., 1990; KOSIR et al., 1991; HARMSSEN et al., 1999).

Jackson et al. (1999) mostraram que a digestão enzimática com *MvaI* em produtos amplificando a região ITS produz padrões de fragmentos únicos e facilmente identificáveis para a maioria das espécies de dermatófitos. Os autores sugerem o uso de mais de uma enzima de restrição como procedimento para melhorar o poder discriminatório entre as espécies.

Shin et al. (2003) avaliaram a diferenciação molecular entre vários gêneros de dermatófitos de origem clínica e de coleção de cultura. A restrição enzimática foi realizada utilizando-se as enzimas *MvaI*, *HinfI*, *DdeI* e *BsYI* e foram obtidos 11, 9, 10 e 8 diferentes padrões moleculares entre as diferentes espécies, respectivamente, com bandas de diferentes pesos moleculares. Concluíram que as enzimas *DdeI* e *MvaI* parecem ser mais aplicáveis para a identificação da maioria das espécies de dermatófitos, exceto entre fungos altamente relacionados filogeneticamente.

Leon-Mateos et al. (2006) estudaram a região ITS de seis diferentes espécies do gênero *Microsporum* e de um isolado atípico. A digestão enzimática usando-se as enzimas *MvaI* e *EcoRI* demonstraram diferentes padrões de restrição.

A utilização das técnicas de biologia molecular para obtenção de marcadores epidemiológicos ainda não apresenta resultados satisfatórios entre os dermatófitos, porém poucas técnicas têm sido aplicadas a este grupo de microrganismo.

Sendo assim, uma caracterização mais apurada da espécie *M. gypseum* torna-se fundamental para que se possa estabelecer algum elo entre as fontes de infecção e a gênese dos processos infecciosos.

2 OBJETIVOS

Considerando que *Microsporum gypseum* é o principal dermatófito geofílico que circula entre pacientes humanos e animais; que apresenta um aspecto ecológico geofílico, bastante heterogêneo; que ainda é isolado de diferentes áreas geográficas, apresentando uma distribuição cosmopolita; e que a virulência dos dermatófitos, em geral, está associada à sua atividade enzimática, principalmente à atividade de queratinase e elastase, os objetivos desta pesquisa são:

- ✓ Isolar *Microsporum gypseum* de amostras do solo da região Amazônica (Monte Negro – RO) e de outras regiões do Brasil.
- ✓ Selecionar amostras de *Microsporum gypseum* de origem animal ou humana.
- ✓ Analisar quantitativamente a atividade enzimática (queratinase e elastase).
- ✓ Analisar o polimorfismo de fragmentos de DNA (RFLP) com a enzima de restrição MVA I.
- ✓ Comparar os resultados obtidos com as amostras procedentes de diferentes regiões e fontes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

3.1.1 Solução de extrato de levedura 5%

Extrato de Levedura (Oxoid)	5 g
Água destilada qsp	100 mL

Cerca de 5 mL da solução foram distribuídas em tubos e esterilizados em autoclave por 121 °C por 15 minutos. Após este procedimento os tubos foram inclinados até solidificação, quando então foram acondicionados em refrigeração (4 °C ± 2 °C) por até três meses.

3.1.2 Ágar Mycosel (Oxoid)

Agar Mycosel	5 g
Água destilada qsp	100 mL

A mistura foi preparada em frasco apropriado e aquecida em forno de microondas até que o ágar se apresentasse transparente (solubilizado) e neste momento cerca de 10 mL do meio foi distribuído em tubos e esterilizados em autoclave por 121 °C por 15 minutos. Após este procedimento os tubos foram inclinados até solidificação, quando então foram acondicionados em refrigeração (4 °C ± 2 °C) por até três meses.

3.1.3 Ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (Oxoid)

Agar Sabouraud dextrose 4%	5 g
Cloranfenicol	0,001g
Água destilada qsp	100 mL

A mistura foi preparada em frasco apropriado e esterilizada em autoclave por 121 °C por 15 minutos. Após este procedimento o material foi resfriado até cerca de 55 °C e, 18 a 20 mL foram distribuídos em placas de Petri descartáveis estéreis. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram invertidas,

acondicionadas em sacos plásticos limpos e em refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por até dois meses.

3.1.4 Ágar Batata dextrose

Ágar Batata dextrose	5 g
Água destilada qsp	100 mL

A mistura foi preparada em frasco apropriado e esterilizada em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após este procedimento o material foi resfriado até cerca de 55°C e, 18 a 20 mL foram distribuídos em placas de Petri descartáveis estéreis. Este procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. Após a solidificação do meio de cultura as placas foram invertidas, acondicionadas em sacos plásticos limpos e em refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por até dois meses. O mesmo meio de cultura foi preparado, também, em tubos. Neste caso o meio foi solubilizado por pré-aquecimento em forno de microondas e distribuído nos tubos apropriados (de 10 a 12 mL) e em seguida autoclavados para esterilização sob as mesmas condições e posteriormente inclinados. O armazenamento deste meio de cultura foi em refrigeração ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) por até três meses.

3.1.5 Meio com substrato para estudo das enzimas (Siesenop e Böhm, 1995).

Queratina em pó purificada de chifres e cascos (ICN) ou Elastina (Sigma)	3,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,6 g
Protovit [®] (Roche)	1,0 mL
Cloreto de Cálcio (CaCl_2)	0,111mg
Cicloheximida	1,0 g
Água destilada qsp	1000 mL

Todos os ingredientes foram misturados em frasco apropriado, exceto o substrato enzimático (queratina ou elastina). A solução foi esterilizada em autoclave por 121°C por 15 minutos. Após este procedimento o material foi resfriado até cerca de 55°C e, então, 50 ml foram distribuídos em frascos tipo

Schott de cor âmbar, com capacidade para 250 mL já contendo os substratos específicos na proporção apropriada para o volume final (0,15 g do substrato para 50 mL de meio). O armazenamento deste meio de cultura foi em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até três meses.

3.1.6 Tampão TRIS-HCl 200 mM, CaCl_2 100 mM, pH 8,0

Tris Base (Bio – Rad)	12,1 g
Cloreto de Cálcio CaCl_2	111,1 g
Ácido Clorídrico PA (HCl)	Suficiente para acertar o pH

A solução foi esterilizada em autoclave por $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. O armazenamento foi em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até três meses.

3.1.7 Tampão fosfato 10 mM, pH 6,0 e 7,0

	pH 6,0	pH 7,0
NaH_2PO_4	1,19 g	0,533 g
Na_2HPO_4	0,193 g	0,871 g
Água destilada qsp	1000 mL	1000 mL

As soluções foram esterilizadas em autoclave por $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. O armazenamento foi em refrigeração ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) por até três meses. O pH foi ajustado com HCl 1M.

3.1.8 Tampão TAE 50 X

Tris (Invitrogen)	24,2 g
Ácido Acético Glacial (Merck)	5,71 mL
EDTA (USB Co.)	19,0 g
Água ultra pura qsp	1000 mL

3.1.9 Tampão de lise (Tris HCl 50 mM, EDTA 50 mM, 3% SDS, 1% β -mercaptoethanol, pH 7.2)

Tris (Invitrogen)	0,0605 g
EDTA (USB Co.)	0,1861g
SDS	3 g
β -mercaptoethanol	1,0 mL
Água ultra pura qsp	100 mL

O pH da solução foi acertado, se necessário, com HCl 1M.

3.1.10 Tampão TE 10 X (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0)

Tris (Invitrogen)	1,21 g
EDTA (USB Co.)	0,372g
Água ultra pura qsp	80 mL

3.1.11 Corante para gel - brometo de etídio

Tris (Invitrogen)	1,21 g
EDTA (USB Co.)	0,372g
Água ultra pura qsp	80 mL

3.2 Fluxograma de trabalho

3.3 Isolamento de *Microsporium gypseum* de amostras do solo

As amostras de solo foram coletadas de diferentes Estados do Brasil, incluindo-se a região da Amazônia Legal, especialmente a cidade de Monte Negro onde se concentra o núcleo do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As técnicas de isolamento do fungo foram processadas através da utilização de isca de cabelos (LACAZ et al., 2002).

As amostras de solo coletadas foram transferidas, de maneira asséptica, para placas de Petri estéreis. Material queratínico animal (crina ou cauda de cavalo) foi cortado e esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 15 minutos e em seguida distribuído sobre a amostra de solo. Para estimular o desenvolvimento de dermatófitos queratinofílicos foram adicionados cerca de 4,0 mL de solução de extrato de levedura 5,0% e 4,0 mL de água destilada estéril.

As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 50 dias e observadas semanalmente para verificação de parasitismo da fonte queratínica por fungos da espécie *Microsporium gypseum*.

Cada pêlo suspeito de ter crescimento fúngico foi observado por microscopia em lâmina com corante azul de lactofenol. Para isolamento do fungo após crescimento nos pêlos foi usado meio de cultura Mycosel (Oxoid). Neste meio os pêlos parasitados foram plaqueados em superfície com auxílio de alça microbiológica estéril e descartável. As placas de Mycosel foram incubadas à temperatura ambiente por 10 dias.

Os fungos com características macroscópicas sugestivas do objeto deste estudo foram isolados novamente em meio de cultura Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol 1% (ASD) e, após o desenvolvimento, os estudos morfológicos, macroscópico e microscópico, foram realizados em Ágar Batata dextrose (PDA) para confirmação da espécie do fungo.

3.4 Seleção de cepas de *Microsporium gypseum* de amostras de animais

As amostras de *Microsporium gypseum* isoladas, a partir de material clínico de origem animal provenientes do Hospital Veterinário foram

processadas e identificadas na rotina do Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Quando a amostra suspeita de dermatofitose foi coletada por retirada de pelames da área afetada, foram semeadas em duplicata em meios de cultura Ágar Sabouraud dextrose com 1% de cloranfenicol e Agar Mycosel, incubados a 25 °C e 37 °C por 15 dias. A identificação foi realizada através das técnicas de análise macroscópica e microscópica em Ágar Batata dextrose.

Quando as coletas foram feitas através da técnica de *imprinting* com carpete estéril, o material coletado foi depositado sobre uma placa contendo Ágar Mycosel e incubado à temperatura ambiente por 15 dias. A identificação foi executada do mesmo modo. Amostras de carpete foram coletadas em outras regiões geográficas do Brasil Incluindo-se o ICB 5 (Monte Negro – RO) e enviadas para o Laboratório do ICB II para processamento final.

3.4.1 Preparo dos carpetes para coleta de amostras animais por *imprinting*

Os pedaços de carpete (5 cm X 5 cm) foram lavados em água corrente por 24 horas e secos em estufa. Em seguida foram embrulhados em papel alumínio e autoclavados por 15 minutos a 121 °C.

3.5 Determinação do perfil enzimático das cepas

3.5.1 Curva de expressão enzimática

Para estabelecer o tempo de incubação do fungo no meio de indução da expressão das enzimas analisadas foi preparada uma curva de expressão de queratinase e de elastase para duas amostras de fungos escolhidas entre as cepas estudadas, sendo uma de origem clínica humana e outra de origem clínica veterinária. Ambas foram processadas conforme as técnicas preconizadas para a avaliação de cada enzima.

A quantificação da enzima para cada uma das cepas foi realizada a cada sete dias de incubação no meio indutor, determinando-se o ponto de maior expressão enzimática como sendo o tempo ideal para contato do fungo com o substrato indutor para as análises seguintes. A análise e a escolha deste ponto foram obtidas após apresentação dos resultados em gráfico, obtidos em 42 dias de acompanhamento.

3.5.2 Avaliação quantitativa da atividade da queratinase

As cepas de *Microsporium gypseum* foram cultivadas em 2 mL de caldo Sabouraud dextrose (Oxoid) a 25°C por 15 dias. Após este período o micélio foi recolhido e semeado em 50 mL de meio com queratina (SIESENOP e BÖHM, 1995), como única fonte de carbono e nitrogênio, para estimular a produção da enzima queratinolítica e incubado a 25 °C na ausência de luz por período apropriado que foi estabelecido através da análise da curva de expressão enzimática.

Os sobrenadantes destas culturas foram avaliados quanto à atividade queratinolítica de acordo com a metodologia estabelecida por Viani et al. (2001). Para 1 mL do sobrenadante da cultura, obtido pela centrifugação a 1500 rpm por 15 minutos, foi adicionado 2 mL de uma solução 200 mM de Tris-HCl, CaCl₂ 100 mM pH 8,0 e 10 mg de Keratin Azure (SIGMA). O material foi incubado por 24 horas em banho-maria a 37 °C e a degradação da queratina foi quantificada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 595 nm. Um incremento de 0,01 da leitura de absorbância em relação ao controle (3 mL do mesmo tampão Tris-HCl, CaCl₂ 100 mM pH 8,0 e 10 mg de Keratin Azure) foi considerado como uma unidade de queratinase (UK) (VIANI,1999).

3.5.3 Avaliação quantitativa da atividade da elastase

As amostras foram cultivadas em meios com Elastina (SIGMA), semelhante ao item anterior. Para 2,0 mL do sobrenadante das culturas foram adicionados 2,0 mL de tampão fosfato 10 mM, pH 7,0 e 20 mg de Elastin Congo-Red (SIGMA) e o conjunto incubado a 37°C por 2 horas. A degradação da elastina foi mensurada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 495 nm. Um incremento de 0,1 em absorbância em relação ao padrão (4mL do mesmo tampão fosfato e 20 mg do substrato) foi considerado uma unidade de elastase (UE) (VIANI,2001).

3.6 Biotipagem molecular

3.6.1 Extração do DNA genômico (BIR, et al., 1995 - modificado)

Amostras de *M. gypseum* foram cultivadas em caldo Sabouraud por 14 dias a 25 °C, quando então o micélio foi transferido para um tubo Falcon estéril com capacidade de 50 mL, e congelado em nitrogênio líquido por cerca de 5 minutos. O micélio foi transferido para um gral e triturado. Neste momento foi adicionado 3,0 mL de tampão fosfato 10 mM pH 6,0 e adicionado 20 µL de solução de Quitinase (SIGMA) na concentração de 5 U/mL. O produto foi incubado em tubo Falcon por 90 minutos à temperatura de 25 °C, agitando-se várias vezes neste intervalo. Em seguida foi adicionado igual volume de tampão de lise (50 mM Tris HCL; 50 mM EDTA; 3% SDS; 1% β-mercaptoetanol, pH 7,2) e incubado a 55 °C em estufa por 60 minutos, agitando-se várias vezes. O produto foi aquecido em microondas por três vezes durante três segundos cada vez. O sobrenadante (sem resíduo) foi transferido para tubos Eppendorff e adicionado igual volume de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), agitando-se levemente por cerca de 5 minutos. A seguir, o material foi centrifugado por 5 minutos a 5000 rpm a 4 °C e a fase aquosa (sobrenadante) foi recolhida e acondicionada em tubos Eppendorff com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico, agitando-se levemente por cerca de 5 minutos. Esse material foi centrifugado novamente por 5 minutos a 5000 rpm a 4 °C, e a fase aquosa (sobrenadante) foi recolhida e acondicionada em outros tubos Eppendorff e adicionada de igual volume de álcool isopropílico. Os produtos desta etapa foram mantidos a – 20 °C *overnight*. Os produtos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4 °C, e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi lavado com etanol refrigerado (cerca de 500 µL) e centrifugado novamente por 10 minutos a 12000 rpm a 4 °C, descartando-se o sobrenadante e secando à temperatura ambiente. O produto foi suspenso em 25 µL de TE com RNase (10 µg/mL) e incubado em banho seco por 10 minutos a 37 °C. Foi realizada nova extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e finalmente o DNA foi dissolvido em água Milli-Q estéril. A concentração do DNA foi quantificada por dosagem espectrofotométrica a 260 nm de comprimento de onda, e a pureza avaliada em espectrometria a 280 nm, utilizando-se o fator 50 para transformar

absorbância em μg de DNA por mL de tampão. A qualidade do DNA foi avaliada em gel de agarose. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X com brometo de etídio e a visualização para a confirmação da extração foi feita em câmara do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta (Bio-Rad).

3.6.2 Amplificação do produto da extração pela técnica da PCR (Primer Chain Reaction)

O produto da extração foi amplificado em termociclador usando o programa de 25 ciclos (para iniciar 94°C/5 min; 94°C/1 min; 56°C/30 s; 72°C/1 min e finalizar com 72°C/5 min) com um mix de volume total de 25 μL usando-se para isso de 3 a 5 μL de DNA com os seguintes *primers*: ITS 1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS2 (5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3') e ITS 3 (5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3') e ITS 4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). A eletroforese foi realizada em 80 V por cerca de 40 minutos. A visualização do produto da amplificação foi feita na câmara do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta (Bio-Rad).

3.6.3 Digestão do DNA com enzima de restrição

Para a digestão foram preparados mix de 50 μL utilizando-se 15 μL do produto de DNA amplificado, 30 μL de H_2O MilliQ estéril, 4 μL do tampão recomendado pelo fabricante e 1 μL da enzima de restrição. A enzima utilizada foi a *MvaI*. O processo de digestão enzimática foi realizado de acordo com instruções do fabricante.

3.6.4 Análise eletroforética dos fragmentos de DNA cortados com enzimas de restrição

O gel de agarose com brometo de etídio foi preparado a 2,0% em tampão TAE 1X. As corridas eletroforéticas foram realizadas inicialmente a 90 V por 140 minutos. A visualização das bandas de DNA foi feita na câmara do equipamento GEL DOC 1000 sob iluminação de luz ultravioleta e as imagens

analisadas com auxílio do programa "Molecular Analyst™" (versão 1.4.1, Bio-Rad). Foi utilizado como padrão, o fago λ digerido com *Hind III* (Pharmacia).

3.7 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada usando-se o programa Minitab 15. Foram calculados as médias, os respectivos desvios-padrão e a mediana para as duas atividades enzimáticas. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para avaliar a diferença entre as medianas. Para avaliar o grau de relacionamento entre os dois conjuntos de resultados de atividade enzimática utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson quando os grupos apresentaram distribuição normal e o coeficiente de Spearman naqueles grupos em que a distribuição não demonstrou normalidade

4 RESULTADOS

4.1 isolamento de amostras do solo

As amostras de solo foram coletadas de 16 diferentes Estados da Federação de todas as regiões administrativas do Brasil. A maior taxa de positividade foi obtida com as amostras provenientes da região Sudeste (SE), seguidas das regiões Norte (N), Sul (S) e Centro-Oeste (CO). Na região Nordeste, nos Estados avaliados não houve isolamento de *Microsporum gypseum* (Tabela 1). O número de amostras de solo proveniente de cada região variou, assim como o percentual de positividade. No total foram analisadas 692 amostras de solo e o percentual de recuperação foi de 19,2%. Em amostras de alguns Estados não foi possível obter crescimento de *Microsporum gypseum* (Bahia, Tocantins, Maranhão, Ceará e Rio de Janeiro). Proporcionalmente o Estado de São Paulo demonstrou maior recuperação do fungo de amostras de solo, com taxa de 44,7%. O Estado de Rondônia foi aquele que contribuiu com o maior número de amostras de solo, no entanto a taxa de recuperação foi de 20,4%.

Tabela 1. Distribuição do número de amostras de solo analisadas e frequências absoluta e relativa de positividade de isolamento de *M. gypseum* por região administrativa e por Estado da Federação. São Paulo, Brasil, 2007.

Regiões	Estado da Federação	Total de amostras de solo	Número de amostras positivas	% de positividade
NE	Bahia	8	0	0
NE	Maranhão	56	0	0
NE	Ceará	11	0	0
Subtotal NE		75	0	0
N	Tocantins	4	0	0
N	Pará	34	7	20,6
N	Rondônia	201	41	20,4
Subtotal N		239	48	20,1
CO	Mato Grosso	4	1	25
CO	Mato Grosso do Sul	30	1	3,33
CO	Goiás	55	6	10,9
Subtotal CO		89	8	9,0
SE	Rio de Janeiro	15	0	0
SE	São Paulo	76	34	44,7
SE	Espírito Santo	19	5	26,3
SE	Minas Gerais	45	14	31,1
Subtotal SE		155	53	34,2
S	Rio Grande do Sul	66	14	21,2
S	Paraná	38	6	15,8
S	Santa Catarina	30	4	13,3
Subtotal S		134	24	18,0
TOTAL GERAL		692	133	19,2

NE, nordeste; N, norte; CO, Centro-Oeste; SE, Sudeste; S, Sul

4.2 Curva de expressão enzimática

Para avaliação da atividade enzimática, foram estabelecidos os períodos de incubação das amostras de *Microsporium gypseum* em meios indutores de enzimas através da curva de expressão enzimática. Os valores absolutos da absorbância espectrofotométrica para cada enzima estão apresentados na tabela 02. As figuras 01 e 02 apresentam, respectivamente, as curvas de expressão enzimática obtidas através da diferença de absorbâncias para a elastase e para a queratinase.

Tabela 2. Valores absolutos da diferença da absorbância para elastase e para queratinase em relação ao controle, amostras ICB98 e CL 25.

dias	Elastase		Queratinase	
	ICB98	CL25	ICB98	CL25
07	0,209	0,036	0,019	0,005
14	0,248	0,09	0,03	0,036
21	0,588	0,099	0,029	0,032
28	2,322	0,122	0,119	0,18
35	0,258	0,098	0,098	0,16
42	0,281	0,062	0,093	0,077

dias = dias de incubação em meio indutor de expressão enzimática; absorbância da amostra ICB198; ICB 198 e CL 25 = diferenças das absorbâncias das amostras em relação aos respectivos controles.

Figura 1. Curva de expressão da atividade enzimática (elastase) em relação ao tempo de incubação para as amostras de *Microsporium gypseum* selecionadas

Figura 2. Curva de expressão da atividade enzimática (queratinase) em relação ao tempo de incubação para as amostras de *Microsporium gypseum* selecionadas

4.3 Determinação da atividade enzimática

A avaliação das atividades elastinolítica e queratinolítica foi realizada em 138 amostras de *Microsporum gypseum*, sendo oito de isolados clínicos humanos, nove de isolados clínicos veterinários e 121 isoladas do solo. Os resultados absolutos das atividades queratinolítica e elastinolítica das 138 amostras de *M. gypseum* isoladas de diferentes fontes estão apresentados nas Tabelas 03 e 04.

Tabela 3. Distribuição absoluta e relativa da atividade queratinolítica (em UK - unidade de queratinase), de cepas de *Microsporum gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários e de amostras do solo de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.

Intervalos (UK)	Grupos						Total	
	Humano		Veterinário		Solo			
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0 a 5	3	37,5	1	11,1	61	50,4	65	47,1
5 a 10	4	50	2	22,2	44	36,3	50	36,3
10 a 15	1	12,5	5	55,6	7	5,7	13	9,4
15 a 20	0	0	1	11,1	5	4,1	6	4,4
20 a 25	0	0	0	0	1	0,83	1	0,7
25 a 30	0	0	0	0	1	0,83	1	0,7
30 a 35	0	0	0	0	1	0,83	1	0,7
40 a 45	0	0	0	0	0	0	0	0
45 a 50	0	0	0	0	0	0	0	0
> 50	0	0	0	0	1	0,83	1	0,7
Total	8	100	9	100	121	100	138	100

Tabela 4. Distribuição absoluta e relativa da atividade elastinolítica (em UE - unidade de elastase), de cepas de *Microsporium gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários e de amostras do solo de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.

Intervalos UE	Grupos						Total	
	Humano		Veterinário		Solo			
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
0 a 0,50	1	12,5	1	11,1	37	30,6	39	28,2
0,50 a 1,00	5	62,5	4	44,5	28	23,1	37	26,8
1,00 a 1,50	0	0	1	11,1	20	16,5	21	15,2
1,50 a 2,00	2	25	1	11,1	11	9,1	14	10,2
2,00 a 2,50	0	0	0	0	3	2,5	3	2,2
2,50 a 3,00	0	0	1	11,1	5	4,1	6	4,4
3,00 a 3,50	0	0	0	0	5	4,1	5	3,6
3,50 a 4,00	0	0	1	11,1	2	1,7	3	2,2
4,00 a 4,50	0	0	0	0	2	1,7	2	1,4
> 4,50	0	0	0	0	8	6,6	8	5,8
Total	8	100	9	100	121	100	138	100

As médias (Figura 03) e os respectivos desvios-padrão para as duas atividades enzimáticas (UK e UE), considerando-se todas as amostras como um único grupo, foram diferentes e apresentaram os valores de $7,11 \pm 8,12$ UK, para a atividade queratinolítica e $1,36 \pm 2,90$ UE para a atividade elastinolítica. Considerando-se cada grupo separadamente as médias das atividades queratinolíticas e elastinolíticas em amostras clínicas humanas foi de $5,71 \pm 3,28$ UK e $0,96 \pm 0,44$ UE, respectivamente. Em amostras veterinárias a média de UK foi mais alta que nos outros grupos, sendo de $11,29 \pm 4,37$ e para UE a média foi de $1,45 \pm 1,09$. No grupo composto por cepas isoladas do solo, as médias foram de $6,90 \pm 8,48$ para UK e $1,60 \pm 2,20$ para UE.

Figura 3. Média das atividades queratinolítica (UK-unidade de queratinase) e elastinolítica (UE-unidade de elastase), de cepas de *Microsporum gypseum* em relação à origem das amostras, 2007.

As medianas obtidas de cada grupo e do total de amostras avaliadas estão representadas na Tabela 05. Usando-se o teste de Kruskal-Wallis para avaliar a diferença entre as medianas de cada enzima estudada, verificou-se que para queratinase existe diferença estatística entre os valores obtidos especialmente para as amostras de origem veterinária que apresentaram maior distribuição em torno da mediana ($p < 0,05$). Para a elastase não foi verificada diferença significativa entre as medianas ($p > 0,05$).

Tabela 5. Mediana das atividades queratinolítica em UK (unidade de queratinase) e elastinolítica UE (unidade de elastase) de amostras de *Microsporium gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários, de amostras do solo e de todas as amostras de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.

Fontes	Medianas	
	UK	UE
humana	5,4	0,91
veterinária	11,3	0,98
solo	5	0,92
todas amostras	5,6	0,94

Para avaliar o grau de relacionamento entre os dois conjuntos de resultados de atividade enzimática (UK e UE) utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson quando os grupos apresentaram distribuição normal e o coeficiente de Spearman naqueles grupos em que a distribuição não demonstrou normalidade. De modo geral a correlação entre as duas atividades enzimáticas (UK e UE) foi muito fraca. O coeficiente de correlação de Spearman do total geral das amostras foi de 0,003, mostrando fraca correlação entre os dados. Entre as amostras obtidas de origem humana e do solo os coeficientes de correlação de Pearson foram de 0,075 ($p > 0,05$) e $-0,014$ ($p > 0,05$), não demonstrando correlações fortes entre as duas atividades enzimáticas nestes grupos. Nas amostras de origem veterinária foi observada uma correlação forte e negativa de $-0,762$ ($p > 0,05$).

4.4 Biotipagem molecular

Para avaliar a qualidade do produto das extrações amplificou-se a região ITS1 do rDNA e o gel de eletroforese mostrou bandas com cerca de 400 bp (Figura 04). A amplificação das regiões ITS1 e ITS2 foi realizada em reações

diferentes de PCR mostrando bandas amplificadas com pesos moleculares de 400 e 450 bp, respectivamente (Figura 05).

Figura 4. Amplificação da região ITS1 do rDNA de *Microsporum gypseum* com primers específicos ITS1 e ITS2 (λ - padrão de peso molecular; linhas 1, 2, 3, 4 e 9 - amostras clínicas veterinárias; linhas 5, 6, 7 e 8 - amostras clínicas do solo; linhas 10 e 11 - amostra clínica humana; linha 12 - controle negativo)

Figura 5. Amplificação da região ITS1 e ITS2 do rDNA de *Microsporum gypseum* com primers específicos ITS1 e ITS2 e ITS3 e ITS4, respectivamente (λ - padrão de peso molecular; linhas 1 a 4 - cepas de origem veterinária; linha 5 – controle negativo).

A restrição enzimática (RFLP) dos produtos da PCR do rDNA utilizando-se a enzima *MvaI* para a região ITS 1 não mostrou diferença entre as amostras clínicas humanas (amostra 1) e de solo de diferentes regiões geográficas. A figura 6 apresenta os produtos da restrição enzimática da região ITS1 e das duas regiões alvo amplificadas com os primers ITS1 e ITS4. Foram verificados produtos da restrição enzimática semelhantes entre todas as amostras avaliadas. A restrição enzimática apenas da região ITS1 produziu dois fragmentos com pesos moleculares com aproximadamente 100 e 200 bp. A amplificação das regiões ITS1 e ITS2 juntas mostraram até seis diferentes bandas com pesos moleculares variando de 100 a aproximadamente 650 pb.

Figura 6. Restrição enzimática (RFLP) com a enzima *MvaI* da porção ITS1 e do produto total (incluindo as regiões ITS1 e ITS2) do rDNA de *Microsporum gypseum* com *primers* específicos ITS1 e ITS2 e ITS1 e ITS4, respectivamente (λ - padrão de peso molecular; linha 1 - amostra de origem clínica humana; linhas 2 e 4 - amostras isoladas do solo de São Paulo; linha 3 - amostra isolada do solo de Rondônia; linha 5 – controle negativo).

Amostras representativas de cada grupo foram seqüenciadas e pela análise do alinhamento (Anexo 3) foram identificadas como sendo a espécie anamórfica *Microsporum gypseum* e as espécies teleomórficas *Arthroderma gypseum* e *A. incurvatum*. *A. incurvatum* foi identificada apenas em uma das amostras de origem veterinária proveniente do Estado de Rondônia e todas as outras foram identificadas como *Arthroderma gypseum*. As taxas de identidade das seqüências obtidas foram de 99% para a maioria dos exemplares avaliados.

5 DISCUSSÃO

Microsporum gypseum é isolado de fontes clínicas humanas, veterinárias ou do solo. A taxa de recuperação deste dermatófito em casos clínicos, como mostra a literatura, é bastante limitada, porém relatos de surtos e de casos extensos e refratários à terapêutica já são apresentados na literatura mundial (LACAZ, 2002).

Neste trabalho foram estudadas oito e nove amostras de *Microsporum gypseum* isolados, respectivamente, de fontes clínicas humanas e de origem veterinária e também foram avaliadas 692 amostras de solo de diferentes regiões brasileiras, obtendo-se uma taxa de recuperação de 19,2%.

Microsporum gypseum foi isolado em quase todas as regiões amostradas, exceto no Nordeste. Houve poucas coletas nos Estados que compreendem esta região (apenas três deles, num total de nove), porém alguns poucos e antigos estudos demonstram o achado de dermatófitos queratinofílicos em solos desta região (VIEIRA, 1964; LIMA, 1994).

No Nordeste, área geográfica bastante extensa e que compreende diferentes tipos de solo e de distribuição populacional, melhores estudos devem ser realizados avaliando-se amostras do solo de todos os Estados, em diferentes épocas do ano, e considerando-se as variáveis ambientais locais. para uma melhor compreensão da distribuição deste fungo nesta região.

A maioria das amostras foi coletada em ambientes urbanos e públicos (parques ou praças) em diferentes épocas do ano, aleatoriamente. A ausência de homogeneidade nas áreas amostradas e no período de coleta dificulta a comparação entre as áreas analisadas. Estudos de isolamento de fungos queratinofílicos em solos de parques são encontrados na literatura mostrando alta prevalência de *Microsporum gypseum* (PAPINI et al., 1998; RAMESH e HILDA, 1998). Quando se avaliam áreas públicas de parques e praças ou regiões de confinamento de animais (criação, corte, zoológicos), as taxas de isolamento podem ser bastante altas, diferente do que é encontrado em ambientes fechados (domésticos ou hospitalares) e alguns estudos demonstram que a recuperação deste fungo varia de acordo com o ambiente amostrado. (LONDERO e RAMOS, 1989; MERCANTINI et al., 1989; BÁRSENA-ASENSIO e CABO 1996; ULFIG et al., 2000; PERIASAMY et al., 2004; HEDAYAT et al., 2004; DESMUKH, 2004; VIDYASAGAR et al., 2005; BENTUBO et al., 2006).

Mesmo assim, neste estudo a taxa de recuperação demonstrou que *M. gypseum* é cosmopolita, o que reforça o grande potencial adaptativo deste fungo em diferentes condições, uma vez que as regiões geográficas deste estudo apresentam grande variabilidade climática, pedológica e demográfica.

A síntese e a secreção de enzimas são atividades metabólicas importantes em fungos filamentosos. Enzimas proteolíticas como as queratinases, colagenases e elastases são importantes em vários processos, tendo sido implicadas na patogênese de algumas doenças fúngicas (APODAKA e MCKERROW, 1989; VIANI et al., 2001; SCOTT e UNTEREINER, 2004; GUPTA e RAMNANI, 2006; VIANI et al., 2007).

Os produtos exocelulares com atividade enzimática podem ter um papel importante na patogênese da infecção, causando danos ao tecido do hospedeiro. Os dermatófitos podem produzir enzimas proteolíticas como já foi demonstrado em *T. mentagrophytes*, *M. canis*, e *T. rubrum*. A produção de enzimas para degradação de substratos trata-se de condição indispensável para o desenvolvimento dos fungos (ALVAREZ et al., 1986; MARCHISIO, 2000).

Várias enzimas produzidas por dermatófitos e suas atividades líticas sobre diferentes substratos já foram descritas (CHATTAWAY et al., 1963; RIPPON, 1968; YU e HARMON, 1968; APODAKA e MCKERROW, 1982; TAKIUCHI et al., 1984; LOPES-MARTINEZ et al., 1994; SIESENOP e BÖHM, 1995; SIMPANYA e BAXTER, 1996; IBRAHIM-GRANET et al., 1996; MUHSIN et al., 1997; MIGNON et al., 1998; AUBAID, 1998; HAMAGUCHI, 2000; OKAFOR e NGWOGU, 2000; VIANI et al., 2001; BROUTA, 2001). A queratinase, entre outras enzimas, foi considerada como fator de virulência e correlacionada com formas clínicas de dermatofitoses (GRAPEL e BLANK, 1972; DOS SANTOS et al., 2001; DA SILVA et al., 2005; VIANI, 2007).

Muhsin et al. (1997) demonstraram a presença de elastase em *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*, porém a atividade elastinolítica não foi observada em cepas de *M. canis*, sugerindo que as três primeiras espécies são mais virulentas.

Os dados obtidos no presente trabalho são o primeiro relato na literatura, sobre a atividade de enzimas hidrolíticas em amostras de *Microsporum gypseum* isoladas de fontes clínicas humanas, clínicas veterinárias e de

amostras do solo em que se busca observar o grau de correlação e a descrição da atividade da queratinase e da elastase em cepas isoladas de diferentes grupos, quanto à sua origem.

Os resultados do presente trabalho sugerem que as expressões da atividade destas enzimas, produzidas por *M. gypseum*, ocorrem em parasitismo (humano ou veterinário), mas também em isolados ambientais com intensidades distintas.

A quantificação da expressão enzimática pode sugerir um significativo potencial na produção da lesão clínica, como proposto em estudo prévio realizado por Viani et al. (2007) para outra espécie do gênero *Microsporum*, em pesquisa que avaliou a produção da doença em animais de laboratório .

O método utilizado para avaliar a atividade elastinolítica e queratinolítica nas cepas de *M. gypseum* analisadas permitiu estimar espectrofotometricamente a ação da queratinase e da elastase em meios de cultura contendo substratos específicos (VIANI et al., 2001; VIANI et al., 2007).

As cepas de *M. gypseum* isoladas do solo e de amostras clínicas apresentaram significativa diferença quantitativa na expressão tanto da queratinase como da elastase. As médias e as medianas obtidas foram mais altas para a atividade queratinolítica que para a atividade elastinolítica quando observados os resultados totais e também quando observados os grupos analisados, separadamente e a correlação entre as duas enzimas foi mais forte, porém negativa entre os isolados clínicos veterinários.

Entre as cepas de origem geofílica, foram analisados 121 isolados de solo, provenientes de 16 diferentes regiões geográficas do Brasil. A maior intensidade de atividade queratinolítica foi proveniente de uma destas amostras (amostra 19, com 77,7 UK). O mesmo ocorreu para a atividade elastinolítica (amostra 26, com 12,85 UE), porém a correlação neste grupo foi baixa e negativa entre as duas atividades enzimáticas avaliadas. As duas amostras altamente expressoras destas enzimas foram isoladas em solo de um parque público da cidade de São Paulo, próximo de um bebedouro para cães. A proximidade e a frequência de animais em torno da região amostrada pode ter grande quantidade de resíduos de queratina animal no solo e, assim, ter promovido a expressão das enzimas.

Estudos pormenorizados, com estes isolados que apresentaram alto grau de atividades enzimáticas e outros pouco expressores, devem ser realizados, incluindo-se a infecção experimental e avaliação do comprometimento tecidual, com o intuito de avaliar o grau de comprometimento do hospedeiro com o fungo e seus metabólitos, além de avaliação do perfil de expressão de outras enzimas hidrolíticas que possam ter papel importante na caracterização da virulência do fungo.

Em estudo prévio, realizado para avaliar quantitativamente a atividade queratinolítica e elastinolítica em cepas de *M. canis*, isoladas de animais com e sem lesão clínica, os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa, sugerindo que a elastase, assim como a queratinase, têm influência nas reações teciduais na dermatofitose (VIANI et al., 2007).

Entre os três grupos estudados não houve correlação entre as cepas com alta produção de cada uma das enzimas, sugerindo que não existe apenas uma proteinase com atividade queratinolítica ou elastinolítica e sim enzimas específicas para cada substrato. A correlação entre as atividades das duas enzimas avaliadas neste estudo foi forte e negativa apenas no grupo de *Microsporium gypseum* isolado de animais. Esta correlação negativa observada nesse grupo pode sugerir uma provável adaptação deste fungo ao parasitismo animal, o que, filogeneticamente, tem sido relatado para outros membros do grupo dos dermatófitos (SUMMERBELL, 2000; LACAZ et al., 2002).

Brouta et al. (2001) mostraram que duas proteases descritas podem exercer atividade sobre a queratina, a elastina e sobre o colágeno, sugerindo que essas duas proteases seriam responsáveis pelas atividades observadas de queratinase, elastase e colagenase.

Recentemente Baeza et al. (2007) publicaram um artigo apresentando um modelo da relação parasita-hospedeiro, entre dermatófitos, demonstrando a avaliação da expressão gênica em isolados de *Trichophyton rubrum* que cresceram em meios de cultura com e sem queratina. Posteriormente, a expressão gênica da atividade enzimática foi avaliada *in vitro* infectando queratinócitos e os resultados obtidos sugerem um mecanismo importante na avaliação desta relação e que, seguramente, pode ser adaptado e aplicado a outros dermatófitos com diferenças na atividade enzimática *in vitro* como observado em alguns isolados de *Microsporium gypseum* desta pesquisa.

Para fungos filamentosos, incluindo os dermatófitos geofílicos, a região ITS do rDNA tem sido usada na diferenciação intraespecífica enquanto o uso de microssatélites tem sido empregado em grupos de uma mesma espécie com o objetivo de caracterizar estes fungos além do *taxon* de espécie. No entanto em alguns estudos o polimorfismo de microssatélites em algumas espécies de dermatófitos altamente relacionados, mas incluídos em espécies diferentes, tem se mostrado insuficiente para distingui-los (OSHT et al., 2004; GRÄSER, et al., 2006; SUMMERBELL et al., 2007).

A diferenciação entre seis espécies do gênero *Microsporum* baseada na caracterização da região ITS do DNA foi avaliada, mostrando-se suficiente para separá-las (LEÓN-MATEOS et al., 2006) e, apesar de *Microsporum gypseum* ser espécie endêmica em diferentes regiões do mundo, poucos estudos de análise molecular têm sido realizados nesta espécie.

Métodos moleculares baseados na amplificação do DNA associados à restrição enzimática têm sido empregados para diferenciar espécies e biotipar microrganismos (GUPTA e RAMNANI, 2006; LEÓN-MATEOS et al., 2006). O uso de diferentes enzimas de restrição tem promovido resultados que, quando associados a características fenotípicas, auxiliam a identificação de isolados (JACKSON et al., 1999). O uso da enzima *MvaI* na PCR-RFLP de espécies do gênero *Microsporum* tem sido freqüentemente empregado. Sharma et al. (2006) usando a RFLP, o seqüenciamento da região ITS do rDNA e as características fenotípicas descreveram um novo *taxon*, *Microsporum appendiculatum*, altamente relacionado a *Microsporum gypseum*.

Neste estudo as amostras de *Microsporum gypseum* tiveram o rDNA amplificados. Os fragmentos com 400 e 450 pares de bases foram amplificados, correspondendo às regiões ITS1 e ITS2 do rDNA. A restrição enzimática das regiões alvo amplificadas foi semelhante em todas as amostras analisadas não demonstrando diferenças entre elas. Portanto, a biotipagem molecular não se mostrou suficiente para distingui-las. Quando avaliadas junto com o seqüenciamento, verificou-se uma alta identidade mostrando que a região ITS1 é altamente conservada nesta espécie. O seqüenciamento revelou a presença de duas espécies teleomorfas de *M. gypseum* (*Arthroderma gypseum* e *A. incurvatum*). Apesar de poucas amostras terem sido seqüenciadas, a espécie *A. incurvatum* foi identificada em apenas um dos

isolados. A obtenção da forma sexuada *in vitro* e a caracterização das espécies são muito demoradas e, na maioria das vezes, os resultados dependem de uma avaliação morfológica muito precisa. Dessa forma, os métodos moleculares de seqüenciamento têm se mostrado promissores.

Apesar da reprodução assexuada entre os dermatófitos ser muito mais freqüente que a reprodução sexuada, constituindo seu modo principal de propagação, os métodos moleculares aqui empregados ainda são limitados para caracterizar as amostras isoladas em suas diferenças e é possível que a expressão das atividades enzimáticas deva estar relacionadas a genótipos ainda não caracterizados pelas técnicas empregadas neste estudo.

Para os dermatófitos geofílicos, nos quais a forma sexuada é mais freqüente que em representantes zoofílicos e antropofílicos, a relação entre a caracterização baseada nos conceitos morfológicos e biológicos e nos conceitos moleculares parece ser mais sustentável, no entanto precisa ser melhor esclarecida, uma vez que estes fungos são encontrados como patógenos humanos e veterinários provocando manifestações clínicas distintas, às vezes severas e refratárias aos tratamentos disponíveis atualmente.

Considerando-se as variáveis morfológicas, reprodutivas, bem como as diferentes expressões fenotípicas de atividades enzimáticas em *Microsporum gypseum*, torna-se claro que a relação parasita-hospedeiro e a virulência do fungo devem ser melhores compreendidas. Um estudo mais aprofundado do genoma do fungo deve ser realizado com o objetivo de identificar regiões relacionadas à virulência e que ainda possam ser usadas na compreensão da epidemiologia da doença e de epidemiológico.

6 CONCLUSÕES

- A taxa de isolamento de *Microsporium gypseum* no solo brasileiro foi de 19,2%. Apesar de a amostragem ter sido bastante heterogênea, este índice é bastante alto quando comparado com estudos de outros países.
- Atividades enzimáticas elastinolítica e queratinolítica em amostras de *Microsporium gypseum* foram observadas, com intensidades distintas.
- A correlação entre as duas enzimas foi mais forte, porém negativa entre os isolados clínicos veterinários.
- A expressão da atividade das enzimas avaliadas em *Microsporium gypseum* sugere que elas são produzidas tanto em parasitismo quanto em saprofitismo.
- O polimorfismo de fragmentos de rDNA foi realizado com a enzima *MvaI*, porém, a restrição enzimática das regiões-alvo foram semelhantes em todas as amostras analisadas, portanto este método ou esta enzima foi ineficiente para separar clones intra-específicos.
- O sequenciamento da região ITS1 mostrou alta identidade quando comparado com as seqüências depositadas no Gene Bank, o que sugere ser uma região altamente conservada nesta espécie.
- Foram identificadas duas espécies teleomórficas através das técnicas de sequenciamento (*Arthroderma gypseum* e *Arthroderma incurvatum*).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

ABDEL-RAHMAN, S.M. Polymorphic exocellular protease expression in clinical isolates of *Trichophyton tonsurans*. **Mycopathologia**, v. 150, p. 177-200, 2000.

ALVAREZ, D.P.; LUQUE, A.G.; BRACALENTI, B.C. La influencia de factores ecológicos en el aislamiento de dermatofitos y queratinolíticos geofílicos **Rev. Lat. Amer. Microbiol.**, v.28, p.351-354, 1986.

ANBU, P.; HILDA, A.; GOPINATH, S.C. Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. **Mycopathologia**, v. 158, n. 3, p., 303-9, 2004.

ANDERSON, J.; PETSCHKE, M.; SMITH, M.L. Restriction fragments polymorphisms in biological species of *Armillaria mellea*. **Mycologia**, v. 79 p. 69-76, 1987.

APODACA, G.; MCKERROW, J.H. Purification and characterization of a 27,000 – Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. **Infect . Immun.**, v. 57, n. 10, p. 3072-3080, 1989.

AUBAID, A.H.; MUHSIN, T.M. Partial purification and kinetic studies of exocellular proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycoses**, v. 41, p. 163 -168, 1998.

BADILLET, G. Dermatophytes et immigration **Am. Biol. Clin.**, v.46, p. 37-43, 1988.

BAEZA, L.C.; BAILÃO, A.M.; BORGES, C.L.; PEREIRA, M.; SOARES, C.M.; MENDES GIANNINI, M.J. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes Infect.**, v.9, n. 12-13, p.1415-21, 2007.

BÁRSENA-ASENSIO, M.C.; CABO, J.F.G. Ecología de los dermatofitos. **Rev. Iber. Micol.**, v.13, n.2, p.47-54, 1996.

BASSANESE, M.C.; ANNES, E.; SEVERO, L.C. Microepidemia por *Trichophyton tonsurans* em internato de meninos, Porto Alegre. **R. AMIRIGS**, v. 30, n. 2, p.100-2, 1986.

BENTUBO, H.D.L.; FEDULLO, J.D.L.; CORRÊA, S.H.R.; TEIXEIRA, R.H.F.; COUTINHO, S. D. Isolation of *Microsporum gypseum* from the haircoat of healthy wild felids kept in captivity in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.37, n.2, p.148-152, 2006

BIR, N.; PALIWAL, A.; MURALIDHAR, K.; REDDY, P.; USHA-SARMA, P. A rapid method for the isolation of genomic DNA from *Aspergillus fumigatus*. **Prep. Biochem.**, v. 25, n. 4, p. 171-181, 1995.

BLANZ, P.; BUZIA, W.; GINTER, G.; GRÄSER, Y. Molekularbiologische methoden und ihre konsequenzen für taxonomie und diagnostik der dermatophyten **Mycoses**, v. 43, p. 11-16, 2000. Suppl. 1.

BOCK, M.; MAIWALD, M.; KAPPE, R.; NICKEL, P.; NÄHER, H. Polymerase chain reaction-based detection of dermatophyte DNA with a fungus-specific primer system. **Mycoses**, v. 7, p. 79-84, 1994.

BÖHME, H.; ZIEGLER, H. The distribution of geophilic dermatophytes and other keratinophilic fungi in relation to the pH of the soil. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 38, n.3, p. 247-55, 1969.

BRILHANTE, R.S.; ROCHA, M.F.; CORDEIRO, R.A.; RABENHORST, S.H.; GRANJEIRO, T.B.; MONTEIRO, A.J.; SIDRIM, J.J. Phenotypical and molecular characterization of *Microsporum canis* strains in north-east Brazil. **J. Appl. Microbiol.**, v. 99, n. 4, p. 776-82, 2005.

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETI, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C.H.; MIGNON, B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. **Med. Mycol.**, v. 39, p. 269-275, 2001.

CASTRO, R.M. Isolation of the dermatophyte *Microsporum gypseum* from samples of earth from the states of Sao Paulo and Minas Gerais (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 3, p. 78-80, 1961.

CHATTAWAY, F.W.; ELLLS, D.A.; BARLOW, E.J. A Peptidases of Dermatophytes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 41, n. 1, p. 31-37, 1963.

CHINELLI, P.A.; SOFIATTI A. A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E. Dermatophyte agents in the city of São Paulo, from 1992 to 2002. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, n. 5, p.59-63, 2003.

CHMEL, L; BUCHVALD, J. Ecology and transmission of *Microsporum gypseum* from soil to man. **Sabouraudia**, v. 8, n. 2, p. 149-56, 1970.

COSTA, E.F.; WANKE, B.; MARTINS, E.S. Micoses superficiais e cutâneas - Estudo comparativo entre duas populações. Rio de janeiro (RJ) e Aracajú (SE). **An. Bras. dermatol.**, v. 66, n. 3, p. 119-122, 1991.

COSTA, E.O.; DINIZ, L.S.; BENITES, N.R.; COUTINHO, S.D.; CARVALHO, V.M.; DUTRA, L.F.; SERRA, E.G. Interspecific outbreaks of dermatomycoses caused by *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum*. **Rev. Saude Pública**, v. 28 n. 5 p. 337-40, 1994.

COSTA, M.; PASSOS, X.S.; HASIMOTO e SOUZA, L.K.; MIRANDA, A.T.; LEMOS Jde, A.; OLIVEIRA, J.G.; SILVA, R. Epidemiology and etiology of dermatophytosis in Goiânia, GO, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35 n.1, p. 19-22, 2002.

CRIADO, P.R.; COSTA, A.R.; VASCONCELLOS, C.; RAMOS, R.O.; SILVA, C.S.; SOUZA, S.F. Tinea faciei in an infant caused by *Microsporum gypseum* simulating a dry impetigo. **Pediatr. Dermatol.**, v. 22, n. 6, p. 536-538, 2005.

DA COSTA, S. Occurrence of the fungi *Microsporium gypseum* and *Keratinomyces ajelloi* in the soils of the urban area of Curitiba (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 4, p. 378-82, 1962.

DA SILVA, B.C.; AULER, M.E.; RUIZ, L.S.; GANDRA, R.F.; DOS SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; YOSHIOKA, M.C.; CASTRO, L.G.; NUNES, R.S.; BOUCHARA, J.P.; LARCHER, G.; CHABASSE, D.; GAMBALE, W. *Trichophyton rubrum* isolated from aids and human immunodeficiency virus-infected patients in São Paulo, Brazil: antifungal susceptibility and extracellular enzyme production. **Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 21-6, 2005.

DESHMUKH, S.K.; AGRAWAL, S.C. Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soils of Jammu, India. **Mycoses**, v. 46, n. 5-6, p. 226-228, 2003.

DESHMUKH S.K.; VEREKAR, S.A. Keratinophilic fungi from the vicinity of meteorite crater soils of Lonar (India). **Mycopathologia**, v. 162, n. 4, p. 303-306, 2006.

DESHMUKH, S.K. Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from the vicinity of salt pan soils of Mumbai, India. **Mycopathologia**, v. 157, n. 3, p. 265-7, 2004.

DESHMUKH, S.K. Isolation of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soil of Mussoorie (India). **Mykosen**, v. 28, n. 2, p. 98-101, 1985.

DOS SANTOS, J.I.; VICENTE, E.J.; PAULA, C.R.; GAMBALE, W. Phenotypic characterization of *Trichophyton rubrum* isolates from two geographic locations in Brazil. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 17, n. 8, p. 729-35, 2001.

FAGGI, E.; PINI, G.; CAMPISI, E.; BERTELLINI, C.; DIFONEZO, E.; MANCIATI, F. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 9, p. 3382-3385, 2001.

FERNANDES, N.C.; AKITI, T.; BARREIROS, M.G. Dermatophytoses in children: study of 137 cases. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 43, n. 2, p. 83-5, 2001.

FERNANDES, N.C.; LAMY, F.; AKITI, T.; Da BARREIROS, M.G.C. *Microsporium gypseum* infection in AIDS patient: a case report. **An. Bras. Dermatol.**, v. 73, p. 39-41, 1998.

FISCHMAN, O.; RAMOS, C.D. Geophilic dermatophytes recovered from Rio Grande do Sul soil. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v.33, n. 2, p. 157-60, 1967.

FURTADO, M.S.S.; IHARA, L.T.; MAROJA, M.F.; JOSÉ, J.I.N.S.; CASTRILLÓN, A.L. Dermatofitoses na cidade de Manaus - AM. **An. Bras. Dermatol.**, v. 62 n.4, p.195-196, 1987.

GALHARDO, M.C.; WANK, B.; REIS, R.S.; OLIVEIRA, L.A.; VALLE, A.C. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in an AIDS patient: response to terbinafine and amorolfine. **Mycoses**, v. 47, n. 5-6, p. 238-41, 2004.

GAMBALE, W.; PAULA, C.R.; CORRÊA, B.; PURCHIO, A. Incidência de micoses superficiais em São Paulo, Capital. **An. Bras. Dermatol.**, v.62, n.4, p.191-194, 1987.

GINTER, G. Ecology, epidemiology and clinical symptomatology of *Microsporum gypseum* infections. **Mycoses**, v. 32, n. 10, p. 531-5, 1989.

GIUDICE, M.C.; SZESZS, M.W.; SCARPINI, R.L.; NINOMYIA, A.; TRIFILIO, M.O.; PINTO, W.P.; MELHEM, M.S.C. Clinical and epidemiological study in an AIDS patient case with *Microsporum gypseum* infection. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 14 n.4, p. 184-187, 1997.

GORDON, M.A.; PERRIN, U.; LITTLE, G.N. Differences in pathogenicity between *Microsporum gypseum* and *Microsporum fulvum*. **Sabouraudia**, v. 5, n. 4, p. 366-70, 1967.

GOULART, E.G.; LIMA, S.M.F.; CARVALHO, M.A.R.; OLIVEIRA, J.A.; JESUS, M.M.; CAMPOS, R.E.; COSENDEY, M.A.E. Isolamento de fungos patogênicos do solo no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil / Pathogenic fungi isolation from soil in the municipality of Rio de Janeiro, RJ, Brazil. **Folha Méd.**, v. 93, n. 1, p. 15-20, 1986.

GRAPPEL, S.F.; BLANK, F. Role of keratinase in dermatophytosis. **Dermatologica**, v. 145, p. 245-255, 1972.

GRÄSER, Y.; DE HOOG, S.; SUMMERBELL, R.C. Dermatophytes: recognizing species of clonal fungi. **Med. Mycol.**, v. 44, p. 199-209, 2006.

GUGNANI, H.C.; PALIWAL-JOSHI, A.; RAHMAN, H.; PADHYE, A.A.; SINGH, T.S.; DAS, T.K.; KHANAL, B.; BAJAJ, R.; RAO, S.; CHUKHANI, R. Occurrence of pathogenic fungi in soil of burrows of rats and of other sites in bamboo plantations in India and Nepal. **Mycoses**, v. 50, n. 6, p. 507-11, 2007.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 70 p. 21-33, 2006.

HAMAGUCHI, T.; MORISHITA, N.; USUI, R.; TAKIUCHI, I. Characterization of an extracellular keratinase from *Microsporum canis*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 41, p. 257-262, 2000.

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

HAYASHI, N.; TOSHITANI, S. Human infections with *Microsporum gypseum* in Japan. **Mykosen**, v. 26, n. 7, p. 337-45, 1983.

HEDAYAT, M.T.; MOHSENI-BANDPI, A.; MORADI, S. A survey on the pathogenic fungi in soil samples of potted plants from Sari hospitals, Iran. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, n. 1, p. 59-62, 2004.

IBRAHIM-GRANET, O.; HERNANDEZ, F.H.; CHEVRIER, G.; DUPONT, B. Expression of PZ-peptidases by cultures of several pathogenic fungi. Purification and characterization of a collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. **J. Med Vet. Mycol.**, v. 34, p. 83-90, 1996.

JACKSON, C.J.; BARTON, R.C.; EVANS, E.G. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intergenic spacer regions **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 931-936, 1999.

KANO R.; NAKAMURA, Y.; WATAKI, T.; WATANAMI, S.; TAKAHASHI, H.; TSUGIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Identification of clinical isolates *Microsporum canis* and *M. gypseum* by Random amplification polymorphic DNA (RAPD) and Southern hibridization analysis. **Med. Mycol.**, v. 41, p. 139-143, 1998.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; TAKAHASHI, H.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. Differentiation of *Microsporum* species by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and southern hybridization analyses. **Mycoses**, v. 41 p. 229-233, 1997.

KIM, J.A.; TAKISAWA, K.; FUKUSHIMA, K.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by amplified polymorphic DNA. **Mycopathologia**, v. 145, p. 1-6, 1999.

KNÖPFEL, B.; TAVITI, F.; DIFONZO, E.M. Tinea corporis caused by *Microsporum gypseum* **Hautarzt**, v. 42, n. 10, p. 652-3, 1991.

KOSIR, J.M.; MCPHERSON, J.M.; KHACHATOURIANS, G.G. Genomic analysis of a virulent and less virulent strain of the Entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, using restriction fragments length polymorphisms **Can. J. Microbiol.**, v. 37 p. 534-541, 1991.

KOTHARY, M.H.; CHASE, T.; MACMILLAN, J.D. Correlation of elastase production by strain of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice **Infect. Immun.**, v. 43, n. 1, p. 320-325, 1984.

KRAKHECKE, A.G.; AFONSO, E.; FERREIRA, J.C.; CANDIDO, R.C. In vitro susceptibility testing of *Microsporum gypseum* isolated from healthy cattle and soil samples against itraconazole, terbinafine, fluconazole and topical veterinarian drugs. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 377-80, 2005.

LACAZ C.S.; PORTO E.; MARTINS J.E.C.; HEINS-VACCARI E.M.; MELO N.T. **Tratado de Micologia Médica**. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEE, K.H.; PARK, K.K.; PARK, S.H.; LEE, J.B. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from *Microsporum canis*. **Yonsei Med. J.**, v. 28, n.2, p. 131-138, 1987.

LEON-MATEOS, A.; PAREDES-SUÁREZ, M.; PEREIRO Jr., M.; TORIBIO, J. Study of the ITS region in an atypical isolate and comparison with six species of *Microsporum*. **Mycoses**, v. 49, p. 456-456, 2006.

LIMA, E.O.; CHAVES, L.M.; OLIVEIRA, N.M. C. Isolamento de dermatófitos geofílicos da região litorânea de João Pessoa- Paraíba / Isolation of dermatophytes of tineas in the region of João Pessoa beaches. **CCS**, v.13, n. 1, p. 55-8, 1994.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Agentes de dermatofitoses humanas no interior do Estado do Rio Grande do Sul, no período de 1960-1987. **An. Bras. Dermatol.**, v.64 n.3,p. 161-164, 1989.

LONDERO, A.T. O grupo dermatófitos. **An. Bras. Dermatol.**, v. 65, n.1, p.9-10, 1990.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; BENEVENGA, J.P. Dermatofitoses humanas por *Microsporum gypseum* no interior do Rio Grande do Sul : estudo clínico. **An. Bras. Dermatol.**, v. 67, n. 2, p. 71-72, 1992.

LÓPES-MARTINEZ, R.; MANZANO-GAYOSSO, P.; MIER, T.; MENDEZ-TOVAR, L.J.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F. Exoenzimas de dermatófitos aislados de tiñas agudas y crônicas. **Rev. Latinoam. Microbiol.**, v. 36, p. 17-20, 1994.

LUPAN, D.M.; NZIRAMASANGA, P. Collagenolytic Activity of *Coccidioides immitis*. **Infect. Immun.**, v. 51, n. 1, p. 360-361, 1986.

LUQUE, A.G.; BIASOLI, M.S.; ORTINO, M.A.; LUPO, S.H.; BUSSY, R.F. Atypical tinea corporis caused by *Microsporum gypseum* in a subject with acquired immune deficiency syndrome. **JEADV**, v. 15 p. 374-375, 2001

MACHADO, A.P.; HIRATA, S.H.; OGAWA, M.M.; TOMIMORI-YAMASHITA, J.; FISCHMAN, O. Dermatophytosis on the eyelid caused by *Microsporum gypseum*. **Mycoses**, v. 8, n. 1, p. 73-75, 2005.

MAKIMURA, K.; TAMURA, Y.; MOCHISUKI, T.; HASEGAWA, A.; TAJIRI, Y.; HANASAWA, R.; UCHIDA, K.; SAITO, H.; YAMAGUCHI, H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strain based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. **J. Clin. Microbiol.**, v. 37, p. 920-24, 1999.

MARCHISIO, V.F. Keratinophilic fungi: their role in nature and degradation of keratinic substrates In: Kushwaha RKS, Guarro J, ed. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi Biology. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 87-92, 2000.

MATSUMOTO, T. AJELLO, L. Current taxonomic concepts pertaining to the dermatophytes and related fungi. **Int. J. Dermatol.**, v.26, p.491-499, 1987.

McGINNIS, M.R. Recente taxonomic developments and changes in medical mycology. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 34, p. 109-135, 1980.

MERCANTINI, R.; MARSELLA, R.; CERVELLATI, M.C. Keratinophylic fungi isolated from Antarctic soil. **Mycopathologia**, v. 106, p. 47-52, 1989.

MEZZARI, A. Frequency of dermatophytes in the metropolitan area of Porto Alegre, RS, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 40, n. 2, p.71-76, 1998.

MIGNON, B.R.; NIKKLES, A.F.; PIÉRARD, G.E.; LOSSON, B.J. The in vitro and in vivo production of a 31.5 kDa keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats. **Dermatology**, v. 196, p. 438-441, 1998.

MOODY, S.F.; TYLER, B.M. Restriction enzyme analysis of Mitochondrial DNA of the *Aspergillus flavus* group : *A. flavus*, *A. parastictus* and *A. nomius*. **App. Env. Microbiol.**, v. 56, n. 8, p. 2441-2452, 1990.

MORAES, M.S.; GODOY-MARTÍNEZ, P.; ALCHORNE, M.M.; BOATTO, H.F.; FISCHMAN, O. Incidence of Tinea capitis in São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v.62, n.2, p.91-5, 2006.

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

MUHSIN, T.M.; SALIH, T.H. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. **Mycopathologia**, v. 150, n. 2, p. 49-52, 2001.

OKAFOR, J.; NGWOGU, A. Keratinolytic activity of five human isolates of dermatophytes. **J. Commun. Dis.**, v. 32, n. 4, p. 300-305, 2000.

OKEKE, C.N.; MÜLLER, J. Production of extracellular collagenolytic proteinases by *Histoplasma capsulatum* var. *duboisii* and *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in the yeast phase. **Mycoses**, v. 34, p. 453-460, 1991.

ONSBURG, P. Human infections with *Microsporum gypseum* in Denmark. **Br. J. Dermatol.**, v. 99, n. 5, p. 527-30, 1978.

OSHT, T. et al. Origins of microsatellite diversity in the *Trichophyton rubrum*-*T. violaceum* clade (dermatophytes). **J. Clin. Microbiol.**, v. 168, p. 1231-1248, 2004.

OYEKA, C.A.; OKOLI, I. Isolation of dermatophytes and non-dermatophytic fungi from soil in Nigeria. **Mycoses**, v. 46, n. 8, p. 336-8, 2003.

PAPINI, R.; MANCIANTI, F.; GRASSOTTI, G.; CARDINI, G. Survey of keratinophilic fungi isolated from city park soils of Pisa, Italy. **Mycopathologia**, v.143, n.1, p.17-23, 1998.

PERIASAMY, A.; HILDA, A.; GOPINATH, S.C.B. Keratinophilic fungi of poultry farm and feather dumping soil in Tamil Nadu, India. **Mycopathologia**, v. 158, p. 303-309, 2004.

PONTES, Z.B.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, N.M.; Dos SANTOS, J.P.; RAMOS, A.L.; CARVALHO, M.F. Onychomycosis in João Pessoa City, Brazil. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.34, n. 2, p.95-9, 2002.

PORRO, A.M.; YOSHIOKA, M.C.; KAMINSKI, S.K.; PALMEIRA, C.; FISCHMAN, O.; ALCHORNE, M.M. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Mycopathologia**, v. 137, n. 1, p. 9-12, 1997.

PROCHNAU, A.; de ALMEIDA, H.L.; SOUZA, P.R.; VETORATTO, G.; DUQUIA, R.P.; DEFFERRARI, R. Scutular tinea of the scrotum: report of two cases. **Mycoses**, v. 48, n. 3, p. 162-4, 2005.

RAMESH, V.M.; HILDA, A. Incidence of keratinophilic fungi in the soil of primary schools and public parks of Madras City, India. **Mycopathologia**, v.143, n.3, p.139-45, 1998.

REIS, C.M.S.; GASPAR, A.P.A.; GASPAR, N.K.; LEITE, R.M.S. Estudo da flora dermatofítica na população do Distrito Federal. **An. Bras. Dermatol.**, v. 67, n.3, p. 103-111, 1992.

RIPPON, J.W. Elastase production by ringworm fungi. **Science**, v. 1967, p. 157- 947, 1967.

RIPPON, J. W. **Medical Mycology**. New York: W. B. Saunders, 1988.

RIPPON, J.W.; VARADI, D.P. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. **J. Invest. Dermatol.**, v. 50, n. 1, p. 54-58, 1968.

SANTOS, J. I.; NEGRI, C.M.; WAGNER, D.C.; PHILIPI, R.; NAPPI, B.P.; COELHO, M. P. Some aspects of dermatophytoses seen at University Hospital in Florianopolis, Santa Catarina, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 39, n. 3, p.137-40, 1997.

SCHMIDT, K.T.; RIPPON, J.W. Inflammatory tinea capitis caused by *Microsporum gypseum* in a five-year-old girl. **Cutis**, v. 48, n. 5, p.371-4, 1991.

SCOTT, J.A.; UNTEREINER, W.A. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. **Med. Mycol.**, v. 42, p. 239-246, 2004.

SEVERO, L. C.; CONCI, L.M.A.; AMARAL, A.A. *Microsporum gypseum* - relato de surto de infecção e isolamento do solo. **An. Bras. Dermatol.**, v. 64, n. 2, p. 119-120, 1989.

SHARMA R.; PRESBER, W.; RAJAK, R.C.; GRÄSER, Y. Molecular detection of *Microsporum persicolor* in soil suggesting widespread dispersal in central India. **Med. Mycol.**, v. 46, n. 1, p. 67-73, 2008.

SHARMA, R.; RAJAK, R.C.; PANDEY, A.K.; GRÄSER, Y. Internal Transcribed Spacer (ITS) of rDNA of appendaged and non-appendaged strains of *Microsporum gypseum* reveals *Microsporum appendiculatum* as its synonym. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 89, n. 1, p. 197-202, 2006.

SHIN, J.H.; SUNG, J.H.; PARK, S.J.; KIM, J.A.; LEE, J.H. LEE, D.Y.; LEE, E.S.; YANG, J.M. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi using polymerase chain reaction amplification and restriction enzyme analysis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 48, n. 6, p. 857-865, 2003.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIERRA DE ARROYAVE, B.; YEPES, A.; ARENAS, J.; SANTAMARÍA DE URIBE, L.; RESTREPO, A. Epidemic outbreak of tinea corporis due to *Microsporum gypseum* **Mycopathologia**, v. 60 n.3, p. 135-8, 1977.

SIESENOP, U.; BÖHM, K. H. Comparative studies on keratinase production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. **Mycoses**, v. 38, p. 205-209, 1995.

SIMPANYA, M.F.; BAXTER, M. Multiple proteinases from two *Microsporum* species. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 34, p. 31-36, 1996.

SIMPANYA, M.F. Dermatophytes: their taxonomy, ecology and pathogenicity In: KUSHWAHA, R.K.S.; GUARRO, J, ed. Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi Biology. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, 2000, p. 1-12.

SIQUEIRA, E.R.; FERREIRA, J.C.; MAFFEI, C.M.; CANDIDO, R.C. Occurrence of dermatophyte, in nails, feet and hands of university students. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.3, p.269-71, 2006.

SUMMERBEL, R.C.; MOORE, M.K.; STARINK-WILLEMSE, M.; VAN IPEREN, A. ITS barcodes for *Trichophyton tonsurans* and *T. equinum*. **Med. Mycol.**, v. 45, p. 193-200, 2007.

SUMMERBELL, R.C. Form and function in the evolution of dermatophytes In: KUSHWAHA, R.K.S.; GUARRO, J. (Ed.). Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi Biology. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 17, p. 30-43, 2000.

TAKIUCHI, I.; YOUSHIHIRO, S.; HISAE, T.; MAKOTO, N. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporium canis*. **Sabouraudia**, v. 22 n. 3, p. 219 – 224, 1984.

TAKIUCHI, I.; HIGUCHI, D.; SEI, Y.; KOGA, M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporium canis*. **Sabouraudia**, v. 20 p. 281-288, 1982.

ULFIG, K.; PŁAZA, G.; TERAŁOWSKI, M.; JANDA-ULFIG, K. Sewage sludge open-air drying affects on keratinolytic, keratinophilic and actidione-resistant fungi. **Rocz. Panstw. Zakł. Hig.**, v. 57, n. 4, p. 371-9, 2006.

ULFIG, K.; PLAZA, G.; SZTYLER, A.; BRONDER, J.; TERAŁOWSKI, M.; GUARRO, J. General assessment of the influence of a municipal landfill site and environmental factors on the occurrence of keratinolytic fungi in soil. **Rocz. Panstw. Zakł. Hig.**, v. 51, n 2, p. 167-81, 2000.

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

VIANI, F.C.; VIANI, P.R.C.; RIVERA, I.N.G.; SILVA, E.G.; PAULA, C.R.; GAMBALE, W. Extracellular proteolytic activity and molecular analysis of *Microsporium canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 24, n. 1, p. 19-23, 2007.

VICENT, R.D.; GOEWERT, R.; GOLDMAN, W.E. Classification of *Histoplasma capsulatum* isolates by restriction fragments polymorphisms **J. Bacteriol.**, v. 165, p. 813-818, 1986.

VIEIRA, R.J. Obtenção de *Microsporium gypseum* do solo do Recife (Brasil) e novo assinalamento de *Trichophyton mentagrophytes*, dessa mesma origem. **An. Bras. Dermatol.**, v. 39, n.3, p. 15-22, 1964.

VIDYASAGAR, G.M.; NARAYAN H.; SHIVKUMAR, D. Keratinophilic fungi isolated from hospital dust and soils of public places at Gulbarga, India. **Mycopathologia**, v. 159, p. 13–21, 2005.

VILELA, E.M.; MORAES, M.A. Isolation of *Microsporium gypseum* and *Trichophyton mentagrophytes* from soil of the city of Manaus, Amazonas (Brazil). **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 4, p. 299-301, 1962.

WANKE, N.C.; MONTEIRO, P.C.F.; WANKE, B.; NOGUEIRA, C.M.; PEREZ, M.A. Dermatofitoses no Rio de Janeiro - Estudo dos fatores de risco em população adulta. **An. Bras. Dermatol.**, v. 66, n.4, p.171-174, 1991.

WEARY, P.E.; CANBY, C.M.; CAWLEY, E.P. Keratinolytic Activity of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. **J. Invest. Dermatol.**, v. 44, n. 5, p. 300-307, 1965.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R.C. The Dermatophytes **Clin. Microb. Rev.**, v.8, n. 2, p. 240-259, 1995.

WEITZMAN, I.; MCGINNIS, R.C.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. The genus *Arthroderma* and its later synonym *Nannizia*. **Mycotaxon**, v.25, p. 505-518, 1986.

YU, J.; WAN, Z.; CHEN, W.; WANG, W.; Li, R. Molecular typing study of the *Microsporum* strain isolated from an outbreak of tinea capitis in a school. **Mycophatologia**, v. 157, n. 1, p. 37-41, 2004.

YU, R.J.; HARMON, S.R. Isolation and purification of na extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Bacteriol.**, v. 96, n. 4, p. 1435-1436, 1968.

YU, R.J.; HARMON, S.R.; GRAPPEL, S.F.; BLANK, F. Two Cell-Bound Keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. **J. Invest. Dermatol.**, v. 56, n. 1, p. 27-32, 1971.

ANEXOS

Anexo A – Identificação, descrição do local de coleta e resultado dos isolamentos das amostras de solo nos diferentes Estados da Federação.

amostras de solo coletadas no Estado da Bahia

id	localidade	data	resultado
588 BA	Salvador Parque de Diversão	18/9/2005	negativo
589 BA	Salvador Jardim Residencial	12/9/2005	negativo
590 BA	Salvador Jardim Residencial	15/9/2005	negativo
591 BA	Mata de São João Areia Praia do Forte	12/9/2005	negativo
592 BA	Salvador Canteiro de Rua	11/9/2005	negativo
593 BA	Salvador Canteiro do Parque de Diversão	18/9/2005	negativo
594 BA	Cairu 2º Praia Morro de São Paulo, Ilha de Tinhare-Praia Movimentada	14/9/2005	negativo
595 BA	Cairu Ilha de Boiteba - Prainha (Restaurantes)	14/9/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Tocantins

id	localidade	data	resultado
556TO	Aguiarnópolis - coleta I	15/11/2005	negativo
557TO	Aguiarnópolis - coleta II	15/11/2005	negativo
558 TO	Aguiarnópolis	15/11/2005	negativo
559 TO	Aguiarnópolis	15/11/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Maranhão

id	localidade	data	resultado
528MA	Imperatriz - Praça de Fátima I	17/11/2005	negativo
529MA	Imperatriz - Praça de Fátima II	17/11/2005	negativo
530MA	Imperatriz - Terreno da Rua Alagoas, 192 coleta I	18/11/2005	negativo
531MA	Imperatriz - Terreno da Rua Alagoas, 192 coleta II	18/11/2005	negativo
532MA	imperatriz - Rua Tamandaré	18/11/2005	negativo
533MA	imperatriz - Rua Tamandaré 969 - rodoviária	18/11/2005	negativo
534MA	Imperatriz - Rua Pará esq. Rua João Lisboa - coleta I	18/11/2005	negativo
535MA	Imperatriz - Rua Pará esq. Rua João Lisboa - coleta II	18/11/2005	negativo
536MA	Imperatriz - Av. Dorgival, 313	16/11/2005	negativo
537MA	Imperatriz - Praça Brasil coleta I	17/11/2005	negativo
538MA	Imperatriz - Praça Brasil coleta II	17/11/2005	negativo
539MA	Imperatriz - Rua Luis Domingues, 906	17/11/2005	negativo
540MA	Imperatriz - Praça Tereza Cristina, 113 - coleta I	17/11/2005	negativo
541MA	Imperatriz - Praça Tereza Cristina, 113 - coleta II	17/11/2005	negativo
542MA	Imperatriz - Beira do Rio Tocantins - coleta I	17/11/2005	negativo
543MA	Imperatriz - Beira do Rio Tocantins - coleta II	17/11/2005	negativo
544MA	Imperatriz N/I	20/11/2005	negativo
545MA	Imperatriz N/I	20/11/2005	negativo
546MA	Pedra Caída - Carolina - coleta I	15/11/2005	negativo
547MA	Pedra Caída - Carolina - coleta II	15/11/2005	negativo
548MA	Pedra Caída - Carolina - coleta III	15/11/2005	negativo
549MA	Campestre - coleta I	15/11/2005	negativo

550MA	Campestre - coleta II	15/11/2005	negativo
551MA	Açalândia - coleta I	17/11/2005	negativo
552MA	Açalândia - coleta II	17/11/2005	negativo
553MA	Estreito - coleta I	15/11/2005	negativo
554MA	Estreito - coleta II	15/11/2005	negativo
555MA	Estreito - coleta III	15/11/2005	negativo
560MA	Estreito	15/11/2005	negativo
561MA	Estreito	15/11/2005	negativo
562MA	Estreito	15/11/2005	negativo
563MA	Açailândia	17/11/2005	negativo
564MA	Açailândia	17/11/2005	negativo
565MA	Campestre	15/11/2005	negativo
566MA	Campestre	15/11/2005	negativo
567MA	Pedra Caída Carolina	15/11/2005	negativo
568MA	Pedra Caída Carolina	15/11/2005	negativo
569MA	Pedra Caída Carolina	15/11/2005	negativo
570MA	Imperatriz R. Alagoas,192	18/11/2005	negativo
571MA	Imperatriz R. Alagoas,192	18/11/2005	negativo
572MA	Imperatriz R.Pará (terreno João Lisboa)	18/11/2005	negativo
573MA	Imperatriz R. Pará	18/11/2005	negativo
574MA	Imperatriz Beira Rio Tocantins	17/11/2005	negativo
575MA	Imperatriz Beira Rio Tocantins	17/11/2005	negativo
576MA	Imperatriz R. Luiz Domingues,906	17/11/2005	negativo
577MA	Imperatriz Av. Dorjival,313	16/11/2005	negativo
578MA	Imperatriz R. Teresa Cristina,13 Praça	17/11/2005	negativo
579MA	Imperatriz R. Teresa Cristina,13 Praça	17/11/2005	negativo
580MA	Imperatriz R. Tamandaré,969 Rodoviária	18/11/2005	negativo
581MA	Imperatriz R. Tamandaré	18/11/2005	negativo
582MA	Imperatriz Pça Brasil	17/11/2005	negativo
583MA	Imperatriz Pça Brasil	17/11/2005	negativo
584MA	Imperatriz Pça de Fátima	17/11/2005	negativo
585MA	Imperatriz Pça de Fátima	17/11/2005	negativo
586MA	Imperatriz	20/11/2005	negativo
587MA	Imperatriz	20/11/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Mato Grosso

id	localidade	data	resultado
102MT	Sinop - Jardim de casa	13/2/2005	negativo
103MT	Sinop - Aterro - centro da cidade	13/2/2005	negativo
104MT	Sinop - Centro I	13/2/2005	<i>M gypseum</i>
105MT	Sinop - Centro II	13/2/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Mato Grosso do Sul

id	localidade	data	resultado
205MS	Dourados	n/i	negativo
421MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 200 m	n/i	negativo
422MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 300 m	n/i	negativo
423MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 400 m	n/i	negativo
424MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 500 m Praça com estátua de Harry Amorim Costa - coletado atrás do banco	n/i	negativo
425MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 600 m próximo ao Museu Dom Bosco	n/i	negativo
426MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 700 m	n/i	negativo
427MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 800 m - Placa do Pomar de Plantas frutíferas	n/i	negativo
428MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 900 m	n/i	negativo
429MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1000 m	n/i	negativo
430MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1100 m - próximo ao centro de equoterapia da Polícia Militar do MS	n/i	negativo
431MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1200 m		negativo
432MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1300 m	n/i	negativo
433MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1400 m	n/i	negativo
434MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1500 m	n/i	negativo
435MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1600 m Placa do Bosque Progeama Elo - Árvores nativas e frutíferas do cerrado	n/i	Negativo
436MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1700 m - grupo de escoteiros Pde. Heitor Castoldi	n/i	Negativo
437MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1800 m	n/i	Negativo
438MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 1900 m - Clube YOTEDY - Placa do pomar de frutíferas do cerrado	n/i	Negativo
439MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 2000	n/i	Negativo
440MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande -Playground, perto do gira-gira (próximo à entrada do Portal Kadiwuel	n/i	negativo
441MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 2200 m - placa do bosque de madeiras nobres	n/i	negativo
442MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 2300 m	n/i	negativo
443MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 2400 m	n/i	negativo
444MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 2400 m - coleta realizada na beira do lago perto de um bambuzal	n/i	negativo
445MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande Playground sob o balanço próximo ao lago (entrada do Portal Kaiowa)	n/i	negativo
446MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande Playground ao lado do escorregador próximo ao lago (entrada do Portal Kaiowa)	n/i	negativo
447MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande próximo a um manguezal (portal Kaiowa)	n/i	negativo
448MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 3800 m	n/i	negativo
449MS	Parque das Nações Indígenas - Campo Grande demarcação 4000 m	n/i	<i>M. gypseum</i>

n/i - não informado

amostras de solo coletadas no Estado do Ceará

id	localidade	data	resultado
324CE	Lagoa almicegas - cajuzais e mangueirais	24/8/2005	negativo

325CE	Porto das Dunas - Beach Park	22/8/2005	negativo
326CE	Cumbuca - município Caucaia	23/8/2005	negativo
327CE	Praia Cumbuca - Caucaia - Lagoa Parnamirim (dunas)	23/8/2005	negativo
328CE	Praia Mucuripe (Fortaleza) - colônia de pescadores	25/8/2005	negativo
329CE	Canoa Quebrada	25/8/2005	negativo
330CE	Canoa Quebrada (Falésias)	25/8/2005	negativo
331CE	Canoa Quabrada (lagoa entre dunas)	25/8/2005	negativo
332CE	Praça dos Mártires - Fortaleza	25/8/2005	negativo
333CE	Praia Meireles (impr. Banho) Fortaleza	26/8/2005	negativo
334CE	Praia Fonte - formações rochosas - Beberibe	27/8/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Rio Grande do Sul

id	localidade	data	Resultado
206RS	RS01	n/i	<i>M. gypseum</i>
207RS	RS02	n/i	<i>Keratinomyces</i>
208RS	RS03	n/i	negativo
209RS	RS04	n/i	<i>M. gypseum</i>
210RS	RS05	n/i	<i>M. gypseum</i>
211RS	RS06	n/i	<i>M. gypseum</i>
212RS	RS07	n/i	<i>M. gypseum</i>
213RS	RS08	n/i	<i>M. gypseum</i>
214RS	RS09	n/i	<i>M. gypseum</i>
215RS	RS10	n/i	<i>M. gypseum</i>
216RS	RS11	n/i	<i>M. gypseum</i>
217RS	RS12	n/i	negativo
218RS	RS13	n/i	negativo
219RS	RS14	n/i	<i>Keratinomyces</i>
220RS	RS15	n/i	negativo
221RS	RS16	n/i	negativo
222RS	RS17	n/i	negativo
223RS	RS18	n/i	<i>M. gypseum</i>
224RS	RS19	n/i	negativo
225RS	RS20	n/i	negativo
254RS	BG (1)	13/7/2005	negativo
255RS	BG (2)	13/7/2005	negativo
256RS	BG (3)	13/7/2005	<i>M. gypseum</i>
257RS	BG (4)	13/7/2005	negativo
258RS	BG (5)	13/7/2005	negativo
259RS	BG (6)	14/7/2005	negativo
260RS	BG (7)	14/7/2005	negativo
261RS	BG (8)	14/7/2005	negativo
262RS	BG (9)	14/7/2005	negativo
263RS	BG (10)	14/7/2005	negativo
264RS	BG (11) Casa velha	15/7/2005	negativo
265RS	BG 12 Casa ovelha	15/7/2005	<i>M. gypseum</i>

266RS	BG (13) Casa família I	15/7/2005	negativo
267RS	BG (14) Casa família II	15/7/2005	negativo
268RS	BG 15 Quadrilho	15/7/2005	negativo
269RS	BG (16)	15/7/2005	negativo
270RS	GAR (17)	15/7/2005	negativo
271RS	MB (18)	16/7/2005	negativo
272RS	MB (19)	16/7/2005	negativo
273RS	Canteiro OS (20)	17/7/2005	negativo
274RS	Cambará PM (21)	17/7/2005	negativo
275RS	Cambará PM (22)	17/7/2005	negativo
276RS	Aparados (23)	17/7/2005	negativo
277RS	Aparados (23)	17/7/2005	negativo
278RS	Aparados (25)	17/7/2005	negativo
279RS	Aparados (26)	17/7/2005	negativo
280RS	Cambará (27)	18/7/2005	negativo
281RS	n/i (28)	18/7/2005	negativo
282RS	n/i (29)	18/7/2005	negativo
283RS	n/i (30)	18/7/2005	negativo
284RS	n/i (31)	18/7/2005	negativo
285RS	n/i (32)	18/7/2005	negativo
510RS	n/i (21)	n/i	negativo
511RS	n/i (22)	n/i	negativo
512RS	n/i (23)	n/i	negativo
513RS	n/i (24)	n/i	negativo
514RS	n/i (25)	n/i	<i>M gypseum</i>
515RS	n/i (26)	n/i	<i>M gypseum</i>
516RS	n/i (27)	n/i	negativo
517RS	n/i (28)	n/i	negativo
518RS	n/i (29)	n/i	negativo
519RS	n/i (30)	n/i	negativo
520RS	n/i (31)	n/i	negativo
521RS	n/i (32)	n/i	negativo
522RS	n/i (33)	n/i	negativo
523RS	n/i (34)	n/i	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Pará

id	localidade	data	resultado
146PA	PAAR (invasão Ananindeua)	n/i	negativo
147PA	Rua Soares Carneiro (telégrafo)	n/i	<i>M gypseum</i>
148PA	Baia do Sol (Mosqueiro)	n/i	<i>M gypseum</i>
149PA	Praia do Marahu (Mosqueiro)	n/i	negativo
150PA	Igarapé do Caruara (Mosqueiro)	n/i	negativo
151PA	Marahu (Nossa Casa)	n/i	negativo
152PA	Cidade Nova III (Ananindeua)	n/i	<i>M gypseum</i>
153PA	Hospital Beneficente Portuguesa (Umarizal)	n/i	<i>M gypseum</i>
154PA	Praça Brasil (telégrafo)	n/i	negativo

155PA	Ver'-o- Rio	n/i	negativo
156PA	Baía do Guajara (reduto)	n/i	negativo
157PA	Praça Eneida de Moraes (Pedreira)	n/i	negativo
158PA	Bernal do Couto (Umarizal)	n/i	negativo
159PA	Residencial Guar (S. Brs)	n/i	negativo
160PA	Av. Pedro Alvares Cabral (reduto)	n/i	negativo
161PA	no identificado o local	n/i	negativo
162PA	Rua Carlos Drumond Andrade (Marambaia)	n/i	negativo
163PA	Conjunto Marex (Val de Cans)	n/i	negativo
164PA	Rodovia do Trabalhador	n/i	negativo
165PA	Invaso do Curuamb (Ananindeua)	n/i	negativo
166PA	Passagem Mucaj (Sacramento)	n/i	negativo
167PA	Canal gua Cristal (Marambaia)	n/i	negativo
168PA	Passagem Samarina (guan)	n/i	negativo
169PA	Aeroporto (rea de cargas)	n/i	negativo
170PA	Cidade Nova VI (Ananindeua)	n/i	negativo
171PA	Conjunto Guajar (Ananindeua)	n/i	negativo
172PA	Vila de Marituba	n/i	<i>M gypseum</i>
173PA	Cidade Nova V (Ananindeua)	n/i	<i>M gypseum</i>
174PA	Rodovia Mrio Covas	n/i	negativo
175PA	Conjunto do Aura (Ananindeua)	n/i	<i>M gypseum</i>
524PA	Soure - Rua 5	n/i	negativo
525PA	Soure - Rua 4 - centro	n/i	negativo
526PA	Salvaterra - Pousada dos Guars - Praia Grande	n/i	negativo
527PA	Salvaterra Rua 5 - centro	n/i	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Rio de Janeiro

id	localidade	data	resultado
78RJ	Paraty - Trindade - Caixadao - trilha	5/1/2004	negativo
79RJ	Paraty - Trindade - Caixadao - praia	5/1/2004	negativo
80RJ	Paraty - Parati - mirim - praia	6/1/2004	negativo
81RJ	Paraty - cidade - calada	9/1/2004	negativo
110RJ	Ciclova	n/i	negativo
111RJ	Embrapa	n/i	negativo
112RJ	Pesagro	n/i	negativo
113RJ	Projeto de sanidade animal	n/i	negativo
229RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Rancho 1 - Parati	24/7/2005	negativo
230RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Rancho 2 - Parati	24/7/2005	negativo
231RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Rancho 3 - Parati	24/7/2005	negativo
232RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Rancho 4 - Parati	24/7/2005	negativo
233RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Meio 1 - Parati	24/7/2005	negativo
234RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Meio 2 - Parati	24/7/2005	negativo
235RJ	Rio de Janeiro - Trindade - Praia do Meio 3 - Parati	24/7/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado de Rondônia

id	localidade	data	resultado
23RO	Boteco Borracharia	n/i	negativo
24RO	Igreja 2	n/i	negativo
25RO	Lavador - Francisco Prestes	n/i	negativo
26RO	Oficina Negão Moleiro	n/i	negativo
27RO	Casa do Prof. Ernei	n/i	<i>M gypseum</i>
28RO	Grêmio Grusp	n/i	<i>M gypseum</i>
29RO	Brazão	n/i	negativo
30RO	Rua Francisco Prestes - Baby Saulo	n/i	negativo
31RO	Henrique	n/i	negativo
32RO	Igreja 1	n/i	negativo
33RO	Chácara na Estrada LC 25	n/i	negativo
34RO	Cacatua Landres - Escola Maria de Abreu Bianco	n/i	negativo
35RO	Escola Maria de Abreu Bianco	n/i	negativo
36RO	Bailão JC	n/i	negativo
37RO	Bar do Tigrão	n/i	negativo
38RO	Bar do Pedro	n/i	negativo
39RO	Cafeeiro do Zezinho Barroso	n/i	negativo
40RO	Padaria do Ivo	n/i	negativo
41RO	Cemitério	n/i	negativo
42RO	Escola Marcos Vinícius - orelhão	n/i	negativo
43RO	Máquina - LC 25 Setor Novo	n/i	negativo
44RO	Cibrazem	n/i	<i>M gypseum</i>
45RO	Oficina do Ronaldo - Auto Peças	n/i	<i>M gypseum</i>
46RO	Máquina Flor Goiana	n/i	<i>M gypseum</i>
47RO	Restaurante Mangueira	n/i	negativo
48RO	Banheiro Público	n/i	negativo
49RO	Cafeeira Amazonas	n/i	negativo
50RO	Cafeeira João Barroso	n/i	negativo
51RO	Bar Santo Antônio (frente - Baixinho)	n/i	negativo
52RO	Máquina Andorinha	n/i	negativo
53RO	Casa do Luís Marcelo	n/i	<i>M gypseum</i>
176RO	Frente ao alojamento USP	n/i	negativo
177RO	Praça Igreja	n/i	negativo
178RO	Praça Igreja	n/i	negativo
179RO	Cabeça	n/i	<i>M gypseum</i>
180RO	Av. Frente Clínica odontológica	n/i	negativo
181RO	Av. Feira 2	n/i	negativo
182RO	Cabeça	n/i	<i>M gypseum</i>
183RO	Praça Igreja	n/i	negativo
184RO	Av. Ajardinada 1	n/i	negativo
185RO	Paraíso	n/i	negativo
186RO	Paraíso	n/i	negativo
187RO	N/I	n/i	negativo

188RO	N/I	n/i	negativo
189RO	Frente CEPEM	n/i	<i>M gypseum</i>
190RO	Periferia Mata 3	n/i	negativo
191RO	Periferia Mata 1	n/i	negativo
192RO	Periferia Mata 2	n/i	negativo
193RO	Av. feira 1	n/i	negativo
194RO	Av. 1 rua CEPEM	n/i	negativo
195RO	Av. 1 rua CEPEM	n/i	negativo
196RO	Rua perpendicular CEPEM clínica 2	n/i	negativo
197RO	Cabeça	n/i	negativo
198RO	Av. CEPEM x Av. 2	n/i	negativo
199RO	Rua Paralerla CEPEM Av 2	n/i	negativo
200RO	Av. Ajardinada 2	n/i	negativo
201RO	Rua Perpendicular CEPEM clínica 1	n/i	negativo
202RO	Praça Igreja	n/i	negativo
203RO	Rua Paralerla CEPEM Av 1	n/i	negativo
204RO	Av Ajardinada 3	n/i	negativo
236RO	Fazenda Izidório	13/7/2005	negativo
237RO	Sítio Sr. José	13/7/2005	negativo
345RO	SEMUSA - V. São Carlos	18/7/2005	negativo
346RO	SEMUSA - V. São Carlos	18/7/2005	negativo
347RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
348RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
349RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
350RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
351RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	negativo
352RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
353RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	negativo
354RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
355RO	Nazaré (S08°09979W1063°19189)	19/7/2005	negativo
356RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
357RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
358RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	negativo
359RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	negativo
360RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
361RO	Aliança - Rondônia	19/7/2005	negativo
362RO	Pimenteiras - Rondônia	19/7/2005	negativo
363RO	Pimenteiras - Rondônia	19/7/2005	<i>M gypseum</i>
364RO	Pimenteiras - Rondônia	23/8/2005	negativo
365RO	Pimenteiras - Rondônia	23/8/2005	negativo
366RO	Pimenteiras - Rondônia	23/8/2005	negativo
367RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
368RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
369RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
370RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
371RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo

372RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
373RO	Gleba - Rondônia	26/7/2005	negativo
374RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
375RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
376RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	<i>M. gypseum</i>
377RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	<i>M. gypseum</i>
378RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
379RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
380RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
381RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	<i>M. gypseum</i>
382RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
383RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	<i>M. gypseum</i>
384RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
385RO	Calama - Rondônia	29/7/2005	negativo
596 RO	Solo Gleba Rio Preto - 570 RO	13/1/2006	negativo
597 RO	Solo Gleba Rio Preto - 571 RO	13/1/2006	negativo
598 RO	Solo Gleba Rio Preto - 572 RO	13/1/2006	negativo
599 RO	Solo Gleba Rio Preto - 573 RO	13/1/2006	negativo
600 RO	Solo Gleba Jacaré - 574 RO	16/1/2006	negativo
601 RO	Solo Nazaré - 575 RO	9/1/2006	<i>M. gypseum</i>
602 RO	Solo Gleba Jacaré - 576 RO	16/1/2006	negativo
603 RO	Solo Gleba Jacaré - 577 RO	13/1/2006	negativo
604 RO	Solo Gleba Jacaré - 578 RO	13/1/2006	<i>M. gypseum</i>
605 RO	Solo Gleba Jacaré - 579 RO	16/1/2006	negativo
606 RO	Solo Nazaré - 580 RO	9/1/2006	negativo
607 RO	Solo Nazaré - 581 RO	9/1/2006	<i>M. gypseum</i>
608 RO	Solo Nazaré - 582 RO	9/1/2006	<i>M. gypseum</i>
609 RO	Solo Nazaré - 583 RO	9/1/2006	<i>M. gypseum</i>
610 RO	Solo Nazaré - 584 RO	9/1/2006	<i>M. gypseum</i>
611 RO	Solo Aliança - 585 RO	18/1/2006	negativo
612 RO	Solo Aliança - 586 RO	18/1/2006	negativo
613 RO	Solo Demarcação - 588 RO	21/1/2006	<i>M. gypseum</i>
614 RO	Solo Aliança - 587 RO	18/1/2006	negativo
615 RO	Solo Demarcação - 589 RO	21/1/2006	<i>M. gypseum</i>
616 RO	Solo Demarcação - 590 RO	21/1/2006	negativo
617 RO	Solo Demarcação - 591 RO	21/1/2006	<i>M. gypseum</i>
618 RO	Solo Gleba Ademir - 592 RO	17/1/2006	<i>M. gypseum</i>
619 RO	Solo de Demarcação - 592 RO	21/1/2006	<i>M. gypseum</i>
620 RO	Solo Gleba Ademir - 593 RO	17/1/2006	negativo
621RO	Solo Gleba Ademir - 594 RO	17/1/2006	negativo
622 RO	Solo Gleba Ademir - 595 RO	17/1/2006	negativo
623 RO	Calama 1 Solo - 596 RO	12/1/2006	negativo
624 RO	Calama 3 Solo - 597 RO	12/1/2006	negativo
625 RO	Calama 2 Solo - 598 RO	12/1/2006	negativo
626 RO	Calama 4 Solo - 599 RO	12/1/2006	negativo
627 RO	Calama 2 Solo - 600 RO	12/1/2006	negativo

628 RO	1 - Sem Identificação 601 RO	n/i	negativo
629 RO	2 - Sem Identificação 602 RO	n/i	negativo
630 RO	3 - Sem Identificação 603 RO	n/i	negativo
631 RO	4 - Sem Identificação 604 RO	n/i	negativo
632 RO	5 - Sem Identificação 605 RO	n/i	negativo
633 RO	5 - Sem Identificação 606 RO	n/i	<i>M.gypseum</i>
634 RO	Porto Velho RO Parque Natural Municipal Lado Esquerdo Serpentário 14/01/2006	14/1/2006	negativo
635 RO	Porto Velho RO Parque Natural Municipal Jaula do Macaco 14/01/2006	14/1/2006	negativo
636 RO	Porto Velho RO Parque Circuito Trilha	14/1/2006	negativo
637 RO	Porto Velho RO Parque Circuito Bar	14/1/2006	<i>M.gypseum</i>
638 RO	Porto Velho RO Cachoeira de Santo Antonio	14/1/2006	negativo
639 RO	Porto Velho Igreja de Santo Antonio	14/1/2006	negativo
640 RO	Praça do Barú Ponto 1 Porto Velho RO	14/1/2006	negativo
641 RO	Porto Velho RO - Praça Barú Ponto 2	14/1/2006	negativo
642 RO	Porto Velho RO - Parque Natural Municipal entrada do Viveiro	14/1/2006	negativo
643 RO	Porto Velho RO - Parque Natural Municipal entrada Principal	14/1/2006	negativo
644 RO	Porto Velho RO - Parque Circuito Parque infantil	14/1/2006	negativo
645 RO	Rondônia - Arroz - Castanheira	28/12/2005	negativo
646 RO	Rondônia - Lote Genésio	27/12/2005	negativo
647 RO	Rondônia - Lote Genésio	27/12/2005	negativo
648 RO	Rondônia - Buraco de Tatu DALH LH 30 R. Alto	27/12/2005	negativo
649 RO	Rondônia Propriedade Lirênio	27/12/2005	negativo
650 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - I	23/8/2005	negativo
651 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - II	23/8/2005	negativo
652 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - III	23/8/2005	negativo
653 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - IV	23/8/2005	negativo
654 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - V	23/8/2005	negativo
655 RO	Rondônia - Solo - Fungos - Pimenteiros - Fazenda STA . Cruz - VI	13/8/2005	negativo
656 RO	Pimenteiros - VII - RO	13/8/2005	negativo
657 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo	28/8/2005	<i>M.gypseum</i>
658 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia I - Solo	28/8/2005	<i>M.gypseum</i>
659 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia II - Solo	28/8/2005	negativo
660 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia III - Solo	28/8/2005	<i>M.gypseum</i>
661 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia IV - Solo	28/8/2005	negativo
662 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia V - Solo	28/8/2005	negativo
663 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo - VI	28/8/2005	negativo
664 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo - VII	28/8/2005	negativo
665 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo - VIII	28/8/2005	negativo
666 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo - IX	28/8/2005	negativo
667 RO	Rondônia - Remanso - Bolívia - Solo - X	28/8/2005	<i>M.gypseum</i>
668 RO	Rondônia - Pedras Negras - Solo - I	31/8/2005	negativo
669 RO	Pedras Negras - Rondônia - Solo - II	31/8/2005	negativo
670 RO	Pedras Negras - Rondônia - Solo - III	31/8/2005	negativo
671 RO	Fazenda Laranjeiras - Rondônia - Solo - Fungos - I	28/8/2005	negativo

672 RO	Fazenda Laranjeiras - Rondônia - Solo - Fungos - II	28/8/2005	negativo
673 RO	Rondônia - Café - Tal - Solo - Fungos - I	28/8/2005	negativo
674 RO	Rondônia - Café - Tal - Solo - Fungos - II	28/8/2005	negativo
675 RO	Rondônia - Café - Tal - Solo - Fungos - III	28/8/2005	negativo
676 RO	Rondônia - Café - Tal - Solo - Fungos - IV	28/8/2005	negativo
677 RO	Rondônia - Santo Antonio - Solo - I	2/9/2005	negativo
678 RO	Rondônia - Santo Antonio - Solo - II	2/9/2005	negativo
679 RO	Rondônia - Santo Antonio - Solo - III	2/9/2005	negativo
680 RO	Rondônia - Santo Antonio - Solo - IV	2/9/2005	negativo
681 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - I	29/8/2005	negativo
682 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - II	29/8/2005	negativo
683 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - III	29/8/2005	negativo
684 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - IV	29/8/2005	negativo
685 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - V	29/8/2005	negativo
686 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - VI	29/8/2005	negativo
687 RO	Porto de Rolim - Rondônia - Solo - VII	29/8/2005	negativo
688 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - VIII	29/8/2005	negativo
689 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - IX	29/8/2005	negativo
690 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - X	29/8/2005	negativo
691 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - XI	29/8/2005	negativo
692 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - XII	29/8/2005	negativo
693 RO	Rondônia - Porto de Rolim - Solo - XIII	29/8/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado de Santa Catarina

id	localidade	data	resultado
17SC	n/i	30/10/2004	negativo
18SC	Parque infantil do grêmio do HU UFSC	30/10/2004	negativo
19SC	Praça Santos Dumont (final da rua Lauro Linhares s/nº) - Bairro Trindade	30/10/2004	negativo
20SC	Parque Infantil (sem nome) em frente ao presídio (início da Rua Lauro Linhares s/nº - Bairro Trindade	30/10/2004	negativo
21SC	Praça Professor Amaro Seixas Neto - Rua Rui Barbosa s/nº - Bairro Agrônômica	30/10/2004	negativo
22SC	Praça Celso Ramos - Rua rui Barbosa s/nº - Bairro Centro	30/10/2004	<i>M gypseum</i>
66SC	FLN 07	11/2004	negativo
67SC	FLN 08	11/2004	<i>M gypseum</i>
68SC	FLN 09	11/2004	negativo
69SC	FLN 10	11/2004	M. gypseum
70SC	FLN 11	11/2004	M. gypseum
71SC	FLN 12	11/2004	negativo
72SC	FLN 13	11/2004	negativo
73SC	FLN 14	11/2004	negativo
74SC	FLN 15	11/2004	<i>M gypseum</i>
75SC	FLN 16	11/2004	negativo
76SC	FLN 17	11/2004	negativo
77SC	FLN 18	11/2004	negativo
90SC	FLN19	n/i	negativo

91SC	FLN20	n/i	negativo
92SC	FLN21	n/i	negativo
93SC	FLN22	n/i	negativo
94SC	FLN23	n/i	negativo
95SC	FLN24	n/i	negativo
96SC	FLN25	n/i	negativo
97SC	FLN26	n/i	negativo
98SC	FLN27	n/i	negativo
99SC	FLN28	n/i	negativo
100SC	FLN29	n/i	negativo
101SC	FLN30	n/i	negativo

amostras de solo coletadas no Estado de São Paulo

id	localidade	data	resultado
16SP	Cotia	17/10/2004	negativo
106SP	Mairiporã - frente terreno	n/i	<i>M. gypseum</i>
107SP	Mairiporã - área do terreno	n/i	negativo
226SP	São Paulo - Cunha - Cachoeira do Desterro	15/7/2005	negativo
227SP	São Paulo - Cunha - Vale das Cachoeiras	15/7/2005	negativo
228SP	São Paulo - Cunha - Cachoeira do Paraitinga - Prainha do Pasto	16/7/2005	negativo
335SP	Jardim interno - metrô Barra Funda	n/i	<i>M. gypseum</i>
336SP	Ponto de ônibus - bairro Mandaqui	n/i	<i>M. gypseum</i>
337SP	Terra para replante - sítio Santa Isabel	n/i	<i>M. gypseum</i>
338SP	Jardim residencial - Bairro Jabaquara	n/i	<i>M. gypseum</i>
339SP	Praia Branca - Guarujá	8/10/2005	negativo
340SP	Pensão Painha Branca (mirante) - Guarujá	8/10/2005	<i>M. gypseum</i>
341SP	Praia Branca - trilha da cachoeira - Guarujá	8/10/2005	negativo
342SP	Praia Branca - trilha da cachoeira - Guarujá	8/10/2005	negativo
343SP	Praia Branca - praia de acesso	8/10/2005	<i>M. gypseum</i>
344SP	Praia Preta - Guarujá	8/10/2005	negativo
450SP	Parque Trianon (Peixoto Gomide)	n/i	<i>M. gypseum</i>
451SP	Parque Trianon - Bosque próximo ao cedro	n/i	<i>M. gypseum</i>
452SP	Parque Trianon - Av. Paulista x Al. Casa branca	n/i	<i>M. gypseum</i>
453SP	Parque Trianon - Bosque próximo ao Jatobá	n/i	<i>M. gypseum</i>
454SP	Parque Trianon - Lado 2 Próximo ao Jacarandá Mimoso	n/i	negativo
455SP	Parque Trianon - em frente à fonte	n/i	<i>M. gypseum</i>
456SP	Parque Trianon - lado 2 - depois da ponte	n/i	negativo
457SP	Parque Trianon - Peixoto Gomide - lado externo	n/i	<i>M. gypseum</i>
458SP	Parque Trianon - lado 2 - próximo Abiurana	n/i	<i>M. gypseum</i>
459SP	Parque Trianon - Peixoto Gomide - entrada - vinheiro	n/i	<i>M. gypseum</i>
460SP	Parque Trianon - entrada Al. Jaú (colégio Dante)	n/i	negativo
461SP	Parque Trianon - Bosque	n/i	negativo
462SP	Parque Trianon - lado 2 - Jequitibá rosa	n/i	<i>M. gypseum</i>
463SP	Parque Trianon - Entrada Al. Jaú x Peixoto Gomide	n/i	<i>M. gypseum</i>
464SP	Parque Trianon - jardim atrás do parquinho	n/i	negativo
465SP	Parque Trianon - bosque próximo ao Jequitibá	n/i	<i>M. gypseum</i>

466SP	Parque Trianon - lado 2 - Parque infantil	n/i	negativo
467SP	Parque Trianon - Próximo ao pau incenso	n/i	<i>M. gypseum</i>
468SP	Parque Trianon - próximo ao pau - ferro	n/i	<i>M. gypseum</i>
469SP	Parque Trianon - canteiro central do bosque	n/i	negativo
470SP	Parque Trianon - entrada central	n/i	negativo
471SP	Parque Trianon - entrada entre a R. Peixoto Gomide e Al. Santos	n/i	negativo
472SP	Parque Trianon - próximo à pitangueira	n/i	<i>M. gypseum</i>
473SP	Parque Trianon - lado oposto ao viveiro	n/i	<i>M. gypseum</i>
474SP	Parque Trianon - próximo à estátua Aretusya	n/i	<i>M. gypseum</i>
475SP	Parque Trianon - próximo à Tapia-Guaçu	n/i	<i>M. gypseum</i>
476SP	Parque Trianon - próximo à estátua de Fauno	n/i	<i>Keratinomyces</i>
477SP	Parque Trianon - parque infantil ao lado da árvore central	n/i	negativo
478SP	Parque Trianon - parque infantil embaixo do escorregador	n/i	negativo
479SP	Parque Trianon - lado 2 - Parque infantil - centro	n/i	negativo
480SP	Parque Ibirapuera - lado sul	n/i	negativo
481SP	Parque Ibirapuera - em frente ao Prodam	n/i	<i>M. gypseum</i>
482SP	Parque Ibirapuera - Jardim do planetário	n/i	negativo
483SP	Parque Ibirapuera - Entre bambuzal e lago (paraça de eventos)	n/i	negativo
484SP	Parque Ibirapuera - beira do lago em frente à ASSUAP	n/i	<i>M. gypseum</i>
485SP	Parque Ibirapuera - beira do lago ao lado do Pav. Japonês	n/i	negativo
486SP	Parque Ibirapuera - em frente ao jardim MAM	n/i	negativo
487SP	Parque Ibirapuera - ponte do Ipê	n/i	negativo
488SP	Parque Ibirapuera - lateral da oca	n/i	negativo
489SP	Parque Ibirapuera - planetário	n/i	negativo
490SP	Parque do Ibirapuera - beira do lago - gramado	n/i	negativo
491SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - embaixo do trepador	n/i	negativo
492SP	Parque Ibirapuera - Alameda dos bambús	n/i	<i>M. gypseum</i>
493SP	Parque Ibirapuera - perto estátua de Fauno	n/i	<i>M. gypseum</i>
494SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - embaixo do escorregador	n/i	negativo
495SP	Parque Ibirapuera - entre a Oca e a Bienal - área de esculturas	n/i	<i>M. gypseum</i>
496SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - trezinho	n/i	negativo
497SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - prox ao bebedouro para cães	n/i	<i>M. gypseum</i>
498SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - entrada do túnel	n/i	negativo
499SP	Parque Ibirapuera - lado externo ponto de ônibus sentido sul (Detran)	n/i	<i>M. gypseum</i>
500SP	Parque Ibirapuera - portão 3 - lado interno esquerdo	n/i	negativo
501SP	Parque Ibirapuera - bambuzal - praça de eventos	n/i	negativo
502SP	Parque Ibirapuera - Monumento dos pioneiros da Imig. Japonesa	n/i	<i>M. gypseum</i>
503SP	Parque Ibirapuera - ao lado da ponte entre os lagos	n/i	negativo
504SP	Parque Ibirapuera - Jardim da Bienal (MAM)	n/i	<i>M. gypseum</i>
505SP	Parque Ibirapuera - parque infantil - tanque de areia	n/i	negativo
506SP	Parque Ibirapuera - Posto de informações turísticas	n/i	negativo
507SP	Parque Ibirapuera - em frente ao restaurante "The green"	n/i	negativo
508SP	Parque Ibirapuera - em frente à escola de jardinagem	n/i	<i>M. gypseum</i>
509SP	Parque Ibirapuera - areia do parquinho 2	n/i	negativo

amostras de solo coletadas no Estado do Espírito Santo

id	localidade	data	resultado
05ES	Aracruz - terreno baldio	17/10/2004	negativo
06ES	Aracruz - quintal tipo I	17/10/2004	negativo
07ES	Aracruz - quintal tipo II	17/10/2004	<i>M.gypseum</i>
08ES	Aracruz - quintal tipo III	17/10/2004	negativo
09ES	Aracruz - calçada	17/10/2004	negativo
10ES	Aracruz - pracinha	17/10/2004	negativo
11ES	Aracruz - canteiro	17/10/2004	<i>M.gypseum</i>
12ES	Morro de Jucutuquara	17/10/2004	<i>M.gypseum</i>
13ES	Região de Flexal - casa de " Leosir"	17/10/2004	negativo
14ES	Nova Canaã (Ilma)	17/10/2004	negativo
15ES	Casa Pe. Guilherme Nazareth (D. Catia)	17/10/2004	<i>M.gypseum</i>
82ES	Parque Estadual Paulo C. Vinha - Apa Setiba - restinga	6/1/2005	negativo
83ES	Praia do Morro Guarapari	5/1/2005	negativo
84ES	Portal da pedra	5/1/2005	negativo
85ES	Pousada dos Pinhos	5/1/2004	<i>M.gypseum</i>
86ES	Pé da Pedra Azul	5/1/2004	negativo
87ES	APA - Setiba	6/1/2005	negativo
88ES	Guarapari - Praça Irineu José Vicente Junior	6/1/2005	negativo
89ES	Mata da Pedra Azul	5/1/2005	negativo

amostras de solo coletadas no Estado de Minas Gerais

id	localidade	data	resultado
03MG	Centro Metal - Ouro Preto	20/10/2004	negativo
04MG	Ouro preto - não informado	20/10/2004	negativo
316MG	Casa elson (galinheiro)	11/7/2005	negativo
317MG	Casa Elson (quintal)	11/7/2005	<i>M gypseum</i>
318MG	Fazenda Matinha (Ederson) - Alfenas	n/i	negativo
319MG	Fazenda batata (Ederson)- Alfenas	n/i	negativo
320MG	Fazenda (Casa Ederson)- Alfenas	n/i	<i>M gypseum</i>
321MG	Fazenda Luiz Carlos I- Alfenas	n/i	negativo
322MG	Fazenda Luiz Carlos II- Alfenas	n/i	negativo
323MG	N/I - Alfenas	n/i	negativo
386MG	Jardim Aeroporto I	n/i	negativo
387MG	Jardim Aeroporto II	n/i	negativo
388MG	Jardim Aeroporto III	n/i	negativo
389MG	Jardim Aeroporto IV	n/i	negativo
390MG	Jardim Aeroporto V	n/i	negativo
391MG	Praça I	n/i	negativo
392MG	Praça II	n/i	<i>M gypseum</i>
393MG	Praça III	n/i	<i>M gypseum</i>
394MG	Pista Moto I	n/i	negativo
395MG	Pista Moto II	n/i	negativo
396MG	Pista Moto III	n/i	negativo

397MG	Pista Moto IV	n/i	negativo
398MG	Pista Moto V	n/i	negativo
399MG	Casa Alexandre I	n/i	<i>M gypseum</i>
400MG	Casa Alexandre II	n/i	negativo
401MG	Casa Alexandre III	n/i	<i>M gypseum</i>
402MG	Casa Alexandre IV	n/i	<i>M gypseum</i>
403MG	Casa Alexandre V	n/i	<i>M gypseum</i>
404MG	Kart I	n/i	negativo
405MG	Kart II	n/i	negativo
406MG	Kart III	n/i	negativo
407MG	Kart IV	n/i	negativo
408MG	Kart V	n/i	negativo
409MG	Kart VI	n/i	<i>M gypseum</i>
410MG	Barracão Carol I	n/i	negativo
411MG	Barracão Carol II	n/i	<i>M gypseum</i>
412MG	Barracão Carol III	n/i	<i>M gypseum</i>
413MG	Barracão Carol IV	n/i	<i>M gypseum</i>
414MG	Barracão Carol V	n/i	negativo
415MG	Raiz Árvore São José	n/i	<i>M gypseum</i>
416MG	Tia Regina	n/i	<i>M gypseum</i>
417MG	I	n/i	negativo
418MG	II	n/i	negativo
419MG	III	n/i	negativo
420MG	IV	n/i	negativo

amostras de solo coletadas no Estado de Minas Gerais

id	localidade	data	resultado
01BR	Entrequadras103/104 sul - área pública	27/10/2004	negativo
02BR	SQS 104 - parque infantil	27/10/2004	negativo
54GO	Bairro São Francisco	11/04	<i>M gypseum</i>
55GO	Setor Universitário	11/04	<i>M gypseum</i>
56GO	Vila Nova - Setor Leste	11/04	negativo
57GO	Anápolis	11/04	negativo
58GO	Não identificado	11/04	negativo
114DF	Setor de chácaras - Vicente Pires	23/3/2005	negativo
115DF	Pq da Cidade - Margem Oeste Lago - lado do Pav. Exposições - área arborizada	25/3/2005	<i>M gypseum</i>
116DF	Pq da Cidade - Margem Oeste Lago - lado do Pav. Exposições - área de jamelão	25/3/2005	negativo
117DF	Pq da Cidade - Margem Oeste Lago - lado do Pav. Exposições - área arborizada	25/3/2005	negativo
118DF	Pq da Cidade - Margem Oeste Lago - lado do Pav. Exposições -próx. Água - Ilha dos Patos	25/3/2005	negativo
119DF	Pq da Cidade - Margem Oeste Lago - lado do Pav. Exposições -próx. Água	25/3/2005	negativo
120DF	Pq da Cidade -área de mangueiras próximo ao Pav. Exposições	25/3/2005	negativo
121DF	Pq da Cidade -área de mangueiras próximo ao Pav. Exposições	25/3/2005	negativo
122DF	Pq da Cidade -parque infantil Ana Lúcia - brinquedos	25/3/2005	<i>M gypseum</i>

123DF	Pq da Cidade - Margem Leste Lago - lado do plano piloto -céu aberto	25/3/2005	negativo
124DF	Pq da Cidade - Margem Leste Lago - lado do plano piloto - pedalinhos	25/3/2005	negativo
125DF	Pq da Cidade - Margem Leste Lago - lado do plano piloto - área de bambús	25/3/2005	negativo
126DF	Pq da Cidade - Margem Leste Lago - lado do plano piloto - área de jaqueiras	25/3/2005	negativo
127DF	Pq da Cidade -parque infantil Ana Lúcia - entrada - área interna	25/3/2005	negativo
128DF	Pq da Cidade -parque infantil Ana Lúcia - bosque interno	25/3/2005	negativo
129DF	Pq da Cidade -entrada W3 Sul - sob árvores do Cerrado	25/3/2005	negativo
130DF	Pq da Cidade -entrada W3 Sul - parque de diversão	25/3/2005	negativo
131DF	Pq da Cidade -entrada W3 Sul -cerca viva de bambús céu aberto	25/3/2005	negativo
132DF	Pq da Cidade - área de lazer (mesas de cimento com jogos)	25/3/2005	negativo
133DF	Pq da Cidade - área de lazer (mesas de cimento com jogos - sob árvores - área interna do parque)	25/3/2005	<i>M. gypseum</i>
134DF	Pq da Cidade -entrada W3 Sul - céu aberto	25/3/2005	negativo
135DF	Quadra 10 cruzeiro velho - área de ficus italiano - céu aberto	20/3/2005	negativo
136DF	Quadra 10 cruzeiro velho - área de ficus italiano -	20/3/2005	negativo
137DF	Quadra 403 - Samambaia - Cidade Satélite - área de muita erosão	27/3/2005	negativo
138DF	Quadra 405 - Samambaia - Cidade Satélite - área de muita erosão	27/3/2005	negativo
139DF	Quadra 507 - Samambaia - Cidade Satélite - área de muita erosão	27/3/2005	negativo
140DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - parque infantil	23/3/2005	negativo
141DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - campo de futebol	23/3/2005	negativo
142DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - céu aberto	23/3/2005	negativo
143DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - área de mangueiras	23/3/2005	negativo
144DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - área de árvores frondosas	23/3/2005	<i>M. gypseum</i>
145DF	Quadra104/105 sul - área de lazer - área de Palmeiras (coqueiros)	23/3/2005	negativo
238GO	São Jorge (perto da escola	26/jul	negativo
239GO	Pousa Águas de Março I	26/7/2005	negativo
240GO	Pousa Águas de Março II	26/7/2005	negativo
241 GO	Pousa Águas de Março III	26/7/2005	negativo
242GO	Beira Estrada	26/7/2005	negativo
243GO	São Jorge (beira estrada - próximo a PNCV)	26/7/2005	negativo
244GO	Beira estrada (PNCV)	26/7/2005	negativo
245GO	Beira Estrada II	26/7/2005	negativo
246GO	Pousada Bambú Brasil I	26/7/2005	negativo
247GO	Pousada Bambú Brasil II	26/7/2005	negativo
248GO	Praça Central (São José)	26/7/2005	negativo
249GO	Praça do Festival Canteiro	26/7/2005	negativo
250GO	Camping da Pedra	26/7/2005	negativo
251GO	Estacionamento pousada Bambú	26/7/2005	negativo
252GO	Casa da Zia	26/7/2005	negativo
253GO	Pousada Caminho das Cachoeiras	26/7/2005	negativo

Anexo B – Resultados da atividade queratinolítica em UK (unidade de queratinase) e elastinolítica em UE (unidade de elastase), de cepas de *Microsporium gypseum* isoladas de casos clínicos humanos, veterinários e de amostras do solo de diferentes regiões geográficas do Brasil, 2007.

	Origem da amostra	UK	UE
1	humana	5	0,98
2	humana	5,1	1,69
3	humana	8,5	0,57
4	humana	8,3	0,69
5	humana	1,6	0,87
6	humana	10,4	1,5
7	humana	1,1	0,94
8	humana	5,7	0,43
9	veterinária	13,5	0,49
10	veterinária	9,4	0,94
11	veterinária	18,8	1,16
12	veterinária	13,6	0,59
13	veterinária	14	0,79
14	veterinária	4	3,76
15	veterinária	10,3	0,98
16	veterinária	11,3	1,69
17	veterinária	6,7	2,69
18	solo (SP)	7,1	0,59
19	solo (SP)	77,7	1,25
20	solo (SP)	12,1	1,44
21	solo (SP)	1,2	7,55
22	solo (SP)	7,3	1,52
23	solo (SP)	0,8	0,27
24	solo (SP)	5,6	2,01
25	solo (SP)	1,7	1,17
26	solo (SP)	2,6	12,85
27	solo (SP)	8,7	5,97
28	solo (SP)	2	3,3
29	solo (SP)	7,8	1,92
30	solo (SP)	14	1,98
31	solo (SP)	5,6	1,62
32	solo (SP)	0,8	0,61
33	solo (SP)	5,1	0,22
34	solo (SP)	6,9	0,75
35	solo (SP)	1,1	1,05
36	solo (SP)	2,1	1,5
37	solo (SP)	0,3	1,53
38	solo (SP)	6,1	0,95
39	solo (SP)	6,4	0,1
40	solo (SP)	10	0,56
41	solo (SP)	2,2	0,22
42	solo (SP)	3,2	0,51

43	solo (SP)	0,9	0,73
44	solo (SP)	0,1	1,05
45	solo (SP)	1,1	0,1
46	solo (SP)	6,9	1,45
47	solo (SP)	6,7	0,8
48	solo (SP)	2,5	11,80
49	solo (SP)	7,3	0,59
50	solo (SP)	12,2	1,52
51	solo (SP)	1,3	6,91
52	solo (RO)	12,4	0,9
53	solo (RO)	3,7	1,5
54	solo (RO)	8,9	0,07
55	solo (RO)	16,1	0,5
56	solo (RO)	3,0	0,25
57	solo (RO)	5,0	0,47
58	solo (RO)	3,5	0,27
59	solo (RO)	17,7	0,32
60	solo (RO)	34,1	0,51
61	solo (RO)	9,6	0,39
62	solo (RO)	7,2	1,39
63	solo (RO)	7,7	0,19
64	solo (RO)	1,6	0,32
65	solo (RO)	2,5	1,09
66	solo (RO)	9,1	0,23
67	solo (RO)	1,8	0,05
68	solo (RO)	3,7	0,16
69	solo (RO)	0,8	0,73
70	solo (RO)	4,3	0,47
71	solo (RO)	2,8	0,16
72	solo (RO)	2,8	0,14
73	solo (RO)	1,2	0,32
74	solo (RO)	9,6	0,11
75	solo (RO)	9,4	0,52
76	solo (RO)	9,1	0,33
77	solo (RO)	0,5	0,25
78	solo (RO)	3,5	0,02
79	solo (RO)	2,2	0,04
80	solo (RO)	9,1	0,08
81	solo (RO)	3,1	0,8
82	solo (RO)	3,6	3,77
83	solo (RO)	3,7	5,17
84	solo (MG)	1,7	1,75
85	solo (MG)	6,9	2,41
86	solo (MG)	9,1	2,60
87	solo (MG)	2,2	8,71
88	solo (MG)	8,1	2,68
89	solo (MG)	5,0	1,16
90	solo (MG)	0,8	3,14
91	solo (MG)	5,6	1,38

92	solo (MG)	1,7	1,91
93	solo (MG)	2,6	2,21
94	solo (MG)	8,7	2,66
95	solo (MG)	2	0,61
96	solo (MG)	7,8	1,59
97	solo (MG)	1,6	4,37
98	solo (RS)	7,8	1,00
99	solo (RS)	0,8	1,92
100	solo (RS)	5,6	1,98
101	solo (RS)	3,6	0,61
102	solo (RS)	3,5	0,23
103	solo (RS)	3,7	0,77
104	solo (RS)	0,5	3,23
105	solo (RS)	3,0	0,75
106	solo (RS)	3,5	0,21
107	solo (RS)	2,8	0,22
108	solo (RS)	2,8	1,1
109	solo (RS)	1,8	3,2
110	solo (RS)	3,7	1,47
111	solo (RS)	0,8	1,80
112	solo (PA)	6,1	3,11
113	solo (PA)	11,2	1,27
114	solo (PA)	21,5	9,15
115	solo (PA)	15,2	2,55
116	solo (PA)	30,0	2,70
117	solo (PA)	8,7	0,92
118	solo (PA)	8,2	0,95
119	solo (GO)	9,5	0,84
120	solo (GO)	16,0	0,60
121	solo (GO)	9,7	0,53
122	solo (GO)	12,8	0,57
123	solo (GO)	16,0	1,47
124	solo (GO)	10,6	5,8
125	solo (PR)	11,1	0,94
126	solo (PR)	9,4	0,87
127	solo (PR)	8,0	1,13
128	solo (PR)	14,0	1,32
129	solo (PR)	14,3	3,80
130	solo (PR)	9,6	0,08
131	solo (PR)	3,1	0,01
132	solo (ES)	4,0	0,01
133	solo (ES)	4,9	0,19
134	solo (ES)	4,3	1,52
135	solo (ES)	7,9	0,05
136	solo (ES)	3,1	0,01
137	solo (MS)	7,4	0,01
138	solo (MT)	3,4	0,08
Média	--	7,11	1,36
Desvio padrão	--	± 8,12	± 2,90

Anexo C – Alinhamento das seqüências de rDNA de amostras representativas de *Microsporium gypseum*.

Amostra DR 25 (cepa isolada de amostra clínica veterinária Estado de Rondônia)

gb|AY176727.1| Arthroderma gypseum strain ATCC 22925 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 1170 bits (590), Expect = 0.0 Identities = 597/598 (99%), Gaps = 1/598 (0%) Strand=Plus/Plus

```

Query 1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA 60
          |||
Sbjct 1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA 60

Query 61     TCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC 120
          |||
Sbjct 61     TCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC 120

Query 121    GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGGT 180
          |||
Sbjct 121    GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGGT 180

Query 181    CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG 240
          |||
Sbjct 181    CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG 240

Query 241    GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG 300
          |||
Sbjct 241    GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG 300

Query 301    ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG 360
          |||
Sbjct 301    ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG 360

Query 361    GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCCCGTGCCTC 420
          |||
Sbjct 361    GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCCCGTGCCTC 420

Query 421    CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCGT 480
          |||
Sbjct 421    CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCGT 480

Query 481    CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCGCT 540
          |||
Sbjct 481    CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCGCT 540

Query 541    TCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAAGCACGGACCAAG 598
          |||
Sbjct 541    TCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAA-CACGGACCAAG 597

```

Amostra 2 (cepa isolada de amostra clínica veterinária)

gb|AY176738.1| *Arthroderma incurvatum* strain CBS 174.64 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 1183 bits (597), Expect = 0.0 Identities = 597/597 (100%), Gaps = 0/597 (0%) Strand=Plus/Plus

```

Query   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA  60
          |||
Sbjct   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA  60

Query  61      TCTGGCCTCCTTCGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC  120
          |||
Sbjct  61      TCTGGCCTCCTTCGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC  120

Query  121     GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCTGGT  180
          |||
Sbjct  121     GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCTGGT  180

Query  181     CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG  240
          |||
Sbjct  181     CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG  240

Query  241     GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTG  300
          |||
Sbjct  241     GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTG  300

Query  301     ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG  360
          |||
Sbjct  301     ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG  360

Query  361     GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCCTGCACTC  420
          |||
Sbjct  361     GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCCTGCACTC  420

Query  421     CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCCCGGAATGTGTCGT  480
          |||
Sbjct  421     CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCCCGGAATGTGTCGT  480

Query  481     CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTTGGGACTGAGGAACGCGCT  540
          |||
Sbjct  481     CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTTGGGACTGAGGAACGCGCT  540

Query  541     CCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAG  597
          |||
Sbjct  541     CCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAG  597

```

Amostra MEG 13 (cepa isolada de amostra clínica veterinária do Estado de Rondônia)

gb|AY176738.1| *Arthroderma incurvatum* strain CBS 174.64 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 1175 bits (592), Expect = 0.0 Identities = 596/598 (99%), Gaps = 0/598 (0%) Strand=Plus/Plus

```

Query   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA  60
        |||
Sbjct   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAA  60

Query   61     TCTGGCCTCCTTCGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC  120
        |||
Sbjct   61     TCTGGCCTCCTTCGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC  120

Query   121    GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGRCGTGAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCTGGT  180
        |||
Sbjct   121    GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTGAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCTGGT  180

Query   181    CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG  240
        |||
Sbjct   181    CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG  240

Query   241    GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG  300
        |||
Sbjct   241    GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG  300

Query   301    ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG  360
        |||
Sbjct   301    ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG  360

Query   361    GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCGTGCACTC  420
        |||
Sbjct   361    GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCGTGCACTC  420

Query   421    CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCGCGAATGTGTCTGT  480
        |||
Sbjct   421    CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCCGCGAATGTGTCTGT  480

Query   481    CTCCCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTTGGGACTGAGGAACGCGCT  540
        |||
Sbjct   481    CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTTGGGACTGAGGAACGCGCT  540

Query   541    CCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG  598
        |||
Sbjct   541    CCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAAGG  598

```


Amostra RO349 (cepa isolada de solo – Estado de Rondônia)

gb|AY176727.1| *Arthroderma gypseum* strain ATCC 22925 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 989 bits (499), Expect = 0.0 Identities = 509/511 (99%), Gaps = 1/511 (0%) Strand=Plus/Minus

```

Query 1 CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGCGTTACGGCCATTACGCCAGCATCCGAGCCGAAGC 60
      |||
Sbjct 597 CTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGCGTTACGGCCATTACGCCAGCATCCGAGCCGAAGC 538

Query 61 GCGTTCCTCAGTCCCGACGGGCGCGATTGCACCCCCGGTCTATAAGACGTCCCGAGAGAC 120
      |||
Sbjct 537 GCGTTCCTCAGTCCCGACGGGCGCGATTGCACCCCCGG-CTATAAGACGTCCCGAGAGAC 479

Query 121 GACACATTCCGGAGGCCTTTGACCGGCCGTCGAAACTGATGCTGGCCCGGGAGACGGGGA 180
      |||
Sbjct 478 GACACATTCCGGAGGCCTTTGACCGGCCGTCGAAACTGATGCTGGCCCGGGAGACGGGGA 419

Query 181 GTGCACGGGCGACGAGCACCTGCTGAACCCCGCCCCGAGTCTGGCCGCAAGCGCTTCCC 240
      |||
Sbjct 418 GTGCACGGGCGACGAGCACCCGCTGAACCCCGCCCCGAGTCTGGCCGCAAGCGCTTCCC 359

Query 241 TTTCAACAATTTACGTGCTGTTTAACTCCCTTTTCAAGGTGCTTTTAACCTTTTCGATCA 300
      |||
Sbjct 358 TTTCAACAATTTACGTGCTGTTTAACTCCCTTTTCAAGGTGCTTTTAACCTTTTCGATCA 299

Query 301 CTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGACCAGTATTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCC 360
      |||
Sbjct 298 CTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCCGACCAGTATTTAGCTTTAGATGAAATTTACCACCC 239

Query 361 GCTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAGCTTCACACGGGCGCGGAC 420
      |||
Sbjct 238 GCTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAAGGAGCTTCACACGGGCGCGGAC 179

Query 421 CGGCCGCCCAAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGTCCTGTTCCAAGGAACTTAGACGG 480
      |||
Sbjct 178 CGGCCGCCCAAGACGGGATTCTCACCTCTCTGACGTCCTGTTCCAAGGAACTTAGACGG 119

Query 481 CGGCCACACCCGAAGCATCCTCTACAAATTA 511
      |||
Sbjct 118 CGGCCACACCCGAAGCATCCTCTACAAATTA 88

```

Amostra ICB 80 (cepa isolada de amostra clínica veterinária)

gb|AY176727.1| *Arthroderma gypseum* strain ATCC 22925 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 1164 bits (587), Expect = 0.0 Identities = 594/595 (99%), Gaps = 1/595 (0%) Strand=Plus/Plus

Query	1	GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA	60
Sbjct	1	GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAA	60
Query	61	TCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC	120
Sbjct	61	TCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGCC	120
Query	121	GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGGT	180
Sbjct	121	GTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGGT	180
Query	181	CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG	240
Sbjct	181	CCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCGG	240
Query	241	GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG	300
Sbjct	241	GTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTG	300
Query	301	ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG	360
Sbjct	301	ATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGG	360
Query	361	GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCCTGCACTC	420
Sbjct	361	GAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCCTGCACTC	420
Query	421	CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCGT	480
Sbjct	421	CCCGTCTCCCGGGCCAGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCGT	480
Query	481	CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCGCT	540
Sbjct	481	CTCTCGGGACGTCTTATAGCCGGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCGCT	540
Query	541	TCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTG-AACACGGACCA	594
Sbjct	541	TCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCA	595

Amostra ICB 169 (cepa isolada de amostra clínica veterinária)

gb|AY176727.1| *Arthroderma gypseum* strain ATCC 22925 28S ribosomal RNA gene, partial sequence Length=945 Score = 1146 bits (578), Expect = 0.0 Identities = 595/598 (99%), Gaps = 2/598 (0%) Strand=Plus/Plus

```

Query   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAGNTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAA   60
          |||
Sbjct   1      GAAACCAACAGGGATTGCCCCAG-TAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAA   59

Query   61     ATCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGC   120
          |||
Sbjct   60     ATCTGGCCTCCTACGGGGGTCCGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCGGGTGTGGCCGC   119

Query   121     CGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGG   180
          |||
Sbjct   120     CGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCGGCCGG   179

Query   181     TCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCG   240
          |||
Sbjct   180     TCCGCGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGCG   239

Query   241     GGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGT   300
          |||
Sbjct   240     GGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGTCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGT   299

Query   301     GATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAG   360
          |||
Sbjct   300     GATCGAAAGGTTAAAAGCACCTTGAAAAGGGAGTTAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAG   359

Query   361     GGAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCGTGCACT   420
          |||
Sbjct   360     GGAAGCGCTTGCGGCCAGACTCGGGGGCGGGTTTCAGCGGGTGCTCGTCGCCCGTGCACT   419

Query   421     CCCCCTCTCCCGGGCCGGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCTG   480
          |||
Sbjct   420     CCCCCTCTCCCGGGCCGGCATCAGTTTCGACGGCCGGTCAAAGGCCTCCGGAATGTGTCTG   479

Query   481     TCTCTCGGGACGTCTTATAGNCCGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCG   540
          |||
Sbjct   480     TCTCTCGGGACGTCTTATAG-CCGGGGTGCAATGCGGCCCGTCGGGACTGAGGAACGCG   538

Query   541     CTTTCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAA   598
          |||
Sbjct   539     CTTTCGGCTCGGATGCTGGCGTAATGGCCGTAAGCGGCCCGTCTTGAAACACGGACCAA   596

```

Anexo D – Artigos científicos publicados (Artigos não relacionados diretamente à tese de doutorado e artigo relacionado à tese de doutorado submetido para publicação).

SILVA, E.H.; RUIZ, L.S.; MATSUMOTO, F.E.; AULER, M.; GIUDICE, M.C.; MOREIRA, D.; SZESZS, W.; PAULA, C.R. Candiduria in a public hospital of São Paulo (1999-2004): characteristics of the yeast isolates. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 49 n. 6, p. 349-353, 2007.

GANDRA, R.F.; GAMBALE, W.; SIMÃO, R C.G., RUIZ L.R.; DURIGON E.L; CAMARGO, L.M.; GIUDICE, M.C.; SANFILIPPO, L.F.; ARAÚJO. J.; PAULA, C.R. *Malassezia* spp. in acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil. **Mycopathologia**, v.164, n. 1, p. 21-26, 2008.

GIUDICE, M.C.; REIS-MENEZES, A.; RITTNER, G.; MOTA, A. GAMBALE, W. Evaluation of the activity of extracellular proteolytic enzymes (keratinase and elastase), and molecular analysis of samples of *Microsporum gypseum* strains isolated from different sources and geographical regions of Brazil. **Med Mycol.** (in press)

CANDIDURIA IN A PUBLIC HOSPITAL OF SÃO PAULO (1999-2004): CHARACTERISTICS OF THE YEAST ISOLATES

Elza Helena da SILVA, Luciana da Silva RUIZ, Flavia Emi MATSUMOTO, Marcos Ereno AULER, Mauro Cintra GIUDICE, Débora MOREIRA, Walderez SZESZS & Claudete Rodrigues PAULA

SUMMARY

The study involved 100 yeast isolates, obtained from urine samples provided by a Public Pediatric Hospital of São Paulo, Brazil, from 1999 to 2004. The most frequent species was *Candida albicans*, followed by *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis*. In regard to virulence, 97% of the isolates showed index 3 for proteinase and 63% index 2 for phospholipase. The most frequent killer biotypes were 511 and 888.

KEYWORDS: Candiduria; Nosocomial infections; Epidemiological markers.

INTRODUCTION

In the last 20 years, there has been a significant rise in the occurrence of nosocomial infections due to *Candida* genus yeasts. Lately, this increase has been much more associated to urinary tract infections^{5,10}.

The incidence of fungemia and urinary tract infections is gradually on the rise and is an important public health problem. About 10 to 15% of urinary tract hospital infections are due to *Candida* spp., and its prevalence is still increasing^{2,47}. Recent studies have shown that the rate of the urinary tract infection has increased from 0.9/1000 to 2.0/1000 patients^{1,3,33}.

At the end of the 1980s, in the United States, 7% of the total number of nosocomial urinary infections were caused by *Candida* species⁴⁵.

A one-year yeast study conducted with 205 hospitalized patients, showed that, in cases of urinary infection, 22% of the isolates belonged to genus *Candida*²⁰.

Recent studies related to urinary infections caused by *Candida* spp. have focused on specific predisposing conditions, however, particularly for children, candiduria frequency, characteristics and implications are still unknown²⁴. Nevertheless, candiduria can be a precocious marker of a disseminated candidiasis, as demonstrated in a recent study of patients in a Surgical Intensive Care Unit precociously diagnosed with candiduria, who progressed to candidemia. Candiduria has developed in 1.3 - 10% of the patients who previously had funguria, and 0.4% of them evolved to death⁴³.

Many researches showed that candiduria cases not reflect a disseminated candidiasis but colonization or lower urinary tract infection^{4,24}. Often it is difficult to distinguish asymptomatic candiduria from bladder or renal infection. Urine cultures positive for *Candida* species have been noted in healthy men and women^{4,14}.

In the present study, 100 yeast isolates obtained from children with candiduria were identified, and their virulence factors (proteinase and phospholipase) and killer phenotypes were investigated.

MATERIAL AND METHODS

Source of yeasts: This study involved 100 isolates of yeasts obtained from confirmed cases of candiduria in children (zero to seven years) hospitalized in the period from 1999 till 2004 in a Public Pediatric Hospital in São Paulo City, SP, Brazil. This tertiary care hospital, mainly attending a low-income population, has 90 patient beds.

Inclusion criterion: To be considered urinary yeast infection, the yeasts have to be isolated from urine samples with counts superior to 10⁴ UFC/mL for only one isolate and 10⁵ UFC/mL for more than one isolate^{14,21}.

Yeasts identification: The yeasts were identified according to their macroscopic, microscopic and physiological characteristics, according to KURTZMAN & FELL²³. For the identification of *Trichosporon* genus, the classification recommended by GUEHO *et al.*¹⁵ was used.

Proteinase research: Proteinase enzyme research was carried out according to RÜCHEL *et al.*³⁷. The enzyme activity (PZ) was measured

according to PRICE *et al.*³⁵ (Pz = 1 - absence of enzyme activity = index 1; $1.0 < Pz \leq 0.64$ - positive enzyme activity = index 2; $Pz < 0.64$ - strongly positive enzyme activity = index 3). *C. albicans* pattern strain ICB-12A was used as a positive control.

Phospholipase analysis: Phospholipase enzyme testing was carried out according to PRICE *et al.*³⁵. *C. albicans* pattern strain ICB-12A was used as a positive control.

Susceptibility to killer toxins: The *Candida* isolates' susceptibility to killer toxins was investigated by the technique described by POLONELLI *et al.*³⁶. Nine pattern strains of killer-toxin producers, from Parma University, Italy, were used as a control.

RESULTS

The most frequent species were *Candida albicans*, 56.0%, followed by *C. tropicalis* (20.0%), *C. glabrata* (11.0%), *C. parapsilosis* (4.0%), *C. lusitaniae*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* (2.0%) and *Trichosporon asahii* (3.0%).

In regard to the production of extracellular enzymes, 84.0% of all the isolates showed strongly positive activity for proteinase (index 3), and 40.0% of these presented the same index for phospholipase activity. Of the *C. albicans* isolates, 98.2% were proteinase producers and 17.8% did not present phospholipase activity. All the non-*albicans* species showed proteinase production. Of the 43 non-*albicans* isolates, 24 (55.8%) did not produce phospholipase. In regard to the three *Trichosporon asahii* isolates, it was observed that only one was a proteinase producer, while all of them did not produce phospholipase (Table 1).

The tests for susceptibility to killer toxins resulted in eight different biotypes. Of all 100 isolates, the most frequent biotypes were 511 (63.0%) and 888 (20.0%). The biotypes 513 and 555 were all *C. albicans*, while *T. asahii* revealed only biotype 888 (Table 2).

DISCUSSION

The frequency of urinary tract infection caused by yeasts has increased greatly over the last two decades due to the greater prevalence

Table 1

Proteinase and phospholipase activity presented by 100 yeast isolates obtained from cases of candiduria in children hospitalized in a Public Hospital of São Paulo, Brazil (1999-2004)

Yeast species	Enzymatic Indexes							
	1n (%)		2n (%)		3n (%)		TOTAL	
	PA	PPA	PA	PPA	PA	PPA	PA	PPA
<i>C. albicans</i> (56)	1(1.8)	10(17.8)	8(14.2)	12(21.4)	47(83.9)	34(60.8)	55(98.2)	46(82.1)
<i>C. tropicalis</i> (20)	-	12(60)	4(20)	5(25)	16(80)	3(15)	20(100)	8(40.0)
<i>C. glabrata</i> (11)	-	6(54)	-	2(18)	11(100)	3(28)	11(100)	5(45.4)
<i>C. parapsilosis</i> (04)	-	3(75)	-	1(25)	4(100)	-	4(100)	1(25)
<i>C. lusitaniae</i> (02)	-	1(50)	1(50)	1(50)	1(50)	-	2(100)	1(50)
<i>C. krusei</i> (02)	-	2(100)	-	-	2(100)	-	2(100)	-
<i>C. guilliermondii</i> (02)	-	-	-	2(100)	2(100)	-	2(100)	2(100)
<i>T. asahii</i> (03)	2(67)	3(100)	-	-	1(33)	-	1(33)	-
Total (%) (100)	3(3.7)	37(37)	13(13)	23(23)	84(84)	40(40)	97(97)	63(63)

PA = proteolytic activity; PPA = phospholipase activity

Table 2

Sensitivity to killer toxins of 100 isolates obtained from cases of candiduria in patients hospitalized in a Public Pediatric Hospital of São Paulo, Brazil (1999-2004)

Species	Biotypes							
	511	513	555	587	812	887	888	111
<i>C. albicans</i>	46	01	-	01	01	-	05	02
<i>C. tropicalis</i>	14	-	01	03	-	-	02	-
<i>C. glabrata</i>	02	-	-	02	-	01	06	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	-	02	-	-	02	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	-	-	-	01	-	01
<i>C. krusei</i>	-	-	-	-	-	-	02	-
<i>C. guilliermondii</i>	01	-	-	-	01	-	-	-
<i>T. asahii</i>	-	-	-	-	-	-	03	-
Total	63	01	01	08	02	02	20	03
	(63.0%)	(1.0%)	(1.0%)	(8.0%)	(2.0%)	(2.0%)	(20.0%)	(3.0%)
								100
								(100.0%)

of prolonged hospitalization, patients with advanced age, immunocompromised patients; use of antibiotics; prophylaxis by antifungal agents; use of urinary catheters; urinary tract surgical manipulation and, especially, longer stays in intensive care units³. Catheterized patients are at special risk, since around 26% of the urinary tract infections are caused by fungus⁴².

EMORI & GAYNES⁹ and JARVIS¹⁷ reported that 25% of the urinary tract infections are due to *Candida* genus yeasts. *Candida albicans* accounts for 40 to 65% of the fungi isolated from candiduria cases³¹. However, there has been an increase in the incidence of other species, and recently it has been observed that the urinary tract is more frequently colonized by non-*albicans* species than are other sites. The non-*albicans* species include most notably *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. lusitaniae* and *Trichosporon* spp.³³.

A survey conducted from 1990 to 1991 of the aetiological agents in urine collected in a tertiary care hospital found a 34% rise in non-*albicans* species and a 11% decrease in *C. albicans*³¹. KRCMÉRY & KOVÁČIKOVÁ²², in a 10-year study, also verified that although *C. albicans* was still the most frequently isolated species, there had been an increase of non-*albicans* species from 1% in 1991 to 46.3% in 1998. *Candida albicans* was identified in 61.6% of all the fungemia cases, followed by *C. parapsilosis* (9.9%), *C. krusei* (5.8%), *C. tropicalis* (4.1%) and *C. glabrata* (3.2%).

In the present study, *C. albicans* was the species most frequently isolated, representing 56% of all the yeasts. However, other species were isolated and the second-most frequent was *C. tropicalis* (20%), followed by *C. glabrata* (11%). During the period from 1998 to 1999, WEINBERGER *et al.*⁴⁷ studied 751 patients with candiduria and found that *C. albicans* was the most common species, with an incidence of 56.4%, followed by *C. tropicalis* (19%) and *C. glabrata* (15%). Other recent studies have also observed that *C. albicans* is still the most commonly isolated species, followed by *C. tropicalis*^{20,27,30}. Lately, studies have shown that *C. glabrata* is the second most isolated species in candiduria cases^{19,40}.

Significant geographic variations on the etiological pattern of invasive *Candida* spp. infections have been reported in various countries. In North America there is a predominance of *C. glabrata* among non-*albicans* species, in South America, however, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are the predominant ones⁸.

These data have been confirmed by statistical studies performed in South America that have shown the relevance of invasive infections due to *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*^{12,13,27,39}. The reasons for this inversion of the species' distribution pattern have not yet been completely elucidated, but may be related to the microorganisms virulence potential and resistance to antifungals⁸.

For the *Candida* genus, one of the most studied virulence factors is the production of extracellular enzymes, such as the secreted aspartyl proteinase (SAPs) that hydrolyse peptide bonds, along with the phospholipases, which hydrolyse phospholipides²⁹.

Various studies have demonstrated that *Candida albicans* and other species are proteinase and phospholipase producers, underscoring the

role that these enzymes play as virulence determinants, regardless of the site from which they are isolated^{26,27,34,39}. According to IBRAHIM *et al.*¹⁶, *Candida albicans* seems to be the only *Candida* species which produces phospholipase *in vitro*. That study also evaluated the ability of various *Candida* spp. species to produce phospholipase, and found that while 79% of the 41 *C. albicans* isolates produced this enzyme, this was not the case for any of the *C. tropicalis*, *C. glabrata* or *C. parapsilosis* isolates. MATSUMOTO *et al.*²⁷, studying the production of phospholipase in *Candida* obtained from catheter and blood, found that while 87.5% of the *C. albicans* isolates produced this enzyme, only three non-*albicans* isolates did. KANTARCIOGLU *et al.*¹⁸ verified that while 62.1% of the non-*albicans* isolates showed phospholipase activity, 93.3% of the *C. albicans* isolates did. RUIZ *et al.*³⁹ observed phospholipase production in 48.3% of *C. albicans* isolates and in 2.7% of the non-*albicans* ones.

In the present study, a higher phospholipase activity was also observed for *C. albicans* (82%), in comparison to non-*albicans* (41%) and *T. asahii* (33%) isolates. This enzyme may also be used as a marker in the diagnosis of candidiasis¹¹.

In regard to proteinase, the enzymatic activity of *C. albicans* isolates ranged from 62.5% to 100%. Experimentally, mutants deficient in terms of proteinase production seem to be less virulent to animals than their proteolytic relatives⁴⁶.

The literature has demonstrated distinct levels of proteinase production by different *C. albicans* isolates and different *Candida* species. Moreover, a correlation has been demonstrated between the level of proteinase production and virulence by species, in descending order: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata* and *C. guilliermondii*^{25,37,38}.

SILVA *et al.*⁴² isolated *C. albicans* from the oral mucosa of patients with AIDS and verified proteinase production in 100% of the isolates. MATSUMOTO *et al.*²⁷ studied 80 *Candida* isolates obtained from blood and catheter and observed that 81.3% presented proteolytic activity. A study performed by RUIZ *et al.*³⁹ demonstrated a strong proteinase activity in *Candida* species: 100% for *C. albicans* and 97.8% for non-*albicans*, isolated from blood. In the present study, 98% of the *C. albicans* and 100% of non-*albicans* species presented strong proteinase activity.

Among the 100 isolates of the present study eight different killer biotypes were found. The biotype most frequently encountered was 511 (63% of all the isolates), representing 82.1% of the *Candida albicans* and 70.0% of the *Candida tropicalis*. Biotype 888, the second-most frequent, was observed in *Candida glabrata* (54.5%) and *Candida parapsilosis* (50.0%).

RUIZ *et al.*³⁹ demonstrated six killer biotypes, while POLONELLI *et al.*³⁶, CANDIDO *et al.*⁶ and MATSUMOTO *et al.*²⁷ registered, respectively, 25, 23 and seven different biotypes. These differences might be related to the variety of anatomical sites from which the yeast samples were taken. Moreover, some studies have found a lower number of killer biotypes than were encountered in these studies^{7,32}.

The most frequent biotypes, 511 and 888, were also prevalent in

89.6% of the *Candida* species isolated from the blood of hospitalized patients²⁵, so they are not restricted only to the urine.

According to MORACE *et al.*²⁸, the use of the killer system for differentiating isolates of pathogenic yeast species can be a useful method for dealing with the nosocomial infections caused by these microorganisms.

RESUMO

Candiduria em hospital público de São Paulo (1999-2004): características das leveduras isoladas

Estudou-se 100 amostras de leveduras, isoladas de urina, provenientes de Hospital Público Infantil de São Paulo Brasil, no período de 1999-2004. A espécie mais frequente foi *Candida albicans*, seguida de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. Em relação à virulência, 97% dos isolados apresentaram índice 3 para proteinase e, 63% índice 2 para fosfolipase. Os biótipos “killer” mais frequentes foram o 511 e 888.

REFERENCES

1. ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J. *et al.* - Epidemiology and predictors of mortality in cases of *Candida* bloodstream infection: results from population-based surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. **J. clin. Microbiol.**, **43**: 1829-1835, 2005.
2. ALVAREZ-LERMA, F.; NOLLA-SALAS, J.; LEON, C. *et al.* - Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Intensive Care Med.**, **29**: 1069-1076, 2003.
3. BINELLI, C.A.; MORETTI, M.L.; ASSIS, R.S. *et al.* - Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clin. Microbiol. Infect.**, **12**: 538-543, 2006.
4. BODEY, G.P. - **Candidiasis - pathogenesis, diagnosis and treatment**. New York, Raven Press, 1993.
5. BRITO, L.R.; GUIMARÃES, T.; NUCCI, M. *et al.* - Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. **Med. Mycol.**, **44**: 261-266, 2006.
6. CANDIDO, R.C.; FISCHMAN, O.; ZAROR, L. & ITO, I.Y. - Diferenciação de cepas de *Candida albicans* pelo sistema killer. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **28**: 321-324, 1995.
7. CARAMALAC, D.A. - **Ocorrência de leveduras em parturientes e recém-nascidos: tipagem das amostras de *Candida albicans***. São Paulo, 1995. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas II, Universidade de São Paulo).
8. COLOMBO, A.L. & GUIMARÃES, T. - Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **36**: 599-607, 2003.
9. EMORI, T.G. & GAYNES, R.P. - An overview of nosocomial infections, including the role of microbiology laboratory. **Clin. Microbiol. Rev.**, **6**: 428-442, 1993.
10. FAULKNER, B.; CHAKSUPA, D.; MALAS, A. & ROSENCRANCE, J.G. - Persistent candiduria complicating intraureteral stenting: a case report and review of the literature. **W. Va. med. J.**, **99**: 25-27, 2003.
11. GHANNOUM, M.A. - Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, **13**: 122-143, 2000.
12. GODOY, P.; TIRABOSCHI, I.N.; SEVERO, L.C. *et al.* - Species distribution and antifungal susceptibility profile of *Candida* spp. bloodstream isolates from Latin American hospitals. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**: 401-405, 2003.
13. GOLDANI, L.Z. & MARIO, P.S. - *Candida tropicalis* fungemia in a tertiary care hospital. **J. Infect.**, **46**: 155-160, 2003.
14. GOLDBERG, P.K.; KOZINN, P.G.; WISE, G.J. *et al.* - Incidence and significance of candiduria. **J. Amer. med. Ass.**, **241**: 582-584, 1979.
15. GUÉHO, E.; SMITH, M.T.; DE HOOG, G.S. *et al.* - Contributions to a revision of the genus *Trichosporon*. **Antonie v. Leeuwenhok**, **61**: 289-316, 1992.
16. IBRAHIM, A.S.; MIRBORD, F.; FILLER, S.G. *et al.* - Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, **63**: 1993-1998, 1995.
17. JARVIS, W.R. - Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species. **Clin. infect. Dis.**, **20**: 1526-1530, 1995.
18. KANTARCIOGLU, A.S. & YUCEL, A. - Phospholipase and protease activities in clinical *Candida* isolates with reference to the sources of strains. **Mycoses**, **45**: 160-165, 2002.
19. KAUFFMAN, C.A.; VAZQUEZ, J.A.; SOBEL, J.D. *et al.* - The prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. **Clin. infect. Dis.**, **30**: 14-18, 2000.
20. KOBAYASHI, C.C.B.A.; FERNANDES, O.F.L.; MIRANDA, K.C.; SOUZA, E.D. & SILVA, M.R.R. - Candiduria in hospital patients: a study prospective. **Mycopathologia**, **158**: 49-52, 2004.
21. KOZINN, P.H.; TASCHDJIAN, C.L.; GOLDBERG, P.K. *et al.* - Advances in the diagnosis of renal candidiasis. **J. Urol.**, **116**: 778-780, 1976.
22. KRCMÉRY Jr., V. & KOVACICOVÁ, G. - Longitudinal 10-year prospective survey of fungemia in Slovak Republic: trends in etiology in 310 episodes. The Slovak Fungaemia Study Group. **Diagn. Microbiol. infect. Dis.**, **36**: 7-11, 2000.
23. KURTZMAN, C.P. & FELL, J.W. - **The yeasts: a taxonomic study**. New York, Elsevier, 1998.
24. LUNDSTROM, T. & SOBEL, J. - Nosocomial Candiduria: a review. **Clin. infect. Dis.**, **32**: 1602-1607, 2001.
25. MacDONALD, F. - Secretion of inducible proteinase by pathogenic *Candida* species. **Sabouraudia**, **22**: 79-82, 1984.
26. MAFFEI, C.M.; PAULA, C.R.; MAZZOCATO, T.S. & FRANCESCHINI, S. - Phenotype and genotype in *C. albicans* strains delayed from pregnant women with recurrent vaginitis. **Mycopathologia (Den Haag)**, **137**: 87-94, 1997.
27. MATSUMOTO, F.E.; GANDRA, R.F.; RUIZ, L.S. *et al.* - Yeasts isolated from blood and catheter in children from a Public Hospital of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, **154**: 63-69, 2002.
28. MORACE, G.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M. & POLONELLI, L. - Strain differentiation of pathogenic yeast by the “killer” system. **Mycopathologia (Den Haag)**, **84**: 81-85, 1984.
29. NAGLIK, J.; ALBRECHT, A.; BADER, O. & HUBE, B. - *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. **Cell Microbiol.**, **10**: 915-926, 2004.
30. NUCCI, M. - Candiduria in hospitalized patients: a review. **Braz. J. infect. Dis.**, **4**: 168-172, 2000.
31. OCHIPINTI, D.J.; GUBBINS, P.O.; SCHRECKENBERGER, P. & DANZIGER, L.H. - Frequency pathogenicity and microbiologic outcome of non-*Candida albicans* candiduria. **Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis.**, **13**: 459-467, 1994.
32. OLIVEIRA, E.E.; SILVA, S.C.; SOARES, A.J. *et al.* - Toxinas “killer” e produção de enzima por isolados da mucosa bucal de pacientes com câncer. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **31**: 523-527, 1998.

33. OLIVEIRA, R.D.; MAFFEI, C.M. & MARTINEZ, R. - Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida* sp. **Rev. Ass. méd. bras.**, **47**: 321-325, 2001.
34. PAULA, C.R.; SAMPAIO, M.C.C.; BIRMAN, E.G. & SIQUEIRA, A.M. - Oral yeasts in patients with bucal cancer before and during radiotherapy. **Mycopathologia (Den Haag)**, **112**: 119-124, 1990.
35. PRICE, M.F.; WILKINSON, I.D. & GENTRY, L.O. - Plate method for detection of phospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, **20**: 7-14, 1982.
36. POLONELLI, L.; ARCHIBUSACCI, C.; SESTITO, M. & MORACE, G. - "Killer" system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. **J. clin. Microbiol.**, **17**: 774-780, 1983.
37. RÜCHEL, R.; TEGELER, R. & TROST, M.A. - Comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, **20**: 233-244, 1982.
38. RÜCHEL, R.; UKLEMANN, K. & BONING, B. - Secretion of acid proteinases by different species of the genus *Candida*. **Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.**, **255**: 537-548, 1983.
39. RUIZ, L.S.; SUGIZAKI, M.F.; MONTELLI, A.C. *et al.* - Fungemia by yeast in Brazil: occurrence and phenotypic study of strains isolated at the Public Hospital, Botucatu, São Paulo. **J. Mycol. Med.**, **15**: 13-21, 2005.
40. SAFDAR, N.; SLATTERY, W.R.; KNASINSKI, V. *et al.* - Predictors and outcomes of candiduria in renal transplant patients. **Clin. infect. Dis.**, **40**: 1413-1421, 2005.
41. SELLAMI, A.; SELLAMI, H.; MAKNI, F. *et al.* - La candidurie en milieu de réanimation: signification et intérêt de la numération des levures dans les urines. **Ann. français. Anesth. Reanim.**, **25**: 584-588, 2006.
42. SILVA, M.R.R.; COSTA, M.R.; MIRANDA, A.T.B.; FERNANDES, O.F.L. & PAULA, C.R. - Evaluation of Etest and macrodilution broth method for antifungal susceptibility testing of *Candida* sp. strains isolated from oral cavities of AIDS patients. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.**, **44**: 121-125, 2002.
43. SIMPSON, C.; BLITZ, S. & SHAFRAN, S.D. - The effect of current management on morbidity and mortality in hospitalised adults with funguria. **J. Infect.**, **49**: 248-252, 2004.
44. SOBEL, J.D.; KAUFFMAN, C.A.; MCKINSEY, D. *et al.* - Candiduria a randomized double-blind study of treatment with fluconazole and placebo. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. **Clin. infect. Dis.**, **30**: 19-24, 2000.
45. VOSS, A.; HOLLIS, R.J.; PFALLER, M.A.; WENZEL, R.P. & DOEBBELING, B.N. - Investigation of the sequence of colonization and candidemia in nonneutropenic patients. **J. clin. Microbiol.**, **32**: 975-980, 1994.
46. WALTHER, T.H.; RYTTER, M.; SHONBORN, C. & HAUSTEIN, U.F. - Differences in the intracellular killing of proteinase-positive and proteinase negative *C. albicans* strains by granulocytes. **Mykosen.**, **29**: 154-161, 1986.
47. WEINBERGER, M.; SWEET, S.; LEIBOVICI, L.; PITLIK, S.D. & SAMRA, Z.J. - Correlation between candiduria and departmental antibiotic use. **J. Hosp. infect.**, **53**: 183-186, 2003.

Received: 27 October 2006

Accepted: 23 July 2007

***Malassezia* spp. in Acoustic Meatus of Bats (*Molossus molossus*) of the Amazon Region, Brazil**

Rinaldo Ferreira Gandra · Walderez Gambale · Rita de Cássia Garcia Simão ·
Luciana da Silva Ruiz · Edson Luis Durigon · Luiz Marcelo Aranha de Camargo ·
Mauro Cintra Giudice · Luis Francisco Sanfilippo · Jansen de Araújo ·
Claudete Rodrigues Paula

Received: 16 March 2007 / Accepted: 22 October 2007
© Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract The yeasts of the *Malassezia* genus are opportunistic microorganisms and can cause human and animal infections. They are commonly isolated from the skin and auricular canal of mammals, mainly dogs and cats. The present study was aimed to isolate *Malassezia* spp. from the acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*) in the Montenegro region, “Rondônia”, Brazil. From a total of 30 bats studied *Malassezia* spp. were isolated in 24 (80%) animals, the breakdown by species being as follows (one *Malassezia* sp. per bat, $N = 24$): 15 (62.5%) *M. pachydermatis*, 5 (20.8%) *M. furfur*, 3 (12.5%) *M. globosa* and 1 (4.2%) *M. sympodialis*. This study establishes a new host and anatomic place for *Malassezia* spp., as it presents the first report ever

of the isolation of this genus of yeasts in the acoustic meatus of bats.

Keywords Amazon region · Bat · *Malassezia* spp. · *Molossus molossus*

Introduction

The yeasts of the *Malassezia* genus are part of the normal microbiota of the mucosa and skin of humans, and many domestic and wild animal species [1–3]. Despite they being commensal microorganisms, many conditions could intensify the growth of *Malassezia* and lead to clinical manifestations. These manifestations cause physical and chemical alterations and immunological responses that usually restrain colonization by this yeast [2, 3]. Predisposing factors to be considered in regard to dermatitis caused by *Malassezia* include antimicrobial agents, corticoid therapy, allergies, hormonal/nutritional disorders, and pathological complexes, such as neoplasia and immunosuppressing diseases [3, 4].

The most common cutaneous manifestation in humans attributed to *Malassezia* spp. is pityriasis versicolor. In addition, some seborrheic dermatitis and allergies can be attributed to these yeasts [4–7].

The genus *Malassezia* comprises lipophilic and lipid dependent yeasts, the only exception being *M. pachydermatis*, which does not need lipid for its growth [8].

R. F. Gandra (✉) · R. de Cássia Garcia Simão
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas,
Universidade Estadual do Oeste do Paraná,
Rua Universitária, 2069, Cascavel, PR 85814-110, Brazil
e-mail: rfgandra@unioeste.br

W. Gambale · L. da Silva Ruiz · E. L. Durigon ·
M. C. Giudice · L. F. Sanfilippo · J. de Araújo ·
C. R. Paula
Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências
Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP,
Brazil

L. M. A. de Camargo
Instituto de Ciências Biomédicas V, Universidade de São
Paulo, Montenegro, RO, Brazil

Guého et al. [9] revised the genus *Malassezia* with the description of 4 new species. As a result, the genus has been enlarged to include seven species comprising the three former taxa *M. furfur*, *M. pachydermatis* and *M. sympodialis*, and the four new taxa *M. globosa*, *M. obtuse*, *M. restricta* and *M. slooffiae*. After this revision new species have been described: *M. dermatis* [10], *M. japonica* [11], *M. nana* [12] and *M. yamatoensis* [13].

The pathogenic role of these yeasts has been recognized in various animals, notably for the species *M. pachydermatis* in the acoustic meatus of dogs. This yeast is isolated in 80% of the cases of externa otitis [14, 15]. This same species is also involved in the dermatitis of small animals [16]. Little is known concerning the presence of this group of yeasts in wild animals, although Guillot et al. [17] reported the isolation of *Malassezia* spp. in animal species varying from mammals to birds. Recently, Coutinho et al. [1] described the isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felines.

This is the first report on the isolation of *Malassezia* species in the acoustic meatus of bats (*Molossus molossus*), from the Amazon region of Brazil.

Material and Methods

Animals

A sum of wild bats (*Molossus molossus*) were collected in the Montenegro region (latitude 10°17'40"S and longitude 63°19'31"W), "Rondonia", Brazil. These bats are characterized as insectivorous and urban. The bats were randomly captured by the researcher Camargo, L. M. A., who has authorization for capture and transportation of the wild animals conceded by IBAMA (Brazilian Institute for Environment and Natural Renewable Resources—license 013/2005 and process 02024.001877/2005-98). The animals were initially captured for the purpose of researching viruses in their blood.

Biological Material (Cerumen) Sampling

After each bat was immobilized, its external acoustic meatus was disinfected with an alcohol–ether solution (Merck, Germany) and the earwax was collected

by the introduction of a sterile swab, suited for this task, and made in our laboratory. After a period of no more than an hour the material was seeded into the appropriate culture medium.

Isolation and Identification of Yeasts

The swab with the sample was streaked onto the surface of Mycosel agar (Difco) in Petri dishes, supplemented with 1% yeast extract (Oxoid, USA), 2% bovine bile (Oxoid, USA) and 1% olive oil according to Lacaz et al. [3]. The plates were incubated at 32°C for 4–7 days. All the yeasts that showed growth and micromorphologic characteristics of *Malassezia* spp. [18] were submitted to the identification method set forth by Guillot et al. [19], which involve the Tween test and Catalase reaction. In addition, we used two complementary tests: inoculation of the strains in Sabouraud dextrose agar (SDA), modified Dixon agar [9] at different temperatures (32°C, 37°C and 40°C) and assimilation tests with Cremophor El (Sigma) according Mayser et al. [20]. The tween test was carried out by a preparation of 2 ml of 10⁵ cells/ml yeast suspension that was mixed with 16 ml of Mycosel agar (Difco) at 40–50°C. The mixture was homogenized and poured into Petri dishes. After the medium solidified, 4 µl of Tween 20, 40, 60 and 80 (Sigma) was added to each plate at equidistant points and 4 µl of Cremophor EL (Sigma) was placed at the center. All cultures were incubated at 32°C for 7 days. Presence of Catalase was determined on a glass slide, one drop of 10-volume hydrogen peroxide (Reagen) was added to a small inoculum of the yeast. The production of bubbles indicated a positive reaction. The identification method described by Guillot et al. [19] permits figure out some characteristics of the each *Malassezia* specie isolated in the present work that favor a correct and security identification, to name a few, *M. pachydermatis* is the only *Malassezia* specie that grows in a medium without the addition of lipid; *M. furfur* is the unique specie able to assimilate Cremophor El and to use all kind of tweens as a lipid source; *M. globosa* strains present an exclusive globose shape of its cells when visualized by common optical microscopy after Gram staining. Besides this, *M. globosa* is not able to assimilate any kind of tween as a lipid source. *M. sympodialis*

presents a characteristic sympodial budding, it may be differentiated from *M. furfur* by its inability to grow on glucose/peptone agar with 10% Tween 20. However, for some ambiguous cases molecular criteria for identification were used [11, 13]; these were used mainly to differentiate *M. furfur* from *M. dermatis*, both are lipid dependent, produce Catalase and present the same pattern of assimilation of the modified Dixon agar [9] at different temperatures and all kind of Tweens.

DNA Extraction

Malassezia spp. cells (strains ICB 401, ICB 201 to 205, *M. furfur* positive control: ICB 094 and ICB400, *M. dermatis* negative control: ICB377) were cultured in Sabouraud dextrose broth (Difco) containing olive oil 1% (v/v) during 7 days at 32°C. After them, the yeast cells were washed with ultra-pure water, diluted in 200 µl of SET Buffer (20 mM Tris pH 8, 30 mM EDTA, 80 mM NaCl) and used to DNA extraction according Lui et al. [21]. The nucleic acid extracted were resuspended in 100 µl of 10 mM Tris-HCl pH 8.0 and 1 mM EDTA containing 20 µg ml⁻¹ RNase A. DNA concentration in the each sample was measured by use of spectrophotometer at $\lambda = 260$ nm. In order to confirm the quality of the nucleic acid extracted, DNA was resolved by electrophoresis on a 1% (w/v) agarose gel.

PCR Assay

The intergenic spacer (IGS) one region is located between the 18S and 5.8S rRNA genes in *Malassezia* spp.. This region was amplified by PCR using the following primers: 26SBF 5'AGCTGCTGCCAATGCTAGCTC3'), which hybridizes to a sequence located at the end of the 26S rRNA gene, and Mala-R (5' TACTGCTGTGAATGCTCCAGC), which hybridizes to a sequence located in the 5.8S rRNA gene. These primers amplify the IGS1 region from DNA obtained of *Malassezia* spp., but *M. sympodialis* and *M. dermatis* [11, 13]. In order to investigate the specificities of these primers, we used known strains of *Malassezia* genus, *M. furfur* (strains ICB 094 and ICB 400) and *M. dermatis* (strain MD 9989). Polymerase chain reaction (PCR) was carried

out in 200 µl reaction tubes containing 50 pmoles primer, 0.2 mM dNTP, 3.0 mM MgCl₂ and 1.0 U Pfu-Taq DNA polymerase (Invitrogen) in 50 µl reaction volume. The amplification was performed with an initial denaturation by 3 min at 94°C, followed by 30 cycles of 94°C (30 s), 55°C (1 min) and 72°C (30s) and a final extension at 72°C for 7 min. PCR products were resolved by electrophoresis on a 1.5% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed on a transilluminator. In order to verify PCR reproducibility, all cycles of PCR described above were made at least for threefold.

Results and Discussion

The present study was aimed to detect *Malassezia* spp. and identify the respective species isolated from the acoustic meatus of 30 bats (*Molossus molossus*) collected in the region of Montenegro, "Rondônia", Brazil. Twenty-four bats presented *Malassezia* spp. (80%), of these 62.5% (15) were *M. pachydermatis*, 20.8% (5) were *M. furfur*, 12.5% (3) were *M. globosa* and 4.2% (1) were *M. sympodialis* (Table 1). One *Malassezia* sp. per bat was isolated. Beyond species of *Malassezia* genus, we isolated three strains of *C. albicans* and one of *C. guilliermondii* from four different bats of *Molossus molossus* specie (not shown). All of these *Candida* species have been isolated in liver and lung of Amazon bats [23].

The bats analyzed in this work were initially captured for the purpose of researching viruses in their blood. Rabies viruses have been isolated from not only hematophagous bats but also insectivorous bats as *Molossus molossus* in Brazil [24].

Interestingly, the lipid independent yeast *M. pachydermatis* was the specie more isolated from acoustic meatus of *Molossus molossus*. The mechanical transfer of *M. pachydermatis* from the skin of dogs with *M. pachydermatis* infection to the healthy skin of humans occurs commonly [25]. This observation suggests that *M. pachydermatis* could represent an emerging zoonotic pathogen.

The association of bats and pathogenic fungi was reported for the first time by Emmons et al. [26] with the isolation of *Histoplasma capsulatum* from soil contaminated with animal faeces. In the decades that followed, about 30 species of bats have been cited as

Table 1 Morphological, molecular and physiological characteristics of *Malassezia* spp. isolated from the acoustic meatus of bats in the Amazon region, “Rondônia”, Brazil

Species (n°/%)	Strain	Morphological characteristics ^b	Utilization of Tween				Growth on SDA ^c at 32°C	Catalase reaction	Growth on mDixon ^d at			PCR assay ^e (26SBF/MalaR)
			20	40	60	80			32°C	37°C	40°C	
<i>M. pachydermatis</i> (15/62.5)	ICB 60–ICB 74	Small, ovoid cells; buds formed on broad base leaving a scar	–	+	+	+	+	+/-	+	+	+	*
<i>M. furfur</i> (5/20.8)	ICB 201–ICB 205	Variable in size and shape; large, oval or cylindrical cells; buds formed on broad base	+	+	+	+	–	+	+	+	+	++
<i>M. globosa</i> (3/12.5)	ICB 302–ICB 304	Globose cells with buds from a narrow base	–	–	–	–	–	+	+	+/- or –	–	*
<i>M. sympodialis</i> (1/4.2)	ICB 401	Ovoid to globose cells with base of bud narrower than mother cell	–	+	+	+	–	+	+	+	+	–

^a: Number of strains isolated^b: Guillot et al. [19] and Gupta et al. [22]^c: Sabouraud dextrose agar^d: Modified Dixon agar [9]^e: Sugita et al. [11, 13]

–: negative; +: positive; +/-: weakly positive

+ +: positive reaction; – -: negative reaction

*not available

hosts of pathogenic fungi [27–29]. The literature contains reports of the isolation of fungi from various sites (internal organs, faeces and skin) in bats, including *Paracoccidioides brasiliensis*, *Cryptococcus* spp., *Candida* spp., *Wangiella dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, and the most frequent, *Histoplasma capsulatum* [3, 27, 29–32].

Mok et al. [23] studied 2886 bats captured in the Amazon Basin (Brazil). Of 155 bats, 186 fungi samples of the genera *Candida*, *Trichosporon*, *Cluyveromyces* and *Geotrichum* were isolated, from the lung, spleen and liver. Of these, seven pathogenic species were identified: *Candida parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis* and *Trichosporon beigelli*.

Although the majority of the studies of *Malassezia* have concerned human skin, this genus has frequently been reported on the skin of a great variety of warm-blooded animal hosts [33, 34]. Many reports have been published on the isolation of *Malassezia* spp. from the auricular canal and the mucosa and skin of bovines, as well as from asymptomatic or otitis-afflicted dogs and cats [2, 35–38]. Coutinho et al. [1] determined the presence of *Malassezia* spp. in the auricular canal of large and small wild felines. Of a total of 132 animals studied, yeasts were isolated in 58 (43.9%), and the greatest incidence was found for the lions.

Bats without any apparent skin disorders were captured in the present work. As mentioned by Mok et al. [23], the isolation of fungi from bats without any clinical or histological pathology suggests a commensal bat-fungus relationship. In fact, a complete clinical investigation in the bats captured was not carried out by us. Despite the fact of the major find of this report is the identification of a new host to *Malassezia* spp., we think that the further study should be done on the relationship between the pathogenicity and colonization. Besides this, molecular biology studies, which allow for the verification of intra- and inter-specific diversity, are important for a better definition of the species [12, 39].

By reporting the isolation of *Malassezia* spp. from the acoustic meatus of *Molossus molossus* from the Amazon region, Brazil, this article confirms, for the first time ever, the presence of *Malassezia* spp. in bats.

Acknowledgments This study is part of a larger project named “Basic Research and Applied Research of Interest to “Rondônia”, Brazil” (Brazilian Government) and it was supported by Fapesp–Pronex-03/10391-5. We thank Dr John Norman for the revision of this manuscript.

References

1. Coutinho SD, Fedullo JD, Corrêa SH. Isolation of *Malassezia* spp. from cerumen of wild felids. *Med Mycol*. 2006;44:383–7.
2. Plant JD, Rosenkrantz WS, Griffin GE. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. *J Am Vet Med Assoc*. 1992;201:879–82.
3. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, et al. Tratado de Micologia Médica, 5ª ed. São Paulo, Brazil: Sarvier; 2002, p. 157–61.
4. McGinley KJ, Lands LR, Marples RR. Microbiology of tinea versicolor. *Arch Dermatol*. 1970;102:168–71.
5. Faergemann J, Bernander S. Tinea versicolor and *Pityrosporum orbiculare*: a mycological investigation. *Sabouraudia*. 1979;17:171–9.
6. Gandra RF, Melo TA, Matsumoto FE, Pires MFC, Croce J, Gambale W, Paula CR. Allergenic evaluation of *Malassezia furfur* crude extracts. *Mycopathologia*. 2001;155: 183–9.
7. Gandra RF, Simão RCG, Matsumoto FE, da Silva BCM, Ruiz LS, Gonçalves da Silva E, Gambale W, Paula CR. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrheic dermatitis patients. *Mycopathologia*. 2006;32:1–8.
8. Midgley G. The lipophilic yeasts: state of the art and prospects. *Med Mycol*. 2000;38 (Suppl. 1):9–16.
9. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1996;69:337–55.
10. Sugita S, Takashima M, Shinoda T, Suto H, Unno T, Tsuboi R, Ogawa H, Nishikawa A. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol*. 2002;40:1363–7.
11. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa A. Description of a new yeasts species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4695–9.
12. Hirai A, Kano R, Makimura K, Duarte ER, Hamdan JS, Lachance MA, Yamaguchi H, Hasegawa A. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeasts species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:623–7.
13. Sugita T, Tagima M, Takashima M, Amaya M, Saito M, Tsuboi R, Nishikawa A. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol*. 2004;48:579–83.
14. Kowalski JJ. The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1988;18:743–54.

15. Crespo MJ, Abarca ML, Cabãnes FJ. Atypical lipid-dependent *Malassezia* species isolated from dogs with otitis externa. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2382–5.
16. Larsson CE, Larsson MH, Amaral RC, Gandra RCP, Hagiwara MK, Fernandes WR. Dermatitis in dogs caused by *Malassezia (Pityrosporum) pachydermatis*. *Ars Vet.* 1988;4:63–8.
17. Guillot J, Bond R. *Malassezia pachydermatis*: a review. *Med Mycol.* 1999;37:295–306.
18. Kurtzman CP, Fell JW. The yeasts. A taxonomic study, 4th ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1998, p. 782–4.
19. Guillot J, Guého E, Lesourd M, Midgley G, Chévrier G, Dupond B. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. *J Mycol Med.* 1996;6:103–10.
20. Mayser P, Haze P, Papavassilis C, Pickel M, Gruender K, Gueho E. Differentiation of *Malassezia* species: selectivity of Cremophor EL, castor oil and ricinoleic acid for *M. furfur*. *Br J Dermatol.* 1997;137:208–13.
21. Lui D, Coloe S, Pedersen J, Baird R. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to differentiate. Trichophyton dermatophytes. *FEMS Microbiol Lett.* 1996;136:147–50.
22. Gupta AK, Kohli Y, Faergemann J, Summerbeli R C. Epidemiology of *Malassezia* yeasts associated with pityriasis versicolor in Ontário, Canadá. *Méd Mycol.* 2001;39:199–206.
23. Mok WY, Luizão RCC, Barreto da Silva MS. Isolation of fungi from bats of the Amazon Basin. *Appl Environ Microbiol.* 1982;44:570–5.
24. Kobayashi Y, Sato G, Shoji Y, Sato T, Itou T, Cunha EMS, Samara SI, Carvalho AAB, Nociti DP, Ito FH, Sakai T. Molecular epidemiological analysis of bat rabies viruses in Brazil. *J Vet Med Sci.* 2005;67:647–52.
25. Morris DO, O'Shea K, Shofer FS, Rankin S. *Malassezia pachydermatis* carriage in dog owners *Emerg Infect Dis.* 2005;11:83–8.
26. Emmons CW. Association of bats with histoplasmosis. *Public Health Rep.* 1958;73:590–5.
27. DiSalvo AF, Ajello L, Palmer JW Jr, Winkler WG. Isolation of *Histoplasma capsulatum* from Arizona bats *Am J Epidemiol.* 1969;89:606–14.
28. Ajello L, Kuttin ES, Beemer AM, Kaplan W, Padhye A. Occurrence of *Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 in Israel, with a review of the current status of histoplasmosis in the Middle East *Am J Trop Med Hyg.* 1977;26:140–47.
29. Reis NR, Mok WY. *Wangiella dermatitidis* isolated from bats in Manaus, Brazil. *Sabouraudia.* 1979;17:213–8.
30. Grose E, Tamsitt JR. *Paracoccidioides brasiliensis* recovered from the intestinal tract of three bats (*Artibeus lituratus*) in Colombia, S.A. *Sabouraudia.* 1965;4:124–25.
31. Grose E, Marinkelle CJ. Species of *Sporotrichum*, *Trichophyton* and *Microsporum* from Colombian bats. *Trop Geogr Med.* 1966;18:260–3.
32. Grose E, Marinkelle CJ, Striegel C. The use of tissue cultures in the identification of *Cryptococcus neoformans* isolated from Colombian bats. *Sabouraudia.* 1968;6:127–32.
33. Guillot J, Chermette R, Guého E. Prévalence du genre *Malassezia* chez les mammifères. *J Méd Mycol.* 1994;4:1–15.
34. Guého E, Boekhout T, Ashbee HR, Guillot J, Van Belkum A, Faergemann J. The role of *Malassezia* species in the ecology of human skin and as pathogens. *Med Mycol.* 1998;36:220–9.
35. Bond R, Saijonmaa-Koulumies LM, Lloyd DH. Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on health dogs. *J Small Anim Pract.* 1995;36:147–50.
36. Duarte ER, Melo M, Hahn R, Hamdan J. Prevalence of *Malassezia* spp. in the ears of asymptomatic cattle and cattle with otitis in Brazil. *Med Mycol.* 1999;37:159–62.
37. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Otitis externa associated with *Malassezia sympodialis* in two cats. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1263–6.
38. Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol.* 2002;40:115–21.
39. Cabanês FJ, Hemández JJ, Castella G. Molecular analysis of *Malassezia sympodialis*-related strains from domestic animals. *J Clin Microbiol.* 2005;43:277–83.