



Universidade de Aveiro
2021

Helena Silvestre Pais **Caracterização de dermatófitos isolados de Ouriço-
cacheiro em Portugal**



Helena Silvestre Pais Caracterização de dermatófitos isolados de Ouriço-cacheiro em Portugal

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação do Doutor Mário Jorge Verde Pereira, professor auxiliar do Departamento de biologia da Universidade de Aveiro e do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, professor auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

presidente

Doutora Maria Paula Polónia Gonçalves
Professora Associada, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

arguente

Doutora Ana Sofia Direito dos Santos Duarte
Professora Auxiliar, Universidade Católica Portuguesa

coorientador

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor Auxiliar com Agregação, Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço ao Doutor Artur Alves, por me ter integrado no seu grupo de trabalho e pela disponibilidade, ensinamentos e paciência.

Agradeço ao Micael Gonçalves que me ajudou na realização deste trabalho.

Agradeço às minhas amigas Carolina Frazão e Marlene Trindade, por toda a força e apoio que me deram.

Um grande obrigada à minha família que apoiou bastante ao longo destes anos e que sempre me ajudaram em momentos menos bons.

palavras-chave

Dermatófitos; *Erinaceus europaeus*; ouriço-cacheiro; Portugal

resumo

Dermatofitoses ou *tinea* são infeções fúngicas dos tecidos queratinizados do ser humano e de animais, causadas por um grupo de fungos específicos, denominados de dermatófitos. Os dermatófitos estão agrupados em três géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os ouriços-cacheiros são consumidores primários e dispersores de sementes ou predadores de grande quantidade e diversidade de invertebrados e possuem uma grande distribuição geográfica. Este estudo teve por objetivo isolar e caracterizar dermatófitos de ouriço-cacheiro com sintomas, queda dos espinhos e feridas principalmente na região da cabeça. As amostras recolhidas de animais doentes foram inoculadas em meio Agar Sabouraud Dextrose e Agar de Extrato de Malte para isolamento de fungos. Os isolados obtidos foram identificados por sequenciação da região ITS (internal transcribed spacer) do cluster de RNA ribossomal e, quando necessário, de outras regiões, tal como parte do gene que codifica para a beta-tubulina (*tub2*). Os isolados foram ainda caracterizados quanto à sua micromorfologia, bem como a capacidade de crescimento e produção de atividades enzimáticas extracelulares (lipase, gelatinase e protease) a 25° C, 30° C e 37° C. Foram identificadas três espécies de fungos, duas pertencentes ao género *Trichophyton*, *T. interdigitale* e *Trichophyton* sp., e uma pertencente ao género *Aspergillus*, *A. terreus*. *Trichophyton* sp. é filogeneticamente próximo de *T. erinacei*, mas poderá representar uma nova espécie. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar esta hipótese. Os isolados de *Trichophyton* cresceram melhor a 30° C e os de *Aspergillus* a 37° C. Foi detetada atividade enzimática nas espécies estudadas, sendo notado um efeito da temperatura. *Aspergillus terreus* não produziu gelatinase a 30 e 37° C enquanto *T. interdigitale* não produziu protease a 37° C. Serão necessários estudos futuros para uma caracterização mais detalhada da diversidade de dermatófitos presentes em ouriço-cacheiro em Portugal.

keywords

Dermatophytes; *Erinaceus europaeus*; hedgehog; Portugal

abstract

Dermatophytoses or tinea are fungal infections of the keratinized tissues of humans and animals, caused by a group of specific fungi, called dermatophytes. Dermatophytes are grouped into three genera: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. Hedgehogs are primary consumers and seed dispersers or predators of large numbers and diversity of invertebrates and have a wide geographic distribution. The objective of this study was to isolate and characterize hedgehog dermatophytes with symptoms, fall of spines and wounds, mainly in the head region. Samples collected from sick animals were inoculated on Sabouraud Dextrose Agar and Malt Extract Agar for fungal isolation. The isolates obtained were identified by sequencing the ITS (internal transcribed spacer) region of the ribosomal RNA cluster and, when necessary, other regions, such as part of the gene encoding beta-tubulin (*tub2*). The isolates were further characterized in terms of their micromorphology, as well as their capacity for growth and production of extracellular enzymatic activities (lipase, gelatinase and protease) at 25° C, 30° C and 37° C. Three species of fungi were identified, 2 belonging to the genus *Trichophyton*, *T. interdigitale* and *Trichophyton* sp., and one belonging to the genus *Aspergillus*, *A. terreus*. *Trichophyton* sp. is phylogenetically close to *T. erinacei*, but may represent a new species. However, further studies are needed to confirm this hypothesis. *Trichophyton* isolates grew better at 30° C and *Aspergillus* isolates at 37° C. Enzymatic activity was detected in the studied species, with an effect of temperature being noted. *Aspergillus terreus* did not produce gelatinase at 30 and 37° C while *T. interdigitale* did not produce protease at 37° C. Future studies will be needed for a more detailed characterization of the diversity of dermatophytes present in hedgehogs in Portugal.

Índice

Índice de tabelas.....	2
Índice de figuras.....	3
Lista de abreviaturas.....	6
1. Introdução.....	7
1.1. Dermatófitos.....	8
1.2. Não dermatófitos.....	12
1.3. Ouriços-cacheiros.....	13
1.4. Objetivos do estudo.....	15
2. Materiais e Métodos.....	16
2.1. Isolamento.....	16
2.2. Extração do DNA.....	17
2.3. Tipagem.....	18
2.4. Identificação molecular.....	18
2.5. Filogenia.....	19
2.6. Caracterização morfológica.....	21
2.6.1. Observação ao microscópio.....	21
2.7. Atividade enzimática.....	21
2.8. Ensaio de crescimento.....	22
3. Resultados.....	24
3.1. Isolamento.....	24
3.2. Tipagem.....	25
3.3. Identificação molecular.....	26
3.4. Filogenia.....	26
3.5. Caracterização morfológica.....	32
3.5.1. Observação ao microscópio.....	32
3.6. Atividade enzimática.....	35
3.7. Ensaio de crescimento.....	36
4. Discussão.....	43
5. Conclusão.....	45
6. Bibliografia.....	46
7. Anexos.....	52
7.1. Extração do DNA.....	52
7.2. Gel de Agarose.....	53

Índice de tabelas

Tabela 1. Sequência do primer GTG5 utilizado na MSP-PCR para a tipagem

Tabela 2. Quantidades dos reagentes utilizados na reação

Tabela 3. Sequências dos primers ITS5 e NL4 utilizados na PCR para a identificação dos isolados

Tabela 4. Quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR

Tabela 5. Composição do meio de lipase

Tabela 6. Composição do meio de cultura de Skim Milk

Tabela 7. Composição do meio de cultura de gelatina

Tabela 8. Isolados e amostras a que pertencem

Tabela 9. Atividade enzimática de *Aspergillus terreus*

Tabela 10. Atividade enzimática da espécie desconhecida de *Trichophyton*

Tabela 11. Atividade enzimática do *Trichophyton interdigitale*

Tabela 12. Preparação do tampão TES

Tabela 13. Preparação de NaCl

Tabela 14. Preparação de CTAB

Tabela 15. Preparação de NH₄OAc

Tabela 16. Preparação do tampão TE

Tabela 17. Preparação do gel de agarose

Índice de figuras

Figura 1. Amostras de ouriço inoculadas em placas de SDA e MEA

Figura 2. (A) Gel da tipagem; **(B)** dendrograma da tipagem

Figura 3. Árvore filogenética do género *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo Tamura-Nei com distribuição Gama. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Figura 4. Bootstrap Consensus Tree do género *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo Tamura-Nei com distribuição Gama. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Figura 5. Árvore filogenética com base na análise Maximum Likelihood de um conjunto de dados combinados dos alinhamentos da sequência ITS e *tub2*. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Figura 6. Bootstrap Consensus Tree do género *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood de um conjunto de dados combinados dos alinhamentos da sequência ITS e *tub2*. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Figura 7. Bootstrap Consensus Tree ITS secção da localização da espécie desconhecida de *Trichophyton*

Figura 8. Bootstrap Consensus Tree ITS+*tub2* secção da localização da espécie desconhecida de *Trichophyton*

Figura 9. Parte da árvore filogenética do género *Aspergillus* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Figura 10. *Aspergillus terreus* ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde a 10µm

Figura 11. *Trichophyton* sp. ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde a 10µm

Figura 12. *Trichophyton interdigitale* ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde a 10µm

Figura 13. (A) Observação à lupa da cultura de *Aspergillus terreus* a 25° C positiva para lipases; (B) Observação à lupa da cultura de *Aspergillus terreus* a 30° C negativa para gelatinases; (C) Observação da cultura de *Aspergillus terreus* a 25° C positiva para proteases

Figura 14. (A) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 30° C positiva para lipases; (B) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 37° C positiva para gelatinases; (C) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 25° C positiva para proteases

Figura 15. (A) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C positiva para lipases; (B) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C positiva para gelatinases; (C) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C negativa para proteases

Figura 16. Gráfico do crescimento da espécie desconhecida de *Trichophyton* (sample 0) a 25° C, 30° C e 37° C

Figura 17. Gráfico do crescimento de *Trichophyton interdigitale* (sample 1) a 25° C, 30° C e 37° C

Figura 18. Gráfico do crescimento de *Aspergillus terreus* (sample 3) a 25° C, 30° C e 37° C

Figura 19. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6

Figura 20. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6

Figura 21. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6

Figura 22. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7

Figura 23. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7

Figura 24. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7

Figura 25. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 10

Figura 26. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 10

Figura 27. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 10

Figura 28. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15

Figura 29. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15

Figura 30. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15

Lista de Abreviaturas:

BLAST- “Basic Local Alignment Search Tool”

CTAB- Brometo de Cetiltrimetilamônio

EDTA- Ácido Etilonediaminotetracético

ITS- “Internal Transcribed Spacer”

LCR- “Ligase Chain Reaction”

MEA- Malt Extract Agar

MEGA X- Molecular Evolutionary Genetics Analysis

MSP-PCR- “Microsatellite primed PCR”

NCBI- “National Center for Biotechnology Information”

NH₄OAc- Acetato de Amônia

PCR- Polymerase Chain Reaction

RNA- Ácido Ribonucleico

rpm- Rotações por Minuto

SDA- Sabouraud Dextrose Agar

SI- Sequências Iniciadoras

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

TE- Tris-EDTA

TES- Tris+EDTA+SDS

Tris- Trisamenometano

tub2- sequência parcial do gene que codifica β -Tubulina

1. Introdução

“A identificação dos microrganismos pode ter diferentes objetivos, desde orientação terapêutica perante uma situação de doença, estudos epidemiológicos sobre a distribuição de estirpes de um agente numa população ou investigação sobre a sua biologia e patologia” (Castro, 2010, p. 412).

A identificação dos microrganismos pode ser feita diretamente no produto biológico ou após a cultura do produto. Para a cultura e isolamento existem meios de cultura para as bactérias, fungos e alguns parasitas que tornam possível a sua multiplicação e posterior identificação. A sementeira dos produtos biológicos nos meios de cultura pode ser direta ou em alguns casos, a amostra deve ser previamente tratada e só posteriormente semeada nos meios de cultura. A observação das colónias de bactérias ou de fungos nos meios de cultura constitui a técnica clássica da sua identificação, sendo posteriormente efetuada a partir de colónias isoladas. Após o isolamento de um microrganismo, interessa proceder à sua caracterização, aqui existe a caracterização morfológica, caracterização bioquímica, caracterização genotípica e teste de resistência aos antimicrobianos (Castro, 2010, pp. 414-417).

Quando a identificação é feita diretamente do produto biológico pode-se recorrer ao exame microscópico direto para a visualização de bactéria, parasitas ou fungos, este método é simples e económico, contudo pouco sensível. Pode-se também recorrer à deteção de sequências genómicas através de técnicas de biologia molecular. Estas técnicas são atualmente cada vez mais utilizadas, são mais caras do que os métodos convencionais, mas apresentam a vantagem da obtenção de um resultado mais rápido e de serem particularmente úteis na deteção de microrganismos de difícil cultura (Castro, 2010, p. 414).

É possível encontrar sequências genómicas específicas no genoma de todos os organismos que os distinguem uns dos outros, e a pesquisa destas sequências genómicas pode ser feita sobre o produto, sem extração prévia do genoma ou após a extração do genoma. O número de sequências específicas pode ser ampliado, previamente, pela execução de reação de polimerase em cadeia (polymerase chain reaction – PCR). Esta técnica tem sido utilizada para detetar sequências de nucleótidos específicas em, por exemplo, amostras clínicas de doentes infetados por bactérias, vírus, parasitas e fungos. Têm sido descritas várias modificações da técnica base, como por exemplo a Multiplex PCR, esta técnica utiliza múltiplos pares de sequências iniciadoras (SI), para diferentes moléculas alvo, na mesma mistura de reação, permitindo a deteção de vários microrganismos numa reação de PCR. A deteção dos vários produtos amplificados é

efetuada por sondas específicas para cada um dos produtos esperados. Nested PCR, nesta técnica o produto obtido numa primeira reação de PCR é submetido a uma segunda reação de PCR, utilizando-se um par de SI, cuja sequência nucleotídica alvo se encontra no produto amplificado pelo primeiro par, esta técnica tem a desvantagem de se poder verificar maior probabilidade de contaminação, tratando-se por isso de uma técnica muito sensível. Reação de ligase em cadeia (LCR), esta técnica utiliza uma enzima DNA ligase termoestável. PCR em tempo real, nesta técnica, ao contrário das anteriores, a detecção da amplificação é efetuada enquanto a reação ocorre pela medida da cinética da reação, esta técnica tem a vantagem de ser mais rápida, precisa e exata, permitindo também uma quantificação de DNA e RNA com as mesmas características (Castro, 2010, pp. 416-417).

A técnica de PCR tem uma variedade de aplicações no laboratório de microbiologia, como na detecção e identificação direta de microrganismos, na detecção e caracterização de genes que codificam fatores de resistência e na detecção da presença de genes responsáveis pela resistência antimicrobiana e subtipagem dos microrganismos para estudos epidemiológicos (Castro, 2010, p. 417).

1.1. Dermatófitos

Em meados do século XIX o estudo da micologia médica, principalmente relacionada com doenças humanas, iniciou-se com o descobrimento da etiologia fúngica do *favus* tendo sido impulsionado por três médicos europeus, Robert Remak, Johann L. Schoenlein e David Gruby (Weitzman & Summerbell, 1995). *Favus* ou *tinea favosa* costumava ser bastante frequente em todo o mundo, em especial nos países pobres.

Em 1837 Schoenlein e o seu assistente Remak conseguiram descobrir o agente de uma micose crónica do couro cabeludo, *favus*, ao qual Remak deu o nome de *Achorion* (atualmente *Trichophyton schoenleinii* em honra ao seu mentor Scholein. Esta foi a primeira descoberta de um fungo causador de doença humana (Lemsaddek, 2008).

O verdadeiro fundador da dermatomicologia foi David Gruby que de forma independente, e sem conhecimento do trabalho realizado por Remark e Schoenlein, descreveu o agente causador do *favus*, clinicamente e os detalhes microscópicos das crostas, e também estabeleceu a natureza contagiosa da doença (Gruby, 1841; Gruby, 1841; Gruby, 1843; Gruby, 1844 citado em Weitzman & Summerbell, 1995).

Raymond Sabouraud foi um dos primeiros micologistas médicos e iniciou os seus estudos sobre dermatófitos por volta de 1890, as suas contribuições incluíram estudos sobre a taxonomia, morfologia, métodos de cultivo de dermatófitos e terapia das

dermatofitoses. Ele classificou os dermatófitos em quatro gêneros, *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, tendo como base os aspectos clínicos da doença em combinação com as observações culturais e microscópicas (Weitzman & Summerbell, 1995).

Em 1934 Chester Emmons modernizou o esquema taxonômico de Sabouraud, e de outros, e estabeleceu a classificação dos dermatófitos tendo como base a morfologia dos esporos e dos órgãos acessórios. A mudança consistiu na eliminação do gênero *Achorion*, reconhecendo apenas os gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (Weitzman & Summerbell, 1995).

Estudos realizados mais tarde levaram à simplificação da identificação de dermatófitos e à redução do número de espécies e variedades (Weitzman & Summerbell, 1995).

Em 1958 Gentles relatou o sucesso da terapia oral usando griseofulvina na dermatofitose em cobaias, isto revolucionou a terapia da dermatofitose e deu início à primeira grande mudança na terapia da *tinea* desde Sabouraud (Weitzman & Summerbell, 1995).

O ano de 1959 foi mais uma data importante no estudo da taxonomia dos dermatófitos, Dawson e Gentles descreveram o estado teleomórfico (estado sexual) de *Trichophyton ajelloi* ao qual deram o nome *Arthroderma uncinatum* (Lemsaddek, 2008).

Em 1960, Griffin conseguiu reisolar o estado sexual de *Microsporum gypseum*, que tinha sido inicialmente descrito por Nannizzi em 1927, e ao qual tinha dado o nome de *Gymnoascus gypseum* (Lemsaddek, 2008).

Em 1961, Stockdale descobriu vários estados teleomórfico de *Microsporum gypseum* e propôs um novo gênero, *Nannizzia*, para agrupar todos os estados sexuais do gênero *Microsporum* (Lemsaddek, 2008).

Mais tarde, em 1975, foi descoberto o estado sexual de *Microsporum canis* ao qual se deu o nome *Nannizzia otae* em homenagem ao micologista Ota. Todos os estados sexuais dos dermatófitos foram classificados em dois gêneros, *Arthroderma* e *Nannizzia*, até 1986 onde Weitzman e seus colaboradores propuseram o agrupamento de todos eles no gênero *Arthroderma* (Lemsaddek, 2008).

Os dermatófitos são fungos filamentosos e caracterizam-se principalmente pela atividade queratinolítica, o que possibilita a invasão dos tecidos queratinizados como a pele, os pelos e as unhas seja de seres humanos como de outros animais (Wagner & Sohnle, 1995; Weitzman & Summerbell, 1995; Alio *et al.*, 2005 citado em Maifrede, 2009).

Os géneros das formas assexuadas destes fungos são *Microsporum*, *Epidermophyton* e *Trichophyton* e o género das formas sexuadas, as espécies capazes de reprodução sexuada, é *Arthroderma*.

O género *Microsporum* caracteriza-se pela presença, em cultura, de estruturas de frutificação conhecidos como macroconídios. Essa estruturas são conídeos grandes, em forma navicular e são divididos por septos transversais de espessura variável e que apresentam na sua superfície, sobretudo na parte distal, uma grande quantidade de protuberâncias que conferem aspeto conhecido como verrucoso. Associados aos macroconídeos, podem ser observados, às vezes, estruturas também de frutificação, menores e claviformes, conhecidas como microconídeos. Tanto os macroconídeos como os microconídeos ficam distribuídos ao longo das hifas (Weitzman & Summerbell, 1995 citado em Maifrede, 2009).

O género *Trichophyton* caracteriza-se pela presença de uma grande quantidade de microconídeos de forma arredondada ou claviforme e disposição peculiar nas hifas, associados a poucos macroconídeos de forma cilíndrica, divididos em septos finos e transversais, com superfície externa lisa (Weitzman & Summerbell, 1995 citado em Maifrede, 2009).

O género *Epidermophyton* em cultura apresenta apenas macroconídeos na forma de clava, divididos por finos septos e com superfície lisa; esses macroconídeos frequentemente são evidenciados agrupados uns nos outros. Não se observa a presença de microconídeos. Deste género apenas a espécie *Epidermophyton floccosum* é patogénica (Weitzman & Summerbell, 1995 citado em Maifrede, 2009).

As espécies de dermatófitos são divididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, dependendo do seu habitat primário ser animais, solo ou humanos, respetivamente (Ajello, 1962, Georg, 1960 citado em Weitzman & Summerbell, 1995). Os dermatófitos antropofílicos estão associados a humanos e raramente infetam outros animais, os dermatófitos zoofílicos infetam geralmente animais e podem ocasionalmente infetar humanos e os dermatófitos geofílicos estão associados a materiais queratinosos como cabelos, penas, cascos e chifres, quando estes materiais estão em processo de decomposição, podendo causar infeção em animais e humanos (Mayr, 1989 citado em Weitzman & Summerbell, 1995). Pensa-se que estas espécies geofílicas foram ancestrais dos dermatófitos patogénicos, estes pré-adaptados à patogénese cutânea pela sua capacidade de decompor a queratina e a sua consequente associação com animais que vivem em pelos e ninhos forrados de penas em contacto com o solo (Chmel, 1980 citado em Weitzman & Summerbell, 1995).

Normalmente as infecções causadas por dermatófitos (micose) são nomeadas de acordo com a localização anatômica, usando o termo latino que designa o local do corpo a seguir à palavra *tinea*. As manifestações clínicas são *tinea barbae* (micose da barba e bigode), *tinea capitis* (couro cabeludo, sobrancelhas e pestanas), *tinea corporis* (pele glabra), *tinea cruris* (virilha), *tinea favosa* (favus), *tinea imbricata* (micose causada por *T. concentricum*), *tinea manuum* (mão), *tinea pedis* (pés) e *tinea unguium* (unhas) (Weitzman & Summerbell, 1995).

No processo de infecção, os dermatófitos precisam superar as defesas do hospedeiro para poder ocorrer a colonização dos tecidos (Peres *et al.*, 2010). Um mecanismo importante do organismo contra agentes infecciosos que atacam sítios superficiais é a queratinização, processo de renovação do estrato córneo realizado pelos queratinócitos que leva à descamação epitelial e conseqüentemente à possível remoção do fungo (Peres *et al.*, 2010).

Após a adesão, os dermatófitos devem obter nutrientes para o seu desenvolvimento e sobrevivência, recorrendo a macromoléculas presentes no tecido do hospedeiro como fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre. No entanto, a seletividade da membrana citoplasmática impede que proteínas, amido, celulose e lípidos possam ser transportados para o interior da célula. Para que essas moléculas possam ser utilizadas, é necessário degradá-las em compostos mais simples, para as quais as membranas são permeáveis (Peres *et al.*, 2010). A quebra dessas moléculas é feita por enzimas hidrolíticas secretadas que apresentam especificidade por diferentes substratos. Por essa razão, a secreção de uma ampla variedade de enzimas pelos dermatófitos, como proteases, lipases, elastases, colagenases, fosfatases e esterases, é um fator importante durante o processo de infecção (Brouta *et al.*, 2002; Vermout *et al.*, 2008; Leng *et al.*, 2009 citado em Peres *et al.*, 2010). A maquinaria enzimática dos dermatófitos é um dos fatores de virulência melhor caracterizados. Esta permite a hidrólise dos componentes estruturais do tecido epidérmico possibilitando que estes agentes patogênicos se tornem invasivos (Peres *et al.*, 2010).

A queratina é uma molécula proteica fibrosa de alto peso molecular, rica em cisteína e cujas pontes de dissulfeto e ligações acetamídicas garantem a sua estabilidade. Essa proteína é produzida por humanos e outros animais, sendo o principal constituinte na pele, unhas e cascos, desempenhando uma função de revestimento e proteção (Fraser & Parry, 2005 citado em Peres *et al.*, 2010).

As queratinases secretadas pelos dermatófitos catalisam a degradação de queratina presente no tecido do hospedeiro em oligopeptídeos ou aminoácidos, que podem então ser assimilados pelo fungo (Peres *et al.*, 2010).

Uma vez no tecido do hospedeiro, os dermatófitos ou seus metabolitos induzem uma resposta imune inata pelos queratinócitos, conseqüentemente ativando mecanismos ou mediadores da resposta imune (Peres *et al.*, 2010).

Há um número limitado de medicamentos que podem ser usados para tratar dermatofitoses, principalmente terbinafina, compostos azólicos, como itraconazol e fluconazol, e griseofulvina (Monod, 2019). O primeiro alerta começou no início da década de 2000 com o relato de dois casos de resistência à terbinafina em *Trichophyton rubrum* (Osborne, *et al.*, 2005; Osborne, *et al.*, 2006 citado em Monod, 2019). O problema estende-se desde 2017, com vários casos relatados de onicomicoses resistentes à terbinafina, *tinea pedis* e *tinea corporis* com *Trichophyton rubrum* ou *Trichophyton interdigitale* na Europa e na Ásia (Yamada, *et al.*, 2017; Saunte, *et al.*, 2019 citado em Monod, 2019). No entanto, a resistência antifúngica agora não diz respeito apenas à terbinafina, mas também aos compostos azólicos. Um caso de *Trichophyton rubrum* exibindo suscetibilidade reduzida a azóis foi recentemente documentado (Monod, 2019).

A origem do surgimento de dermatófitos resistentes permanece obscura. No entanto, a medicação excessiva e os tratamentos sistêmicos repetidos com compostos antifúngicos provavelmente contribuíram para o fenômeno (Monod, 2019).

1.2. Não Dermatófitos

Além dos dermatófitos, outros fungos são apontados como agentes de dermatofitose, fungos esses que são encontrados normalmente na natureza como sapróbios do solo ou patogênicos de plantas (Bell-Syer *et al.*, 2001 citado em Maifrede, 2009).

Aspergillus spp. são fungos ubíquos e anemófilos, classificados entre os microrganismos mais abundantes, além de mundialmente distribuídos, podendo ser isolados do solo, ar, água, alimentos, plantas, material em decomposição e superfícies (Ward *et al.*, 2006; Sidrim & Rocha, 2004 citados em Albano, 2009).

Morfologicamente, todas as espécies de *Aspergillus* apresentam colônias filamentosas contendo hifas septadas. A estrutura de frutificação, típica do gênero, é caracterizada por um conidióforo com uma célula pé e uma dilatação no ápice chamada de vesícula, onde se inserem as métulas em espécies bisseriadas, ou as fiálides em espécies unisseriadas, as quais dão origem aos conídios (Sidrim & Rocha, 2004; Lacaz *et al.*, 2002; Abarca, 2000 citado em Albano, 2009).

Das diversas espécies reconhecidas do gênero *Aspergillus*, cerca de 20 são consideradas patogênicas para humanos e animais. Espécies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus nidulans*, apresentam potencial patogênico e

ocasionalmente são relatadas como agentes etiológicos de doenças (Sidrim & Rocha, 2004; Lacaz *et al.*, 2002; Klich, 2002; Abarca, 2000; Stevens *et al.*, 2000; Latgé, 1999; Severo *et al.*, 1997 citado em Albano, 2009).

A aspergilose afeta uma grande variedade de animais, desde mamíferos a alguns répteis, mas a sua grande importância é observada em humanos e aves tanto domésticas quanto silvestres (Tell, 2005; Abundis-Santamaria, 2003; George, 1997 citado em Albano, 2009).

1.3. Ouriços-cacheiros

O ouriço pertence à família *Erinaceidae* onde estão inseridos os géneros *Atelerix*, *Erinaceus*, *Hemiechinus*, *Mesechinus* e *Paraechinus* (Marques, 2016).

O género *Erinaceus*, do qual fazem parte as espécies *Erinaceus amurensis*, *E. concolor*, *E. europaeus* e *E. roumanicus* encontra-se distribuído por todo o continente europeu e uma parte do continente asiático (Marques, 2016).

Erinaceus europaeus, conhecido por possuir o peito castanho, é a espécie que habita Portugal e encontra-se distribuído por toda a Europa ocidental, no sul dos países escandinavos e na Rússia. Foi introduzido na Nova Zelândia no século XIX (Morris, 2014 citado em Marques, 2016).

Um ouriço adulto pesa entre 800 e 1200 gramas (Bexton & Robinson, 2003 citados em Marques, 2016), este varia sazonalmente verificando-se uma diminuição após a hibernação e um aumento antes da mesma (Morris, 2014) e o seu comprimento, do focinho à base da cauda, varia entre os 20 centímetros e os 30 centímetros (Morris, 2014 citado em Marques, 2016).

Um ouriço adulto possui entre 3500 a 7000 espinhos, de 2 a 3 centímetros de comprimento e 2 milímetros de diâmetro (Morris, 2014 citado em Marques, 2016), cada um destes espinhos está ligado ao seu próprio músculo permitindo uma movimentação independente de cada um (<http://www.wildlifeonline.me.uk>, citado em Marques, 2016).

Os seus mecanismos de defesa contra os predadores têm por base estas duas particularidades: ao se sentir ameaçado enrola-se e os espinhos tomam uma posição ereta (Hof *et al.*, 2012 citado em Marques, 2016), outra forma de defesa consiste na realização de saltos verticais com os pelos eretos (Pfäffle, 2010 citado em Marques, 2016).

Este animal está adaptado a uma grande diversidade de habitats e é influenciado por alterações climáticas, alterações na estrutura do habitat, pela disponibilidade de alimento e presença de competidores ou predadores, como por exemplo o texugo (Hof *et al.*, 2012 citado em Marques, 2016). É possível encontrar ouriços-cacheiros em campos de cultivo,

parques, zonas pantanosas, áreas urbanas, florestas e charnecas (Poel *et al.*, 2015 citado em Marques, 2016).

Estudos realizados concluíram que, atualmente, há um maior número de ouriços em zonas urbanas, em comparação com as zonas rurais, isto pode ser explicado pela abundância de alimento e água, a existência de vários abrigos e a ausência de predadores naturais nestas áreas (Adams & Ash, 2006 citado em Hubert *et al.*, 2011 e em Marques, 2016).

São animais insectívoros, a base da sua alimentação consiste em pequenos animais como lagartixas e invertebrados como os besouros, caracóis e minhocas (Wroot, 1985 citado em Rautio *et al.*, 2016). A sua alimentação tem sofrido alterações, devido à migração destes animais para ambientes mais urbanos, verificando-se que alimentos de origem humana (peixe, leite) (Rautio *et al.*, 2016 citado em Marques, 2016) e ração de animais domésticos, como o cão e o gato (Hubert *et al.*, 2011 citado em Marques, 2016) passaram a integrar parte da sua dieta (Marques, 2016).

Apesar de não ser a presa principal de nenhum predador, por vezes é capturado por raposas, mochos e corujas, águias e toirões. O texugo, devido às suas fortes e compridas garras, tem alguma facilidade em penetrar na cobertura espinhosa, capturando assim alguns ouriços, principalmente os mais jovens.

Estes animais são afetados por uma variedade de infeções parasitárias, bacterianas (Riley & Chomel, 2005; Keymer *et al.*, 1991 citado em Hajipour, 2015) e virais (Pfäffle, 2010 citado em Marques, 2016).

Face à proximidade de algumas populações às estradas a espécie é frequentemente encontrada atropelada. A destruição de habitat e a utilização de pesticidas na agricultura também são fatores de ameaça, o consumo de presas contaminadas por pesticidas leva a contaminação indireta dos ouriços, embora a espécie também possa ser contaminada diretamente. Adicionalmente, a espécie é por vezes capturada ilegalmente.

Tradicionalmente, não tem particular interesse económico e especial pelo seu uso. Em certas regiões europeias são animais por vezes perseguidos pelo homem.

No País Basco e Portugal no passado era uma espécie capturada com fins gastronómicos. O ouriço-cacheiro era considerado um petisco no sul de Portugal, tendo o prato o nome de "leitão da serra". Atualmente, não é permitida a captura destes animais silvestres. Regra geral, hoje têm estima humana pela sua morfologia única e natureza inofensiva, são parte do imaginário infantil, com personagens comuns em literatura e programas infantis em muitos países.

Nos últimos anos, o ouriço tem-se tornado cada vez mais popular como animal de estimação por todo o mundo. Esta tendência começou nos Estados Unidos da América quando algumas espécies de ouriços africanos foram importadas e mais tarde relatou-se na Europa ouriços mantidos como animais de estimação (Cabañes, 2020). As duas espécies de ouriço permitidas para estimação são o ouriço pigmeu africano de barriga branca ou anão (*Atelerix albiventris*) e o ouriço orelhudo ou ouriço egípcio (*Hemiechinus auritus*), quanto ao ouriço europeu (*Erinaceus europaeus*) está protegido e é ilegal mantê-lo como animal de estimação, contudo, no século XIX, esta espécie era mantida nas cozinhas de algumas casas para controlar a presença de baratas e outros insetos, esta prática levou o ouriço europeu colonizar territórios como a Nova Zelândia (Cabañes, 2020).

Dermatofitoses após contato com ouriços africanos, ouriço egípcio ou ouriço europeu devem ser esperadas (Kargl *et al.*, 2018).

Em ouriços, as lesões micóticas costumam ser encontradas na região da cabeça, pois o patogénico é transmitido durante brigas entre os animais e as mães também podem transmitir os fungos aos recém-nascidos. Se o ouriço perder completamente os espinhos como resultado da infeção, ele morre de hipotermia. O tratamento veterinário de ouriços deve sempre incluir antifúngicos sistémicos (Kargl *et al.*, 2018).

Trichophyton erinacei é quase exclusivamente transmitido de ouriços para humanos e causa formas inflamatórias como *tinea manuum* (Kargl *et al.*, 2018).

1.4. Objetivos do estudo

O objetivo geral deste estudo foi isolar e identificar dermatófitos presentes em ouriços-cacheiros em Portugal. As amostras foram recolhidas no centro de recuperação na Maia, CRIDO – Centro de Recuperação e Interpretação de Ouriço gerido pela associação Amigos Picudos – Associação para a Preservação e Proteção dos Ouriços e enviadas para a Universidade de Aveiro.

Adicionalmente, pretendeu-se caracterizar os isolados obtidos quanto à sua micromorfologia, bem como a sua capacidade de crescer e produzir atividades enzimáticas extracelulares a diferentes temperaturas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Isolamento

As amostras de ouriço foram enviadas para a Universidade de Aveiro a partir do centro de recuperação na Maia, estas consistiam em espinhos, pelos e pedaços de pele/ crosta. As amostras recebidas pertenciam às espécies de *Erinaceus europaeus* e *Atelerix albiventris*.

As amostras recebidas foram registadas com a descrição que já vinha nelas:

- Ouriço Europeu 1
- Ouriço Europeu 18/4/2020
- Ouriço Pigmeu Africano, fêmea
- Ouriço Europeu, fêmea, Parque da Cidade do Porto, 30/4/2020
- Ouriço Europeu

As amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo meio Malt Extract Agar (MEA) e Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Figura 1). Os meios foram preparados segundo as indicações dos fabricantes e autoclavados. As placas de Petri foram seladas com parafilme, identificadas e colocadas na estufa a incubar durante 7 dias a 30° C.

Após a incubação, as colónias foram repicadas para placas de Petri contendo meio MEA ou SDA, com o objetivo de obter culturas puras. As placas foram seladas com parafilme, identificadas e incubadas a 30° C.

Durante 15 dias foi feito o controlo dos isolados para verificação do crescimento das culturas e existência de alguma contaminação.

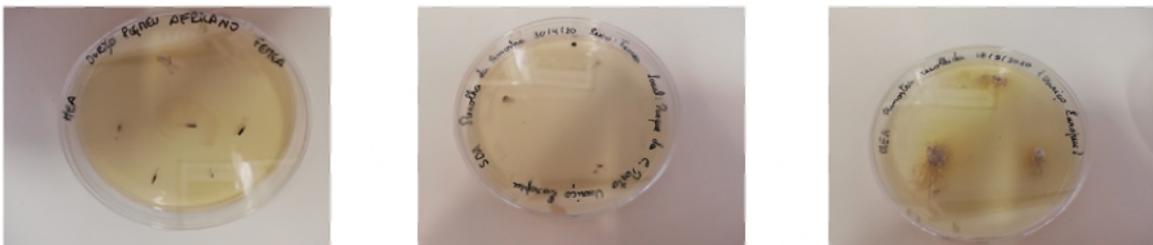


Figura 1. Amostras de ouriço inoculadas em placas de SDA e MEA

2.2. Extração do DNA

Extrai-se o DNA genômico das culturas puras de acordo com o protocolo Möller (1992), com algumas modificações.

1. Permitir o crescimento do fungo em meio SDA e MEA durante dezanove dias a 30° C, de modo a haver um crescimento adequado do micélio
2. Transferir o micélio para um microtubo de 2,2 mL e adicionar 500 µL de tampão TES
3. Misturar, aquecer por 3 minutos e então passar para gelo por 10 minutos
4. Adicionar 10 µL de proteinase K (20 mg/ mL)
5. Incubar a 65° C por 3 minutos (Agitar ocasionalmente)
6. Aumentar a concentração de sal através da adição de 140 µL de NaCl 5M
7. Adicionar 65 µL 10% CTAB
8. Incubar a 65° C por 30 minutos (agitar ocasionalmente)
9. Adicionar 1 mL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e misturar cuidadosamente por inversão durante 1 minuto
10. Incubar por 15 minutos em gelo
11. Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm a 4° C
12. Transferir o sobrenadante (+/- 800 µL) para um novo microtubo de 1,5 mL
13. Adicionar 225 µL de NH₄OAc 5M e misturar cuidadosamente
14. Incubar por 15 minutos em gelo
15. Centrifugar por 10 minutos a 12000 rpm a 4° C
16. Transferir o sobrenadante (+/- 1000 µL) para um novo microtubo de 1,5 mL
17. Adicionar 500 µL de isopropanol gelado e misturar cuidadosamente
18. Incubar por 15 minutos em gelo
19. Centrifugar diretamente por 10 minutos a 12000 rpm a 4° C
20. Descartar o sobrenadante
21. Lavar 2 vezes com 1000 µL de etanol 70% gelado (centrifugar por 10 minutos e descartar o sobrenadante)
22. Secar o pellet na bancada
23. Dissolver o pellet em 30 µL-100 µL de tampão TE + RNase (1,5 µL de 10 mg/ mL mais 48,5 µL de tampão TE)
24. Armazenar as diluições de DNA a 4 ou -20° C e os estoques originais a -20° C

Em relação ao armazenamento dos isolados, foram retirados quatro plugs da periferia do micélio das colônias e colocados em criotubos com 800 μL de solução de glicerol a 15%. Estes foram armazenados a -80°C .

2.3. Tipagem

Realizou-se também uma tipagem para analisar os diferentes isolados obtidos. Para isso realizou-se uma MSP-PCR utilizando o primer GTG5.

Tabela 1. Sequência do primer GTG5 utilizado na MSP-PCR para a tipagem

Primer	Sequência (5' – 3')
GTG5	GTGGTGGTGGTGGTG

A reação MSP-PCR foi feita num termociclador BIO-RAD C1000 touchTM (USA) num volume de 25 μL .

Tabela 2. Quantidades dos reagentes utilizados na reação

Primer GTG5	2 μL (10 pmol/ μl)
Taq polimerase	6,25 μL
Água destilada	15,75 μL
DNA	1 μL

As condições utilizadas foram 95°C durante 5 minutos para a desnaturação inicial, 94°C durante 1 minuto para a desnaturação, 53°C durante 1 minuto para o annealing, 65°C durante 8 minutos para a extensão e 65°C durante 16 minutos para o alongamento. Foram realizados 30 ciclos.

Depois foi feita uma eletroforese a 80V durante 2 horas e 45 minutos, o gel de agarose a 1,5% obtido na eletroforese foi analisado usando o programa GelComparII.

2.4. Identificação molecular

Depois de se ter extraído o DNA realizou-se a PCR para amplificar a região ITS utilizando os primers ITS5 e NL4.

Tabela 3. Sequências dos primers ITS5 e NL4 utilizados na PCR para a identificação dos isolados

Primers	Sequência (5'– 3')
ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
NL4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG

A reação de PCR foi feita num termociclador BIO-RAD C1000 touch™ (USA) num volume de 25 µL.

Tabela 4. Quantidades dos reagentes utilizados na reação de PCR

Primer ITS5	1 µL (10 pmol/µl)
Primer NL4	1 µL (10 pmol/µl)
Taq polimerase	6,25 µL
Água destilada	15,75 µL
DNA	1µL

As condições utilizadas foram 95° C durante 5 minutos na desnaturação inicial, 94° C durante 30 segundos para a desnaturação, 52° C durante 30 segundos para o annealing, 72° C durante 1 minuto e 30 segundos para a extensão e 72° C durante 10 minutos para o alongamento. Foram realizados 30 ciclos.

A seguir foi feita uma eletroforese a 80V durante 1 hora num gel de agarose a 1,5%.

Após a eletroforese o gel foi corado numa solução de brometo de etídio a 0,5 µg/ mL durante 15 minutos e depois lavado em água destilada durante 15 minutos, para remover o excesso de brometo de etídio. Por fim, o gel foi visualizado no sistema de aquisição de imagem gel DOC™ XR (Bio-Rad).

Foi feita a purificação dos produtos da amplificação utilizando o kit NZYGelPure™, seguindo as instruções do fabricante.

A determinação da sequência nucleotídica dos produtos amplificados da região ITS foi realizada pela GATC Biotech (Alemanha).

Após a recepção das sequências nucleotídicas da região ITS obtiveram-se as sequências completas dos isolados a partir dos cromatogramas com recurso ao software FinchTV. Depois, estas sequências foram submetidas a uma análise primária utilizando o Standard Nucleotide BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch).

2.5. Filogenia

A filogenia dos isolados foi analisada separadamente por géneros usando sequências de outras espécies intimamente relacionadas para determinar a sua relação filogenética na forma de árvore, usando o software MEGAX.

Para o género *Aspergillus* usou-se a sequência ITS, começou-se por obter as sequências ITS de outras espécies deste género, recorrendo ao banco de dados GenBank (NCBI- Nacional Center for Biotechnology Information). Depois de se ter as sequências fez-se o alinhamento, no MEGAX, com os seguintes parâmetros, para Pairwise alignment (Gap opening = 10 e Dap extension = 0.1) e para Multiple alignment (Gap opening = 10 e Gap extension = 0.2), Delay divergente Cutoff (%) = 25 e Transition weight = 0.5 e a seguir fizeram-se os cortes de modo as sequências ficarem todas com o mesmo tamanho. Quando o alinhamento ficou pronto procedeu-se à determinação do melhor modelo de evolução, a seguir começou-se a construir a árvore usando uma análise Maximum Likelihood, nos parâmetros colocou-se o modelo anteriormente determinado e a distribuição e para os valores de bootstrap 500 réplicas.

Para o género *Trichophyton* fez-se uma árvore com as sequências ITS, mas devido a algumas incoerências nos resultados fez-se também uma árvore combinada ITS + *tub2*. O gene da beta-tubulina (*tub2*) foi amplificado e sequenciado usando os primers Bt2a e Bt2b (Glass e Donaldson, 1995) com as condições de amplificação previamente descritas por Lopes *et al.* (2017).

O processo de construção para a primeira árvore, apenas com sequencias, ITS foi igual ao feito para a árvore do género *Aspergillus*. Para a árvore combinada ITS + *tub2* houve algumas diferenças no processo de construção da árvore, primeiro obtiveram-se as sequências *tub2*, recorrendo ao banco de dados GenBank, as sequências ITS já tinham sido obtidas anteriormente, depois de ter as sequências ITS e *tub2* das mesmas espécies fez-se o alinhamento em separado, no MEGAX, com os seguintes parâmetros para Pairwise alignment (Gap opening = 10 e Gap extension = 0.1) e para Multiple alignment (Gap opening = 10 e Gap extension = 0.2), Delay divergente Cutoff (%) = 25 e Transition weight = 0.5 e a seguir fizeram-se os cortes de modo as sequências ficarem todas com o mesmo tamanho, quando os alinhamentos ficaram prontos recorreu-se ao FaBox, uma caixa de ferramentas online (<https://birc.au.dk/~palle/php/fabox/>), na ferramenta Fasta alignment joiner onde se juntou os dois alinhamentos. Foi este ficheiro criado que se usou no resto do processo de construção da árvore, determinou-se o melhor modelo de evolução e para a construção usou-se uma análise Maximum Likelihood, nos parâmetros colocou-se o modelo determinado e a distribuição e para os valores de bootstrap 500 réplicas.

2.6. Caracterização morfológica

2.6.1. Observações ao microscópio

Para fazer a observação ao microscópio usaram-se isolados de cada espécie, incubados a 25° C. Para as preparações colocou-se um pouco de ácido láctico na lamina, raspou-se um pouco do micélio da extremidade da cultura e colocou-se na lamina e por fim pressionou-se com uma lamela, as observações foram feitas na lente 40X.

2.7. Atividade Enzimática

A atividade enzimática é uma ferramenta importante no processo de infecção.

A produção de enzimas extracelulares é visualizada através do aparecimento de halos transparentes, produção de precipitado, alteração de cor do meio de cultura, entre outros.

No ensaio testou-se a atividade de lipases, gelatinases e proteases a 25° C, 30° C e 37° C.

Os meios de cultura foram preparados com as seguintes composições.

Tabela 5. Composição do meio de lipase

Meio de Lipase (1L)	
Peptona	10g
Nacl	5g
CaCl₂	0,1g
Tween20	1% (v/v)
Bacto Agar	20g

Autoclavar a solução Tween20 separadamente, adicionar 1 mL por cada 100 mL de meio. Detecção pela presença de precipitado.

Tabela 6. Composição do meio de cultura de Skim Milk

Meio de Skim Milk (1L)	
Skim Milk	10g
Extrato de Malte	5g
Bacto Agar	20g

Autoclavar o skim milk em separado e no final juntar ao restante meio. Detecção pela presença de um halo claro junto ao micélio. É colocado um filtro para ser possível remover a colónia e observar se houve formação de halo mais facilmente.

Tabela 7. Composição do meio de cultura de gelatina

Meio de Gelatina (1L)	
Gelatina	10g
Extrato de Malte	5g
Bacto Agar	15g

Detecção pela presença de um halo claro junto ao micélio, neste meio também é utilizado um filtro.

A detecção da produção de enzimas foi realizada em placas de Petri, foram feitas três réplicas de cada meio para cada temperatura.

Plugs dos isolados foram inoculados nos meios de cultura, as placas Petri foram identificadas e incubadas nas respectivas temperaturas.

2.8. Ensaio de crescimento

Foi feito um ensaio para analisar a taxa de crescimento dos isolados a diferentes temperaturas, testaram-se três temperaturas diferentes, 25° C, 30° C e 37° C.

Recuperaram-se os isolados dos gliceróis em placas de SDA e incubaram-se a 25° C durante dois dias. A partir destas culturas os fungos foram inoculados em placas de SDA e incubadas nas temperaturas testadas, foram feitas três réplicas.

Foram realizadas medições do diâmetro das culturas, com recurso a uma régua, no segundo, sexto, sétimo, décimo e décimo quinto dia de incubação, o ensaio teve uma duração de 15 dias.

Utilizou-se o Excel para fazer gráficos com as medições tiradas de todos os isolados para uma melhor análise.

3. Resultados

3.1. Isolamento

No isolamento obtiveram-se 7 culturas de fungos.

Tabela 8. Isolados e amostras a que pertencem

Isolados	Amostras
Sample 0	Ouriço Europeu 1
Sample 1	Ouriço Europeu MEA R3
Sample 2	Ouriço Europeu SDA
Sample 3	Ouriço Europeu (18/5/2020) MEA
Sample 4	Ouriço Europeu (30/4/2020) MEA
Sample 5	Ouriço Europeu (30/4/2020) SDA
Sample 6	Ouriço Europeu (18/5/2020) SDA

3.2. Tipagem

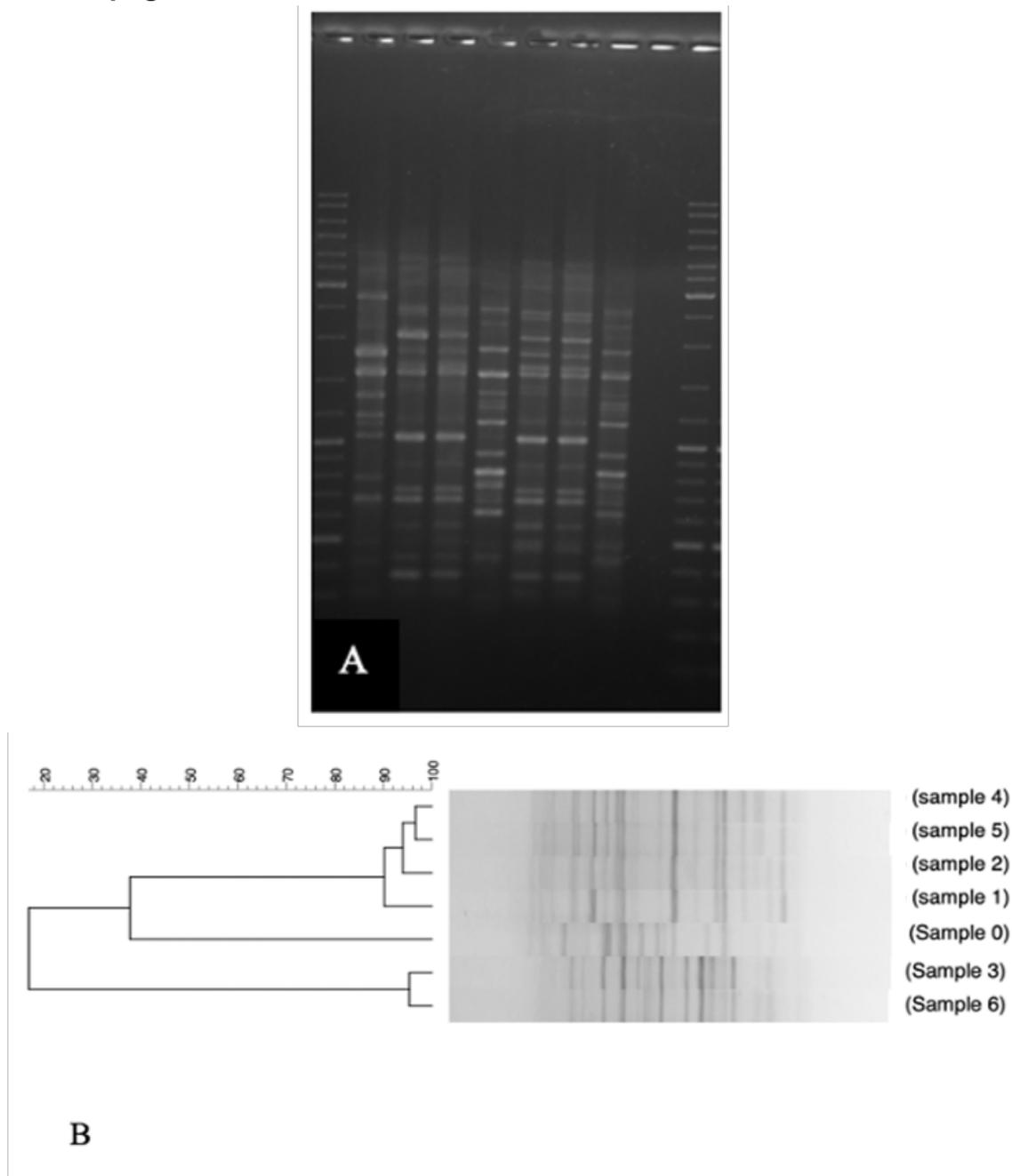


Figura 2. (A) Gel da tipagem; (B) dendrograma

Fez-se uma tipagem com o objetivo de avaliar a diversidade dos isolados. Foi possível verificar através do gel e do dendrograma (Figura 2A e 2B, respectivamente) que os isolados 1, 2, 4 e 5 possuem um perfil muito semelhante entre si e que o perfil do isolado 0 apresenta algumas parencas com os perfis dos isolados 1,2,4 e 5 o que poderá indicar uma proximidade entre estes. Os isolados 3 e 6 possuem perfis semelhantes entre si mas bastante diferentes dos perfis dos outros isolados.

3.3. Identificação molecular

Foram identificadas 3 espécies, os isolados 1, 2, 4 e 5 como *Trichophyton interdigitale*, os isolados 3 e 6 como *Aspergillus terreus* e o isolado 0 como *Trichophyton erinacei*.

3.4. Filogenia

Foi feita uma análise filogenética para perceber onde se localizavam os isolados em relação a outras espécies do mesmo género assim como em relação a estirpes da mesma espécie.

Na árvore do ITS dos isolados do género *Trichophyton* (Figura 3) verificou-se que o *Trichophyton interdigitale* sample 1 se localiza próximo da estirpe tipo confirmando a sua identificação. Por outro lado, o isolado identificado como *Trichophyton erinacei* sample 0 encontra-se muito afastado da estirpe tipo e de outras estirpes desta espécie. Perante este resultado decidiu-se fazer uma árvore combinada ITS+tub2 (Figura 5) para tentar perceber se este isolado pertence à espécie inicialmente identificada, se pertence a outra espécie, e qual, ou se se trata de uma nova espécie. Os resultados obtidos na árvore combinada foram similares aos obtidos na primeira árvore, o isolado ficou afastado da estirpe tipo e das outras estirpes desta espécie.

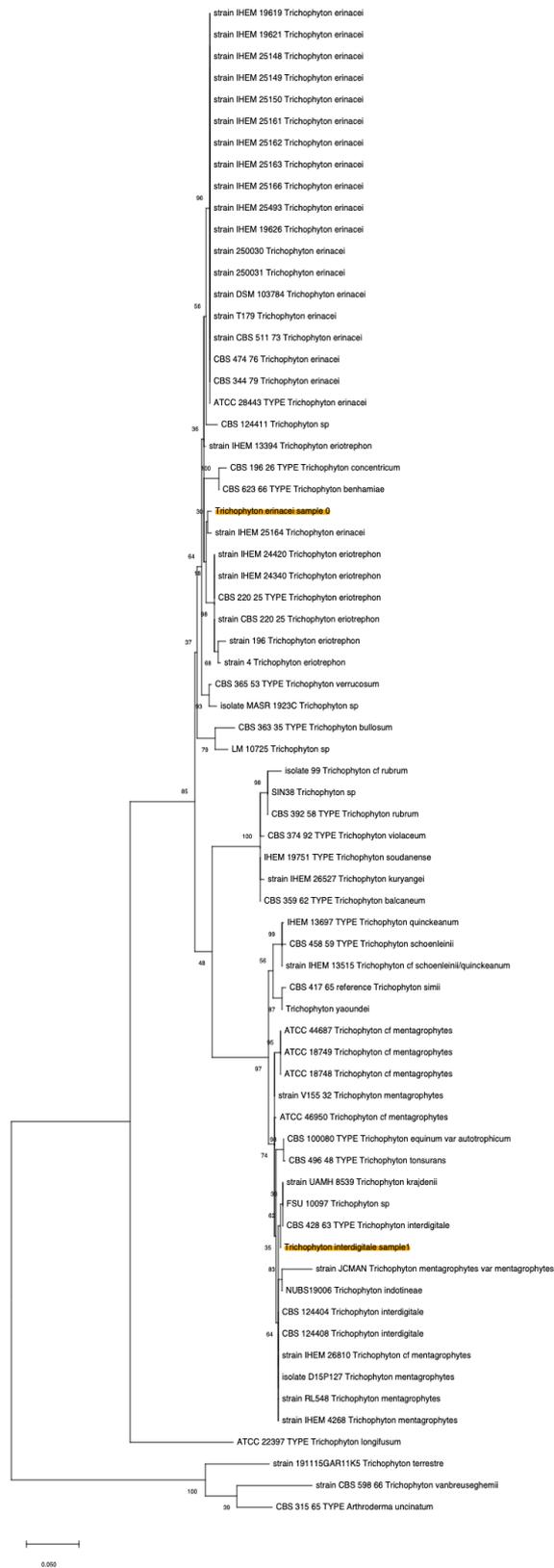


Figura 3. Árvore filogenética do gênero *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo Tamura-Nei com distribuição Gama. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

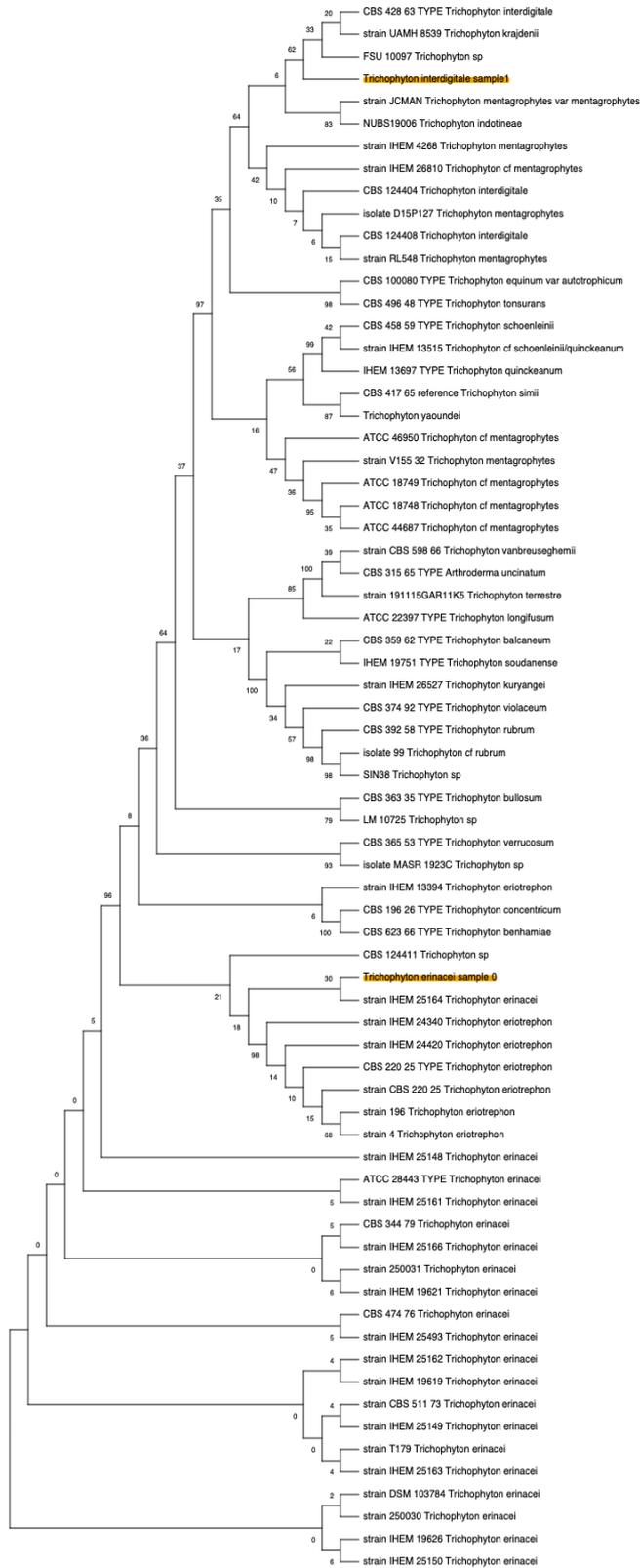


Figura 4. Bootstrap Consensus Tree do gênero *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo Tamura-Nei com distribuição Gama. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

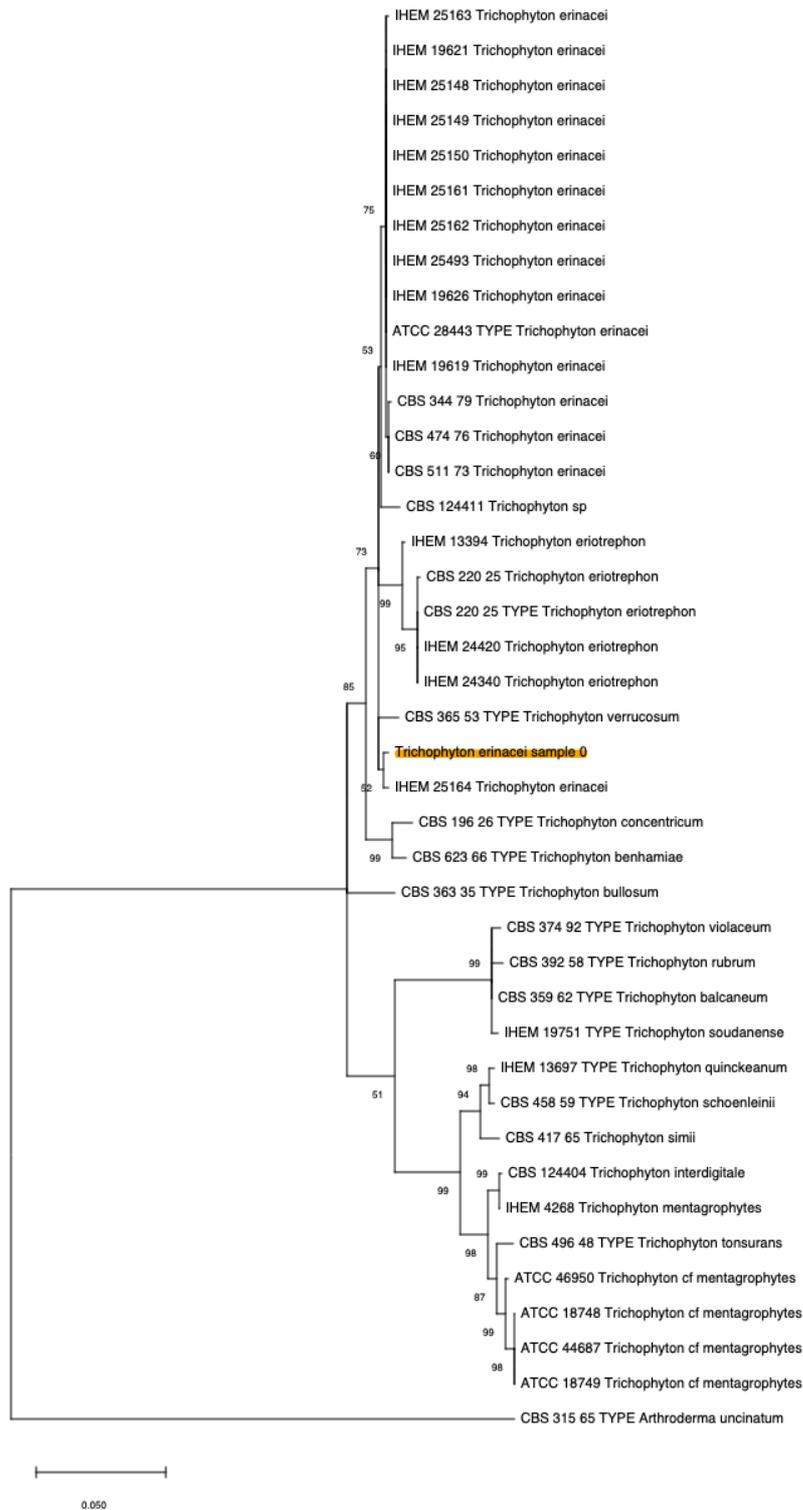


Figura 5. Árvore filogenética com base na análise Maximum Likelihood de um conjunto de dados combinados dos alinhamentos da sequência ITS e *tub2*. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

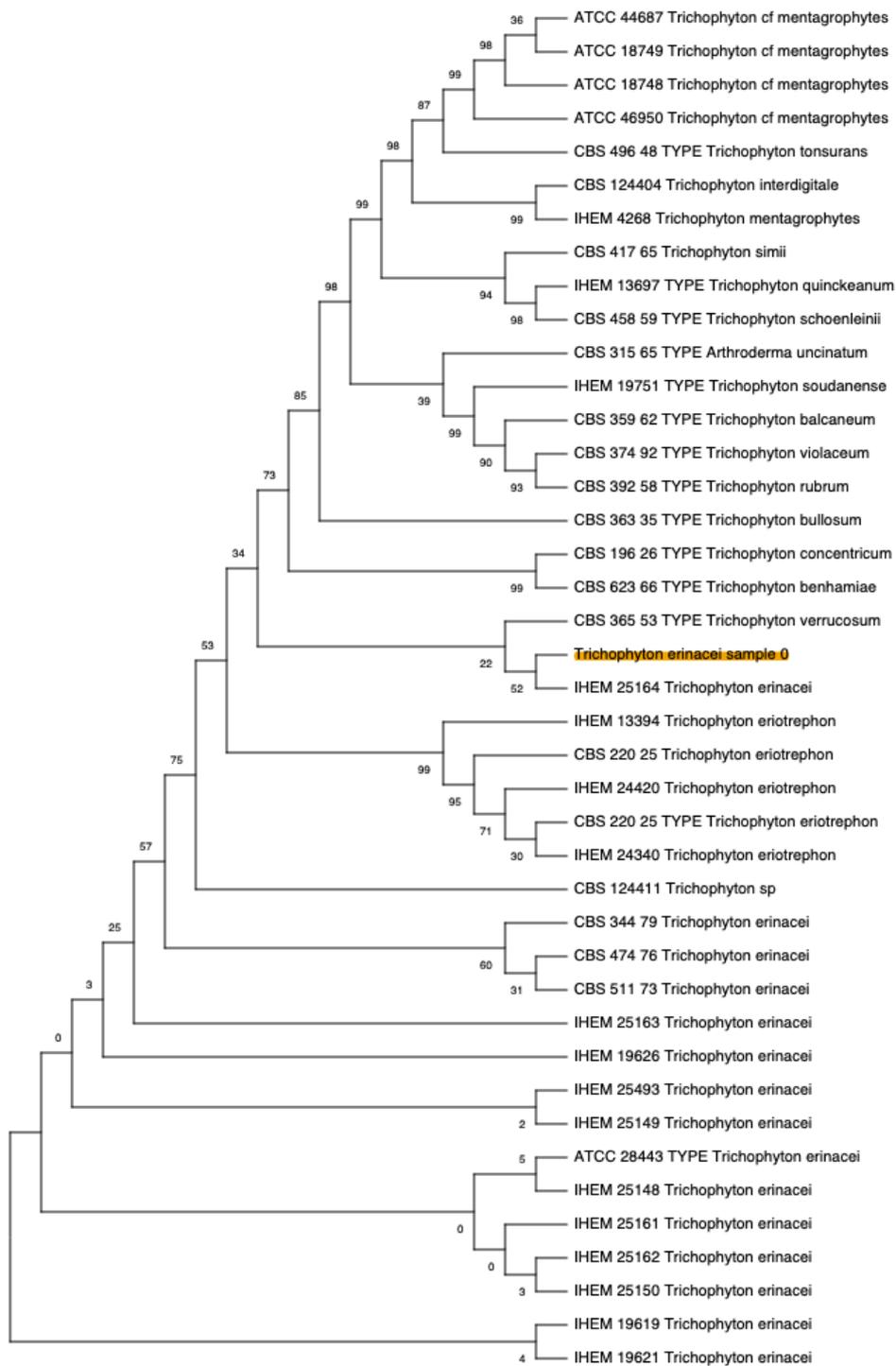


Figura 6. Bootstrap Consensus Tree do gênero *Trichophyton* com base na análise Maximum Likelihood de um conjunto de dados combinados dos alinhamentos da sequência ITS e *tub2*. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

Nas Bootstrap Consensus Tree (Figura 4 e 6) verificou-se uma alteração, no primeiro caso (Figura 7) o isolado encontra-se mais próximo de *Trichophyton eriotrephon* enquanto no segundo caso (Figura 8) o isolado encontra-se mais próximo de *Trichophyton verrucosum*.

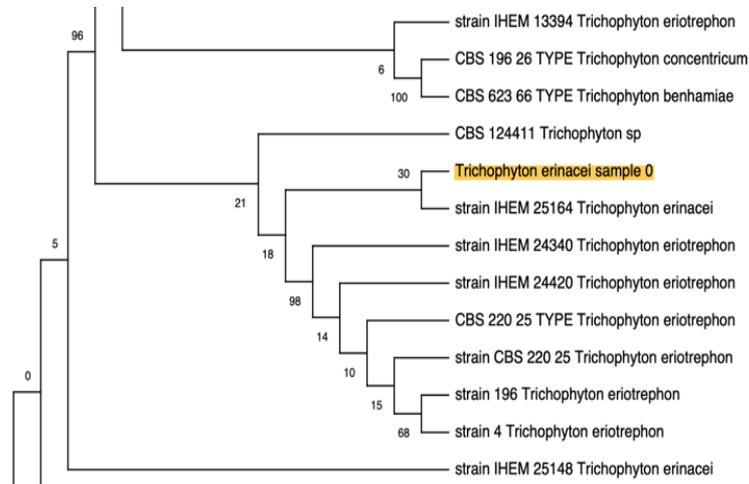


Figura 7. Bootstrap Consensus Tree ITS secção da localização da espécie desconhecida de *Trichophyton*

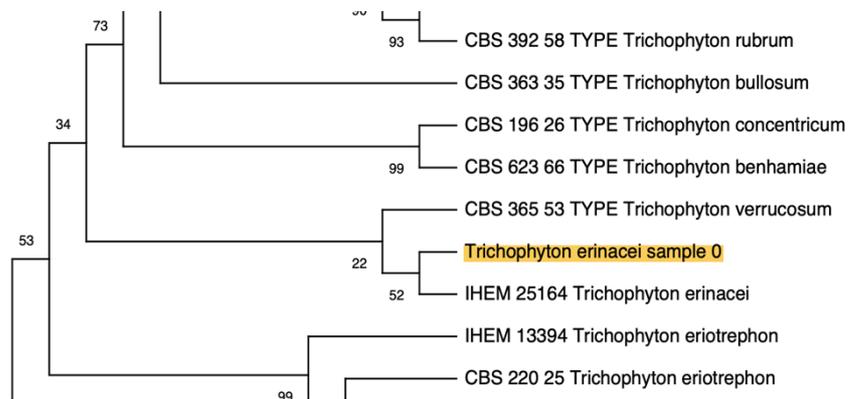


Figura 8. Bootstrap Consensus Tree ITS+tub2 secção da localização da espécie desconhecida de *Trichophyton*

Para os isolados identificados como *Aspergillus terreus* pode-se verificar através da análise da árvore (Figura 9) a proximidade deste isolado com outras estirpes desta espécie de fungo, confirmando assim a sua identificação.

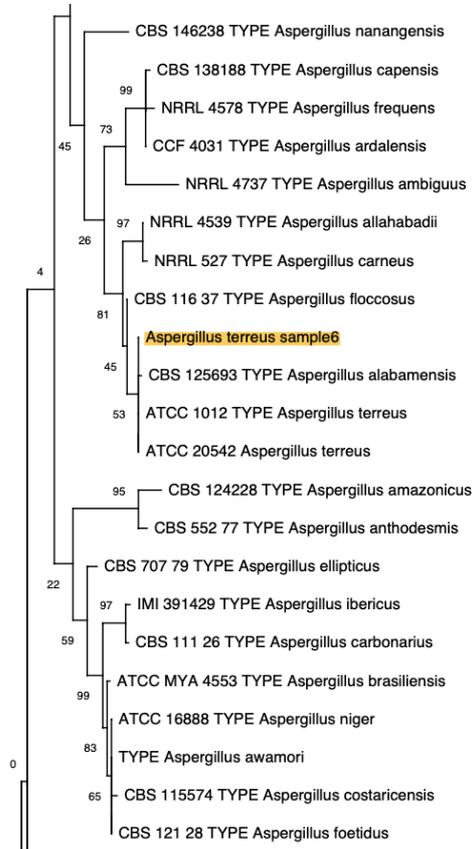


Figura 9. Parte da árvore filogenética do gênero *Aspergillus* com base na análise Maximum Likelihood do alinhamento da sequência ITS. O modelo evolutivo aplicado foi o modelo General Time Reversible com distribuição Gama com locais invariantes. Os valores de bootstrap resultantes de 500 réplicas são apresentados. Os isolados utilizados no estudo são apresentados sublinhados a amarelo.

3.5. Caracterização morfológica

3.5.1. Observação ao microscópio

Na observação de *Aspergillus terreus* ao microscópio (Figura 10) foi possível ver muitas hifas e muitos esporos espalhados pela preparação e foi ainda possível ver alguns conidióforos.

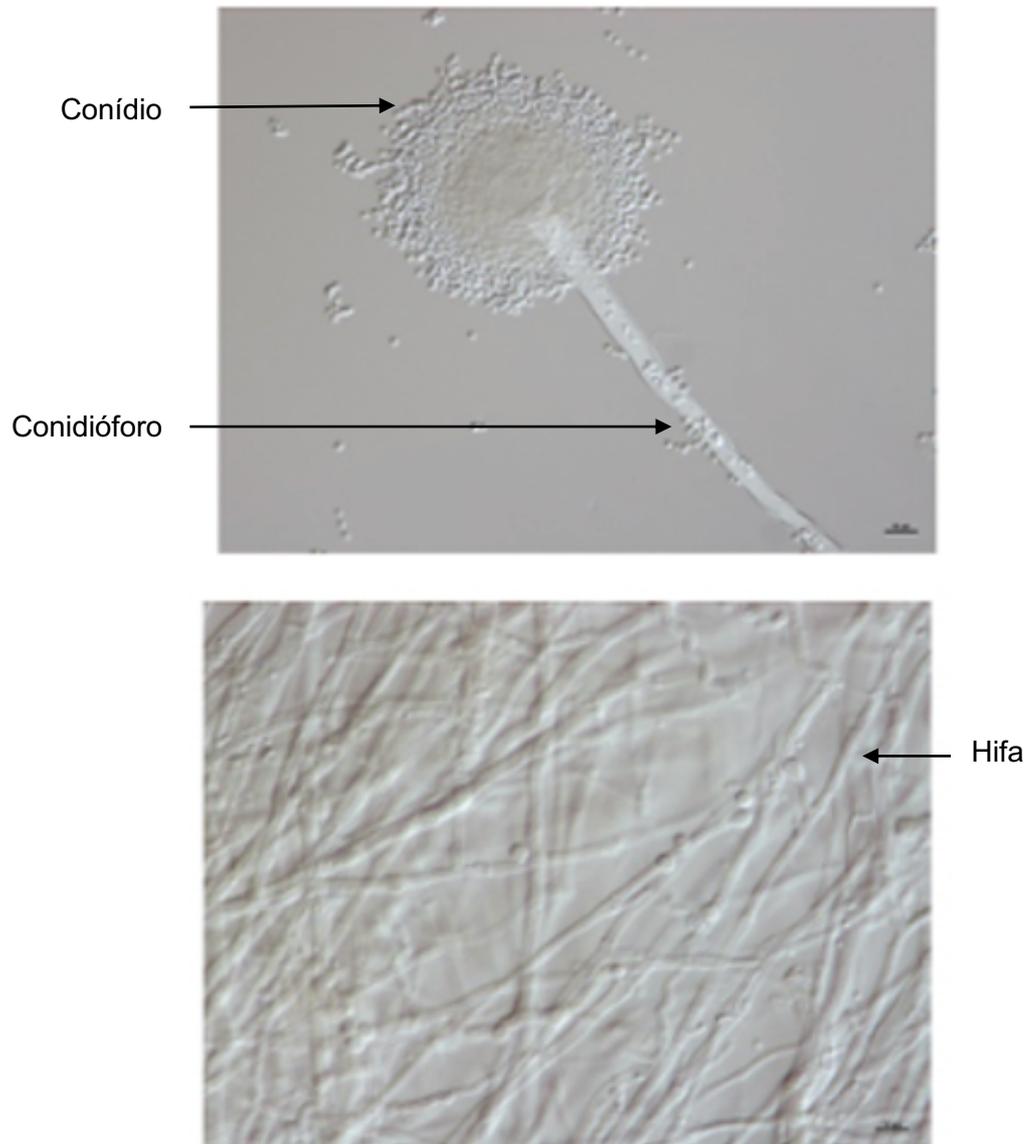


Figura 10. Fotografia da preparação de *Aspergillus terreus* observada ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde 10 μ m

Na observação da espécie desconhecida de *Trichophyton* sp. ao microscópio (Figura 11) observaram-se bastantes hifas com microconídeos, esporos espalhados pela preparação e alguns macroconídeos.

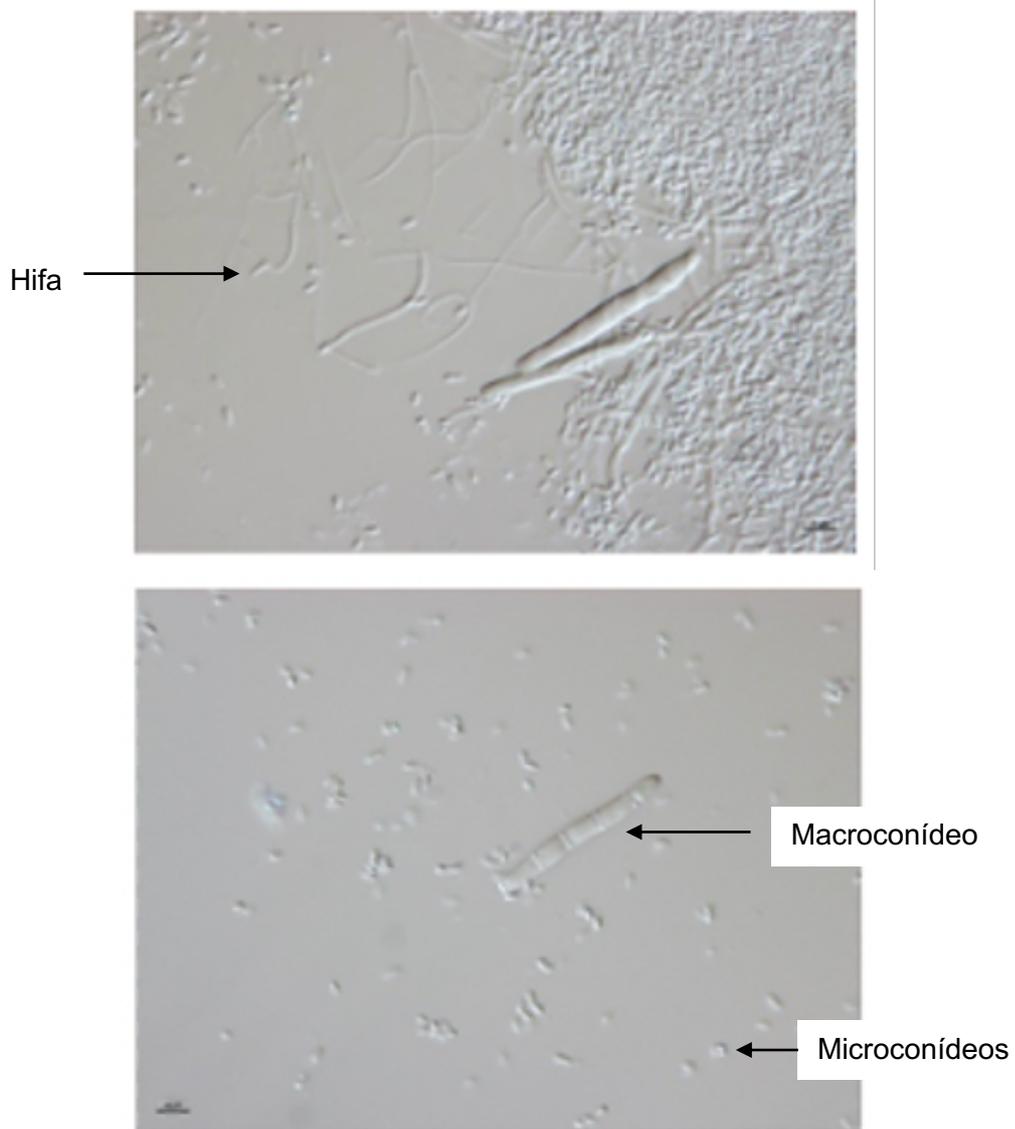


Figura 11. Fotografia da preparação de *Trichophyton* sp. observada ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde a 10 μ m

Na observação de *Trichophyton interdigitale* ao microscópio (Figura 12) foi possível observar hifas e muitos microconídeos,

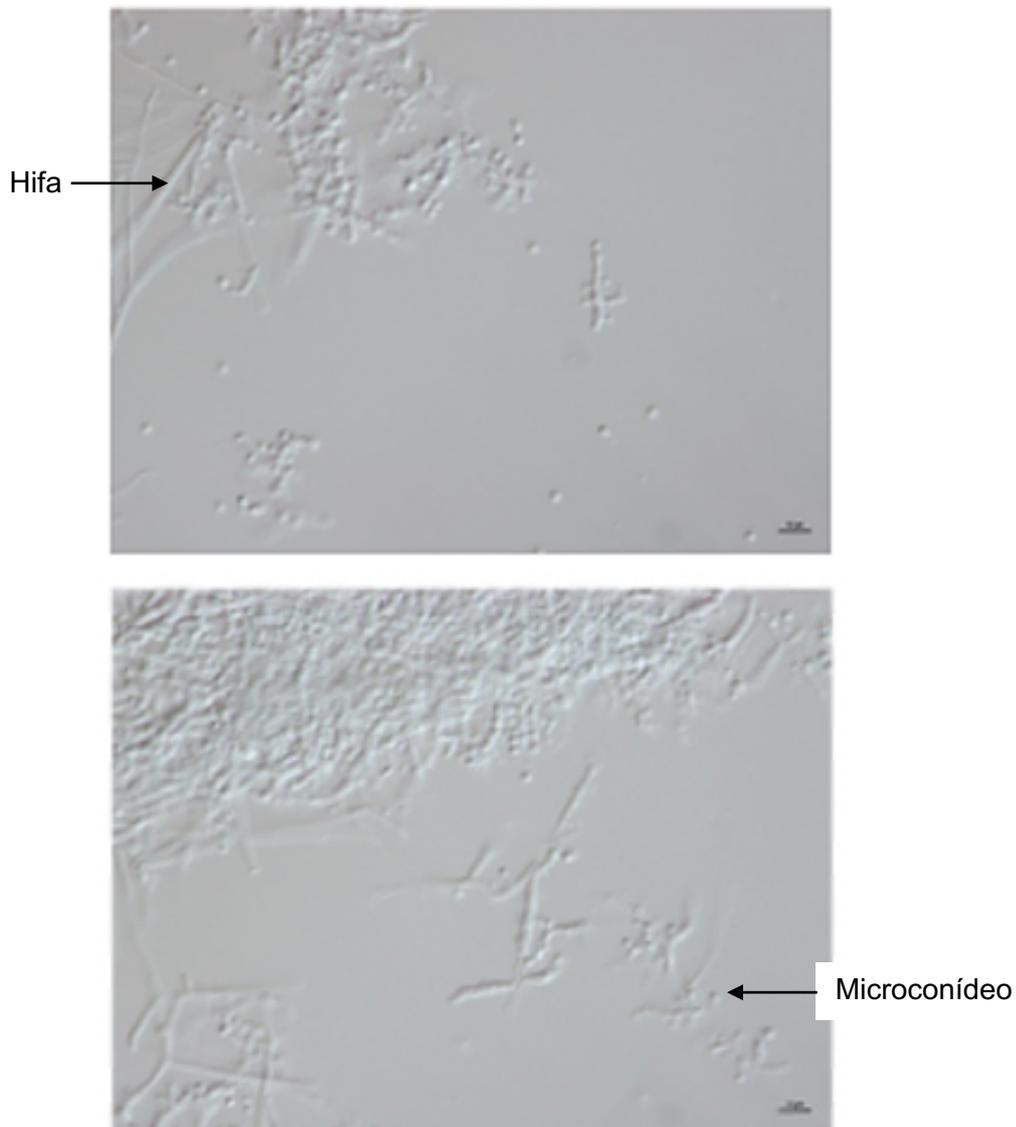


Figura 12. Fotografia da preparação de *Trichophyton interdigitale* observada ao microscópio na objetiva de 40x, a escala na foto corresponde a 10 μ m

3.6. Atividade enzimática

Para a avaliação da atividade enzimática utilizou-se uma análise qualitativa. Para *Aspergillus terreus*, como se pode consultar na Tabela 9, foi observada produção de lipases e proteases (Figura 13A e 13C) nas três temperaturas, em relação às gelatinases (Figura 13B) só foi possível observar atividade a 25° C, enquanto, a 30° C e 37° C não se observou produção desta enzima.

Tabela 9. Atividade enzimática de *Aspergillus terreus*

At. Enzimática	25°C	30°C	37°C
Lipases	+	+	+
Gelatinases	+	-	-
Proteases	+	+	+

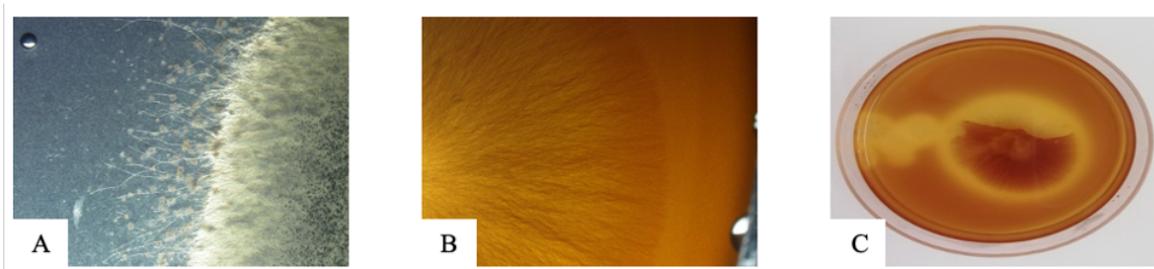


Figura 13. (A) Observação à lupa da cultura de *Aspergillus terreus* a 25° C positiva para lipases; (B) Observação à lupa da cultura de *Aspergillus terreus* a 30° C negativa para gelatinases; (C) Observação da cultura de *Aspergillus terreus* a 25° C positiva para proteases

Para a espécie desconhecida de *Trichophyton*, como se pode consultar na Tabela 10, foi observada produção de lipases (Figura 14A), gelatinases (Figura 14B) e proteases (Figura 14C) nas três temperaturas testadas.

Tabela 10. Atividade enzimática da espécie desconhecida de *Trichophyton*

At. Enzimática	25°C	30°C	37°C
Lipases	+	+	+
Gelatinases	+	+	+
Proteases	+	+	+

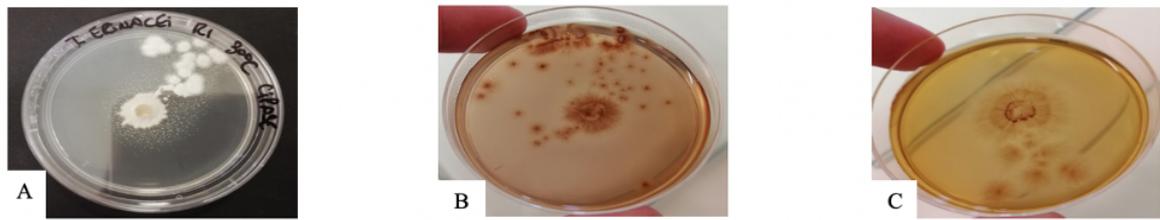


Figura 14. (A) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 30° C positiva para lipases; (B) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 37° C positiva para gelatinases; (C) Observação da cultura da espécie desconhecida de *Trichophyton* a 25° C positivo para proteases

Para *Trichophyton interdigitale*, como se pode consultar na Tabela 11, foi observada produção de lipases (Figura 15A) e gelatinases (Figura 15B) nas três temperaturas testadas e nas proteases (Figura 15C) apenas a 25° C e 30° C foi possível observar atividade.

Tabela 11. Atividade enzimática do *Trichophyton interdigitale*

At. Enzimática	25°C	30°C	37°C
Lipases	+	+	+
Gelatinases	+	+	+
Proteases	+	+	-



Figura 15. (A) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C positiva para lipases; (B) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C positiva para gelatinases; (C) Observação da cultura de *Trichophyton interdigitale* a 37° C negativa para proteases

Foi possível, através da observação do tamanho dos halos e da quantidade de precipitado, verificar que havia uma maior produção de atividade enzimática a 25°C e à medida que a temperatura aumentava a produção diminuía, ao ponto de, em alguns casos, não ser possível observar qualquer atividade.

3.7. Ensaio de crescimento

No ensaio feito para analisar o crescimento dos fungos a diferentes temperaturas foi possível verificar um melhor crescimento a 30° C para *Trichophyton* e à medida que a temperatura subia o crescimento diminuía, para *Aspergillus* verificou-se um maior

crescimento a 37° C e um menor crescimento a 25° C. Podemos verificar estes resultados através das Figuras 16, 17 e 18.

A Figura 16 refere-se a *Trichophyton* sp., nesta figura pode-se ver que houve um crescimento muito mais acentuado à temperatura de 30° C (linha azul) do que à temperatura de 37° C (linha amarela).

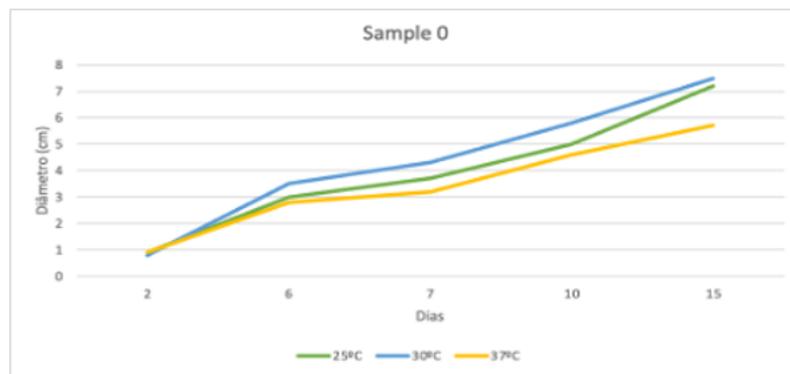


Figura 16. Gráfico do crescimento de *Trichophyton* sp. (sample 0) a 25° C, 30° C e 37° C

A Figura 17 refere-se ao *Trichophyton interdigitale*, nesta figura pode-se verificar o mesmo que no caso anterior, um maior crescimento a 30° C e um menor crescimento a 37° C. Para os *Trichophyton* a segunda melhor temperatura de crescimento foi de 25° C.

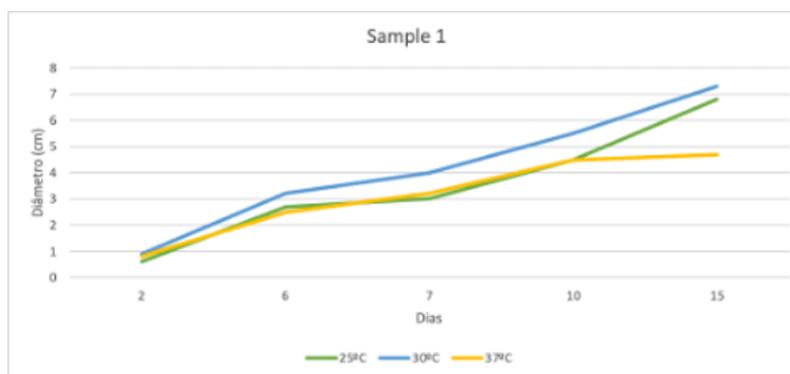


Figura 17. Gráfico do crescimento de *Trichophyton interdigitale* (sample 1) a 25° C, 30° C e 37° C

A Figura 18 refere-se ao *Aspergillus terreus*, nesta figura pode-se ver houve um crescimento muito maior à temperatura de 37° C (linha amarela) que à temperatura de 25° C (linha verde). Para o *Aspergillus terreus* a segunda melhor temperatura de crescimento foi de 30° C.

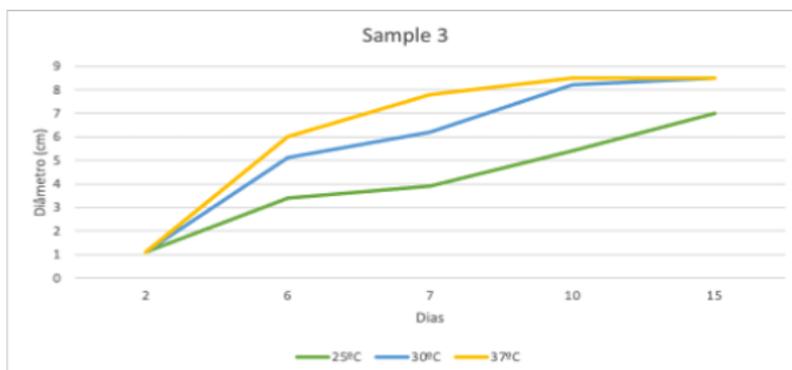


Figura 18. Gráfico do crescimento de *Aspergillus terreus* (sample 3) a 25° C, 30° C e 37° C

Ao longo dos 15 dias de ensaio foram realizadas medições nos dias 2, 6, 7, 10 e 15. Para além das medições também foram tiradas fotografias para acompanhar o desenvolvimento dos fungos de forma a observar as alterações que estes sofriam, como por exemplo na pigmentação e na textura que a cultura ia adquirindo.

Em meio SDA as culturas de *Trichophyton interdigitale* (Figura 20, 23, 26 e 29) possuíam uma cor branca que não se alterou ao longo do tempo e apresentaram uma textura que lembra algodão. As culturas da espécie desconhecida de *Trichophyton* (Figura 19, 22, 25 e 28) possuíam uma cor branca, e tal como no *Trichophyton interdigitale*, não alterou ao longo do tempo e apresentaram uma textura que lembra algodão. As culturas de *Aspergillus terreus* (Figura 21, 24, 27 e 30) no início possuíam uma cor bege que foi ficando castanha ao longo do tempo, inicialmente apresentaram uma textura aveludada tornando-se pulverulenta com o passar do tempo.

Dia 6

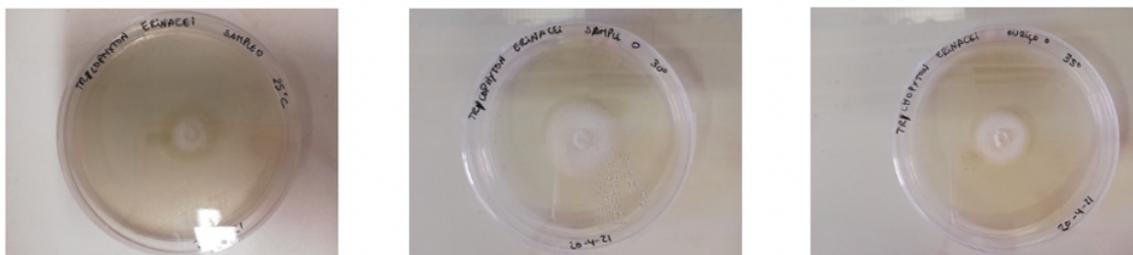


Figura 19. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6



Figura 20. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6

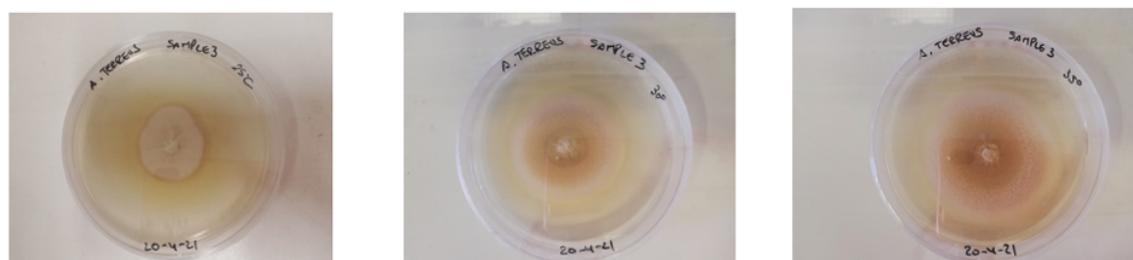


Figura 21. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 6

Dia 7



Figura 22. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7



Figura 23. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7



Figura 24. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 7

Dia 10



Figura 25. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respectivamente, no dia 10



Figura 26. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respectivamente, no dia 10

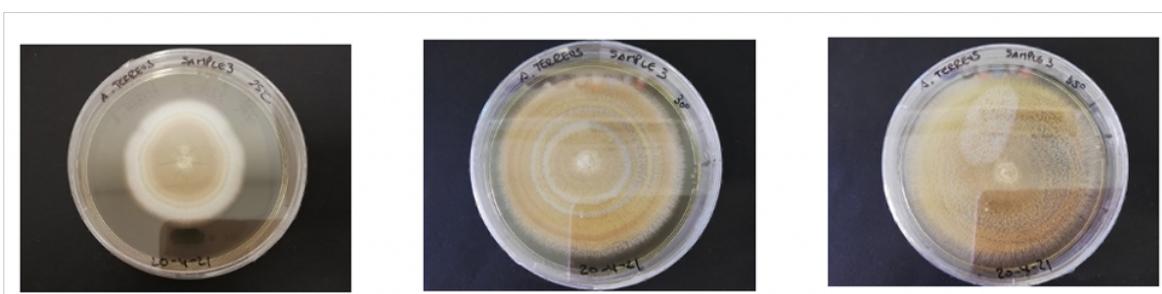


Figura 27. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respectivamente, no dia 10

Dia 15



Figura 28. Fotografias da espécie desconhecida de *Trichophyton* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15



Figura 29. Fotografias de *Trichophyton interdigitale* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15

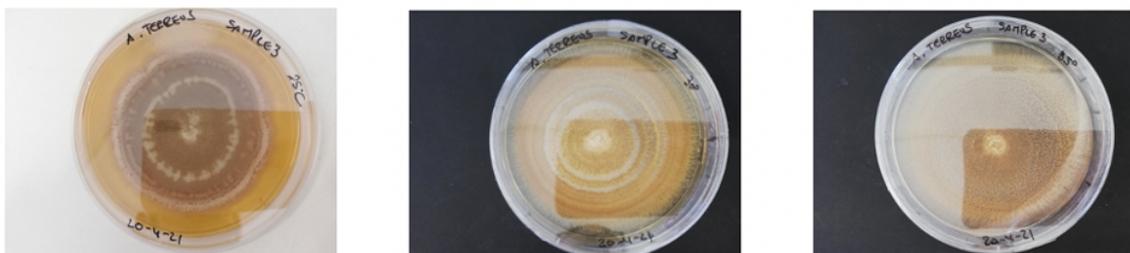


Figura 30. Fotografias de *Aspergillus terreus* em meio SDA a 25° C, 30° C e 37° C, respetivamente, no dia 15

4. Discussão

Neste estudo identificaram-se três espécies diferentes de fungos nas amostras dos ouriços-cacheiros, duas espécies de fungos filamentosos dermatófitos *Trichophyton interdigitale* e uma espécie desconhecida e uma espécie de um fungo filamentoso não-dermatófito *Aspergillus terreus*.

O fungo isolado mais frequentemente foi o *Trichophyton interdigitale*, um dermatófito antropofílico. Devido à proximidade, cada vez maior, dos ouriços aos seres humanos pode-se também esperar cada vez mais situações como esta, ouriços infetados com dermatófitos antropofílicos assim como seres humanos infetados com dermatófitos zoofílicos. Dermatofitoses, ou micoses, têm sido descritas no ouriço, estes animais podem ser portadores assintomáticos e é neste fato que reside o seu potencial de transmissão zoonótica (Riley & Chomel, 2005). Têm sido reportadas várias ocasiões por todo o mundo de dermatófitos transmitidos por ouriços ao ser humano, por exemplo, Philpot & Bowen, 1992 na Nova Zelândia, Weishaupt et al., 2014 na Alemanha e Harada et al., 2019 no Japão. Os dermatófitos zoofílicos têm implicações para a saúde pública e podem ser transmitidos aos humanos por contatos frequentes, portanto, deve-se considerar todo o cuidado ao lidar com animais infetados (Rahimi & Mohammadi 2020).

Na análise filogenética utilizou-se a sequência do ITS dos isolados e confirmou-se a identificação feita inicialmente das espécies *Trichophyton interdigitale* e *Aspergillus terreus*, pois situam-se próximas das estirpes tipo e de outras estirpes destas espécies. Enquanto no caso do isolado identificado inicialmente como *Trichophyton erinacei* verificou-se que se localizava afastado da estirpe tipo e de outras estirpes desta espécie e por isso decidiu-se fazer uma árvore combinada ITS+tub2 para tentar situar este isolado na árvore filogenética do género *Trichophyton*. O isolado continuou afastado das estirpes da espécie *Trichophyton erinacei*, provavelmente o ITS e a tub2 não são os melhores marcadores para este caso, sendo necessário utilizar outros para poder chegar a uma conclusão relativamente à identificação deste isolado.

Diversos fatores estão relacionados com a patogenicidade e virulência dos fungos queratinofílicos, tais como queratinofilia, temperatura ideal de crescimento, capacidade de aderência em tecidos vivos, diversidade fenotípica e síntese de toxinas e enzimas nocivas (Martínez et al., 2014; Lacaz et al., 2002 citado em Moura, 2018) e por isso houve uma preocupação voltada para os fatores de patogenicidade das espécies no estudo.

As enzimas são um fator importante na invasão dos tecidos dos hospedeiros durante o processo infeccioso, relativamente à atividade enzimática os resultados obtidos foram diferentes aos esperados. Verificou-se com uma maior atividade enzimática a 25° C e uma

diminuição desta à medida que a temperatura aumentava, chegando a estar ausente ou então ser tão baixa que não era possível observar a olho nu. Um resultado interessante, uma vez que a temperatura corporal dos ouriços é de 35° C, esperava-se que a atividade enzimática fosse maior à volta desta temperatura. Uma explicação possível para isto é que foi um ensaio *in vitro* com características controladas e muito diferentes às encontradas num caso *in vivo*, onde temos um conjunto de outros fatores que contribuem para o processo de infeção, por exemplo, a microbiota da pele, o estado imunológico dos indivíduos, entre outros fatores.

Nos ensaios de crescimento verificou-se que os fungos do género *Trichophyton* tiveram uma taxa de crescimento maior a 30° C e menor a 37° C e uma taxa de crescimento intermédia a 25° C. Para *Aspergillus terreus* a taxa de crescimento foi maior a 37° C e menor a 25° C e uma taxa de crescimento intermédia a 30° C. Estes resultados também suscitaram interesse uma vez que a temperatura corporal dos ouriços-cacheiros é de 35° C e dos seres humanos é de 37° C, uma vez que o *Trichophyton interdigitale* é uma espécie antropofílica, esperava-se uma melhor taxa de crescimento à volta dessa temperatura. Uma vez mais colocou-se a hipótese de que estes resultados de deverem a ser um ensaio *in vitro* com características controladas e muito diferentes às encontradas num caso *in vivo*, onde temos um conjunto de outros fatores que em contribuem para o processo de infeção.

5. Conclusão

O género encontrado mais frequentemente em amostras de ouriço-cacheiro foi o *Trichophyton*.

Relativamente ao isolado identificado inicialmente como *Trichophyton erinacei*, não foi possível confirmar a sua identificação sendo necessário usar outros marcadores moleculares para se confirmar se este isolado pertence efetivamente aquela espécie ou se, na verdade, se trata de uma nova espécie.

Foram detetadas atividades enzimáticas que pode eventualmente estar relacionadas com a patogenicidade destes fungos.

Serão necessários estudos futuros para uma caracterização mais detalhada da diversidade de dermatófitos presentes em ouriço-cacheiro em Portugal.

6. Bibliografia

1. Ajello, L. (1962). Present day concepts in the dermatophytes. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 17:315-324
2. Albano, A.P.N. (2009). Fungos e micoses em animais silvestres recebidos por Centros de Triagem. Universidade Federal de Pelotas
3. Alio, A.B., Mendoza, S.M, Zambrano, E.A., Diaz, E., Cavallera, E. (2005). Dermatophyte's growth curve and in vitro susceptibility test: a Broth micro-titration method. *Medical Micology* 43, 319-325
4. Bexton, S. & Robinson, I. (2003). *BSAVA Manual of Wildlife Casualties*. BSAVA, 1ª Ed., 49-65
5. Brouta, F., Descamps, F., Monod, M., Vermout, S., Losson, B., & Mignon, B. (2002). Secreted Metalloprotease Gene Family of *Microsporum canis*. *Infection and Immunity*, 70(10), 5676-5683. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.10.5676-5683.2002>
6. Cabañes, F.J. (2020). Hedgehogs, ringworm and zoonosis: They can itch a lot! *Rev Iberoam Micol.* <https://doi.org/10.1016/j.riam.2020.03.002>
7. Catro, R. (2010). Diagnóstico Laboratorial em Microbiologia clínica. In W.F.C. Ferreira, J.C.F. Sousa, N. Lima. *Microbiologia* (pp. 412-417). LIDEL
8. Chmel, L. (1980). Zoophilic dermatophytes and infections in man. *Med. Mycol.* 8(Suppl.):61-66
9. Georg, L.K. (1960). Epidemiology of the dermatophytosis: sources of infection modes of transmission and epidemcity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 89:69-77
10. Gruby, D. (1841). Mémoire sur une végétation qui constituent la vraie teigne. *C.R. Acad. Sci.* 13:72-75
11. Gruby, D. (1841). Sur les mycodermes qui constituent la teigne faveuse. *C.R. Acad. Sci.* 13:309-312

12. Gruby, D. (1843). Recherches sur la nature, le siège et le développement du porrigo decalvans ou phytoalpécie. C.R. Acad. Sci. 17:301-302
13. Gruby, D. (1844). Recherches sur les cryptogames qui constituent la maladie contagieuse du cuir chevelu décrite sous le nom de Teigne Tondante (Mahon), Herpes tonsurans (Cazenave). C.R. Acad. Sci. 18:583-585
14. Harada, K., Hiruma, J., Maeda, T., & Tsuboi, R. (2019). Case of tinea manuum transmitted by a hedgehog in an animal café. The Journal of Dermatology, e344-e345. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14894>
15. Hof, A.R. *et al.* (2012). Food or fear? Predation risk mediates edge refuging in an insectivorous mammal. *Animal Behaviour* 83, 1099-1106
16. Hubert, P. *et al.* (2011). Ecological factors driving the higher hedgehog (*Erinaceus europeus*) density in an urban area compared to the adjacent rural area. *Landscape and Urban Planning* 103, 34-43
17. Kargl, A., Kosse, B., Uhrlab, S., Koch, D., Kruger, C., Eckert, K., & Neonoff, P.O. (2018). Fungos de ouriço no consultório de um dermatologista em Munique. *O Dermatologista*, 69, 576-585
18. Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G. S., Ruiz, J. C., Blom, J., Horácio, E. C. A., Queiroz, M. V. (2017). Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(10), 14. doi:10.1007/s11274-017-2347-x
19. Lacaz, C.S., Porto, E., Martins, J.E.C., Heins-Vaccari, E.M., & Takahashi De Melo, N. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. Prefácio: Bertrand Dupont. 9. Ed. São Paulo, Sarvier. 1104p. ilus. ISBN 85-73-78-123-8
20. Lemsaddek, A. (2008). Estudos de dermatófitos por métodos moleculares: identificação, resistência a antifúngicos e virulência. Universidade de Lisboa

21. Maifrede, S.B. (2009). Fungos associados às onicomicoses: Prevalência e suscetibilidade a drogas antifúngicas. Universidade Federal do Espírito Santo
22. Marques, A. (2016). Ouriço-cacheiro (*Erinaceus europaeus*) Abordagem clínica a um paciente difícil. Universidade do Porto
23. Martínez, E., Ameen, M., Tejada, D., Arenas, R. (2014). *Microsporum* spp. Onychomycosis: disease presentation, risk factors and treatment responses in an urban population. Brazilian Journal of Infectious Diseases, 18(2), 181-186. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2013.08.005>
24. Mayr, A. (1989). Infections which humans in the household transmit to dogs and cats. Zentralbl. Mikrobiol. Hyg. Ser. B 187:508-526
25. Möller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H., and Geiger, H.H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucl. Acids Res. 20, 6115-6116
26. Monod, M. (2019). Antifungal resistance in dermatophytes: Emerging problem and challenge for the medical community. Journal de Mycologie Médicale 29, 283-284
27. Morris, P. (2014). Hedgehogs (The British Natural History Collection). Whittet Books Ltd., 3ª Ed, 8-25, 127-130
28. Moura, M. (2018). MODELO IN VITRO DE DERMATOFITOSE UNGUEAL: uma análise da patogenicidade fúngica e aspectos morfológicos. Universidade Federal de Pernambuco
29. Osborne, C.S., Leitner, I., Favre, B., Ryder, N.S. (2005). Amino acid substitution in *Trichophyton rubrum* squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. Antimicrob Agents Chemother 49, 2840-4

30. Osborne, C.S., Leitner, I., Hofbauer, B., Fielding, C.A., Favre, B., Ryder, N.S. (2006). Biological, biochemical, and molecular characterization of a new clinical *Trichophyton rubrum* isolate resistant to terbinafine. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 50, 2234-6
31. Peres, N., Maranhão, F., Rossi, A., Martinez-Rossi, N. (2010). Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiro de Dermatologia*, 85(5), 657-667
32. Pfäffle, M. (2010). Influence of parasites on fitness parameters of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Tese de Doutorado, Universidade de Heilbronn, Alemanha, 17-22, 185
33. Philpot, C.M., & Bowen, R.G. (1992). Hazards from hedgehogs: two case reports with a survey of the epidemiology of hedgehog ringworm. *Clinical and Experimental Dermatology*, 17(3), 156-158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.1992.tb00193.x>
34. Poel, J.L., Dekker, J., Langevelde, F. (2015). Dutch hedgehogs *Erinaceus europaeus* are nowadays mainly found in urban areas, possibly due to the negative effects of badgers *Meles meles*. *Wildlife Biology* 21, 51-55
35. Remak, R. (1845). Diagnostische und pathogenetische Untersuchungen in der Klinik des Herrn Geh. Rath's DR. Schoenlein auf dessen Veranlassung angestellt und mit Benutzung anderweitiger Beobachtungen veröffentlicht, A. Hirschwald, Berlin
36. Rahimi, T., & Mohammadi, R. (2020). Identification of dermatophyte and nondermatophyte molds isolated from animal lesions suspected to dermatomycoses. *Advanced Biomedical Research*, 9(1), 4. https://doi.org/10.4103/abr.abr_230_19
37. Rautio, A., Isomursu, M., Valtonen, A., Hirvelä-Koski, V., Kunnasranta, M. (2016). Mortality, diseases and diet of European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) in an urban environment in Finland. *Mammal Research* 61, 161-169

38. Riley, P.Y., & Chomel, B.B. (2005). Hedgehog zoonoses. *Emerging Infectious Diseases*, 11(1), 1-5. <https://doi.org/10.3201/eid1101.040742>
39. Saunte, D.M.L., Hare, R.K., Jørgensen, K.M., Jørgensen, R., Deleuran, M., Zachariae, C.O., Thomsen, S.F., Biørnskov-Halkier, L., Kofoed, K., Arendrup, M.C. (2019). Emerging terbinafine resistance in *Trichophyton*: clinical characteristics, squalene epoxidase gene mutations and a reliable EUCAST method for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 63, 01126-19. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC01126-19>
40. Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. (2004). *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 388
41. Seeliger, H.P. (1985). The discovery of *Achorion schoenleinii*. Facts and “stories”. *Mykosen*, 28(4), 161-182
42. Schoenlein, J.L. (1839). Zur Pathogenie der Impetiginen. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, p. 82
43. Tomé, C. (2019). Classification of dermatophytes by a multilocus phylogenetic approach based on Tef-1 α , beta tubulin and ITS genes. Universidade de Lisboa
44. Valente, J. (2014). Estudo molecular de estirpes de *Aspergillus fumigatus* isolados em aviários e em aves diagnosticadas com aspergilose. Possíveis implicações na Saúde Pública. Universidade Nova de Lisboa
45. Wagner, D.K., Sohnle, P.G. (1995). Cutaneous defenses against dermatophytes and yeast. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, 317-335
46. Weitzman, I., & Summerbell, R.C. (1995). The Dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2), 240-259. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1935.tb00483.x>
47. Weishaupt, J., Kolb-Mäurer, A., Lempert, S., Nenoff, P., Uhrlaß, S., Hamm, H., & Goebeler, M. (2014). A different kind of hedgehog pathway: tinea manus due to *Trichophyton erinacei* transmitted by an African pygmy hedgehog (*Atelerix albiventris*). *Mycoses*, 57, 125-127. <https://doi.org/10.1111/myc.12113>

48. Wroot, A.J. (1985). Foraging in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. *Mammal Rev*, 15:2
49. Yamada, T., Maeda, M., Alshshni, M.M., Tanaka, R., Yaguchi, T., Bontems, O., Salamin, K., Fratti, M., & Monod, M. (2017). Terbinafine resistance of *Tricoglyphon* clinical isolates caused by specific point mutations in the squalene epoxidase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 61, e00115-17

7. Anexos

7.1. Extração de DNA

7.1.1. Tampão TES

Tabela 12. Preparação do tampão TES

Tampão TES	
Tris 1M, pH=8	10mg
EDTA 5M, pH=8	2mg
SDS 10%	20mg

Adicionar todos os componentes num frasco, adicionar água destilada até perfazer 100mL e autoclavar.

7.1.2. Cloreto de Sódio (NaCl)

Tabela 13. Preparação de NaCl

NaCl	
NaCl	29,22g
Água Destilada	50mL

Adicionar o NaCl num frasco, adicionar

7.1.3. Brometo de Cetiltrimetilamónio (CTAB)

Tabela 14. Preparação de CTAB

CTAB	
CTAB	10g
Água Destilada	100mL

Adicionar todos os componentes num frasco e autoclavar.

7.1.4. Acetato de Amónio (NH₄OAc)

Tabela 15. Preparação de NH₄OAc

NH ₄ OAc	
Acetato de Amónio	38,54g
Água Destilada	80mL

Adicionar todos os componentes num frasco e autoclavar.

7.1.5. Tampão TE

Tabela 16. Preparação do tampão TE

Tampão TE	
Tris- HCL 1M, pH=8	1mL
EDTA 0,5M, pH=8	200 μ L

Adicionar os componentes num frasco, adicionar água destilada até perfazer 100mL e autoclavar.

7.2. Gel de Agarose

Para realizar a eletroforese é necessário preparar o gel de agarose.

Tabela 17. Preparação do gel de agarose

Gel de Agarose	
Agarose 1,5%	1,35g
TAE 1X	90mL

Adicionar a agarose e o TAE num frasco de 200mL e colocar no micro-ondas, no programa de descongelar, cerca de 10 minutos (até ficar translucido). Deixar arrefecer um pouco e colocar no suporte e esperar que fique sólido.