

Molecular Characterization of *Trichophyton Verrucosum* Strains Isolated From Cattle by PCR-RFLP

Osman Yaşar TEL¹, Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE^{1*}, Oktay KESKİN¹, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK¹

¹ Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 63000, Şanlıurfa, Turkey

ABSTRACT

Dermatophytes infect tissues containing keratin in humans and animals, causing dermatophytosis infection. *Trichophyton verrucosum* is the most common agent of bovine dermatophytosis cases. Trichophytosis causes big economic lossess throughout the world and also threatens human health by being a zoonosis. *T. verrucosum* is usually isolated from cattle. Cattle are the natural reservoirs of this agent. The aim of this study is to isolate disease-causing dermatophytes in cattle and to carry out molecular separation of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of the isolated *T. verrucosum* strains by PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). For this purpose, 90 samples were taken from the cattle with dermatophytosis for cultural examination. As a result of the culture of these samples, 35 (38.8%) *T. verrucosum* were isolated and identified. DNA isolation of these strains was made and amplification of ITS regions was performed. It was only one RFLP profile was found according to the results of RFLP analysis of *T. verrucosum* strains using MvaI and HinfI enzymes. At the end of study, it was founded that the isolated *T. verrucosum* strains showed a single profile by PCR-RFLP analysis and PCR-RFLP was a useful tool for the molecular characterization of the strains. It was also concluded that PCR-RFLPs of strains from different regions or even from different countries might be necessary in order to detect different profiles of the tested samples.

Keywords: Cattle, Dermatophytosis, PCR-RFLP, *Trichophyton verrucosum*.

Sığırlardan İzole Edilen *Trichophyton Verrucosum* Suşlarının PCR –RFLP ile Moleküler Karakterizasyonu

ÖZ

Dermatofitler, insan ve hayvanlarda keratin içeren dokuları infekte ederek dermatofit infeksiyonuna neden olmaktadır. *Trichophyton verrucosum* sığır dermatofitozis olgularının en yaygın etkenidir. Trichophytosis, bütün dünyada hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olması yanında zoonoz olmasıyla da insan sağlığını tehdit etmektedir. Sığırlardan genellikle *T. verrucosum* izole edilmektedir. Sığırlar bu etkenin doğal rezervuarıdır. Bu çalışmanın amacı, sığırlarda hastalığa neden olan dermatofitlerinin izolasyonu ve izole edilen *T. verrucosum* suşlarının Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerinin PCR-RFLP ile moleküler ayrımının yapılmasıdır. Bu amaçla dermatofitozisli sığırlardan 90 adet örnek alınarak kültürleri yapıldı. Bu örneklerin kültürü sonucunda 35 (%38,8) adet *T. verrucosum* izole ve tanımlandı. Bu suşların DNA izolasyonu gerçekleştirilerek ITS bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirildi. *T. verrucosum* suşlarının MvaI ve HinfI enzimleri kullanılarak yapılan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizleri sonucunda bir adet RFLP profiline rastlandı. Sonuç olarak, izole edilen *T. verrucosum* suşlarının PCR-RFLP sonucunda tek bir profile sahip olduğu, farklı profil örneklerinin saptanması için farklı bölgelerden hatta farklı ülkelerden suşların PCR-RFLP'lerinin yapılması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dermatofitozis, PCR-RFLP, Sığır, *Trichophyton verrucosum*

To cite this article: Tel O.Y., Güllü Yücepe A., Keskin O., Erdenliğ Gürbilek S. Molecular Characterization of *Trichophyton Verrucosum* Strains Isolated From Cattle by PCR-RFLP. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):51-56

Submission: 24.07.2020 Accepted: 01.02.2021 Published Online: 18.02.2021

ORCID ID; OYT: 0000-0001-7848-3899, AGY: 0000-0002-9842-3305, OK: 0000-0002-5977-7872, SEG: 0000-0002-0377-2650

*Corresponding author e-mail: ayfergullu@harran.edu.tr

GİRİŞ

Dermatofitozis pet ve çiftlik hayvanlarında en sık görülen mantar enfeksiyonudur. Günümüzde hayvan ve insanlarda enfeksiyona yol açan dermatofitler; *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* olarak 3 cins içinde sınıflandırılırlar. Evcil hayvanlardan çok farklı türde dermatofitler izole edilmesine rağmen, yalnızca *Microsporum* ve *Trichophyton* cinsine ait birkaç zoofilik tür (*M. canis*, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, ve *M. gypseum*) enfeksiyonların çoğundan sorumludur. Sığırlarda hastalık vakalarının çoğundan sorumlu olan en yaygın tür, *Trichophyton verrucosum*'dur. Zoonotik öneme sahip *T. verrucosum* türlerinin alt tiplerini belirlemek, hastalığın tedavisi ile yayılmasını önleme ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır (Arda, 1980).

Mantar türlerinin alt tiplerini belirlemek için çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Fakat halen altın standart denilecek bir yöntem belirlenmemiştir. Mitokondrial DNA'daki kesim bölgesi polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP), DNA üzerinde ribozomal RNA'nın (rRNA) kodlandığı bölgede (rDNA) bulunan internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin sekanslanması (Jackson ve ark. 1999, Mochizuki ve ark. 1999) ve polymerase chain reaction (PCR) [RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrarily primed) ve PCR fingerprinting], tür ve suşların ayırt edilmesinde önemli yararlar sağlamıştır (Kac 2000, Thomas ve Xu, 2002). PCR-RFLP *T. verrucosum*'un intraspesifik polimorfizminin ortaya çıkarılmasında değerli bir araç olduğu düşünülmektedir (Mirzahoseini ve ark. 2009). Hinfl ve MvaI enzimleriyle ITS I PCR ürünlerini kestikleri çalışmada 2 adet *T. verrucosum* profili elde etmişlerdir. Tip II profilin en yaygın profil olduğunu belirtmişlerdir (Neji ve ark. 2016).

Bu çalışmanın amacı, sığırlarda hastalığa neden olan *T. verrucosum* izolasyonu ve izole edilen *T. verrucosum* suşlarının Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerinin PCR-RFLP ile moleküler ayrımının yapılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinin farklı ilçe ve merkez ilçelerinden Mikrobiyoloji Anabilim Dalına yapılan başvurular doğrultusunda teşhis amacıyla örnekler toplandı. Örnekler, genellikle aile tipi küçük işletmelerden farklı cinsiyet ve yaşlardaki hayvanlardan alındı (Tablo 1). Bu amaçla klinik olarak dermatofitoz şüpheli hayvanlardan *T. verrucosum* yönünden incelenmek üzere toplam 90 sığır orijinli örnek (deri döküntüleri ve kıl) alındı. Örnek alınmadan önce derideki büyüklüğü, lezyonların yeri, şekli, yayılma durumu gibi önemli noktalara dikkat edilerek, lezyon ve çevresi %70'lik alkol ile iyice silindi ve deri döküntüleri steril bistüri ile alındı, kıllar ise

steril bir pensle çekilerek steril materyal kaplarına alındı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı

Kültür

T. verrucosum üretilmesi amacıyla Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Merck, Darmstadt, Germany)'a thiamine (4 mg/ml), inositol (100 mg/ml), cycloheximide (0,5 mg/ml) ve chloramphenicol (0,1 mg/ml) katılarak kullanıldı. Laboratuvara getirilen örneklerden SGA'a ekimler yapıldı. Besiyerleri, 37°C'lik etüvde 3-4 günde bir oluşan üremeler kontrol edilerek dört hafta süreyle inkübasyona bırakıldı. Laktofenol pamuk mavisi boyası kullanılarak kolonilerden bir kısım alınarak lam-lamel arası preparatlar hazırlandı. İnkübasyon sonunda kolonilerin üreme hızları, yüzey renkleri, morfolojileri, tabandaki pigmentleri ve mikroskopik incelemede konidyumların varlığı, hiflerin yapısı göz önüne alınarak *T. verrucosum* yönünde identifikasyonları gerçekleştirildi (Larone, 2002). Ayrıca *Trichophyton* şüpheli kolonilerin *Trichophyton* agara subkültürleri yapılarak makroskopik ve mikroskopik özellikleri incelendi.

Moleküler Metodlar

DNA Ekstraksiyonu

Liu ve ark. (2000)'nın bildirdiği DNA ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre steril öze ile az miktarda miselyum 500 µl'lik lizis solüsyonu (400 mM Tris-HCl [pH 8,0], 60 mM EDTA [pH 8,0], 150 mM NaCl, %1 SDS) içeren bir ependorf tüpüne alınarak, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu tüpe 150 µl potasyum asetat solüsyonu eklendikten sonra, tüp hafifçe vortekslelendikten sonra, 14.000 devirde 1 dk. santrifüje edildi. Süpernatant başka bir ependorf tüpüne aktarılarak, tekrar yukarıdaki şartlarda santrifüje edildi. Elde edilen süpernatant nükleaz-ari bir ependorf tüpüne aktarılarak üzerine eşit hacimde izopropil alkol eklendi. Tüp hafifçe ters yüz edilerek karıştırıldı ve 12.000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pelet kaybedilmeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Elde edilen DNA peleti, 300 µl %70'lik etanol ile vortekslenip santrifüje edilerek yıkandı. Pelet 10.000 devirde 1 dakika santrifüje edildikten sonra, süpernatant atılarak ve DNA peleti oda sıcaklığında tutularak kurutuldu. DNA peleti 50 µL nükleazsız su içerisinde çözüldü

ITS Bölgesinin PCR İşlemi ile Çoğaltılması

PCR reaksiyon karışımı; 5 µl template DNA, 1,5-3 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP karışımı, 0,7 µM primerler (ITS1, ITS4), 1/10 reaksiyon buffer, 1,25 U Taq DNA polimeraz ve son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile sudan oluştu. PCR inkübasyon, sıcaklık ve süreleri sırasıyla, 94°C 'de 3 dakikalık ilk denatürasyon, 94°C'de 1 dakikalık denatürasyon, 60°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 1 dakikalık ekstensiyonu içeren 35 sıklıktan oluştu (Hsiao ve ark. 2005). İzole edilen *T. verrucosum* suşlarının ITS bölgesini çoğaltmak için PCR işleminde

kullanılmak üzere White ve ark. (1990) tarafından oldukça duyarlı ve özgün olduğu bildirilen mantarlara özgü universal primerler kullanıldı.

Forward primer olarak: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
Reverse primer olarak: ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATGA TATGC-3').

PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi ve Pürifikasyonu

Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile ayrımlanarak UV ışığı altında kontrol edildi.

PCR-RFLP

Bu amaçla *Hin*I ve *Mva*I (Thermo Scientific, USA) enzimleriyle PCR ürünleri kesildi. Bütün işlemler üretici firmanın protokolleri doğrultusunda yapıldı. Reaksiyon karışımı

10 ul PCR reaksiyon ürünü (~0.1-0.5 µg of DNA)

17 ul nukleaz içermeyen su

2 ul 10x buffer

2 ul enzim (*Hin*I veya *Mva*I) 'den oluştu.

Bu karışım hafifçe birkaç dakika karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1-16 saat inkübasyona bırakıldı.

ITS Bölgesinin Sekanslanması

PCR ürünleri Big Dye Cycle Sequencing kit v 3.1 kullanılarak ABI PRISM 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems) ile çift taraflı olarak sekanslandı. Elde edilen sekans bilgileri Bioedit Alignment Sequence Editor ile incelendi (Hall, 1999). Tespit edilen sekanslar, web tabanlı BLAST programı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak GenBank'tan elde edilen benzer sekanslarla karşılaştırıldı.

BULGULAR

Toplam 90 sığra ait örneklerin kültür ile incelenmesi sonucunda, 35 (%38,8) örnekte makroskobik ve mikroskobik olarak *T. verrucosum* olarak tanımlanan üremeler görüldü (Tablo 1).

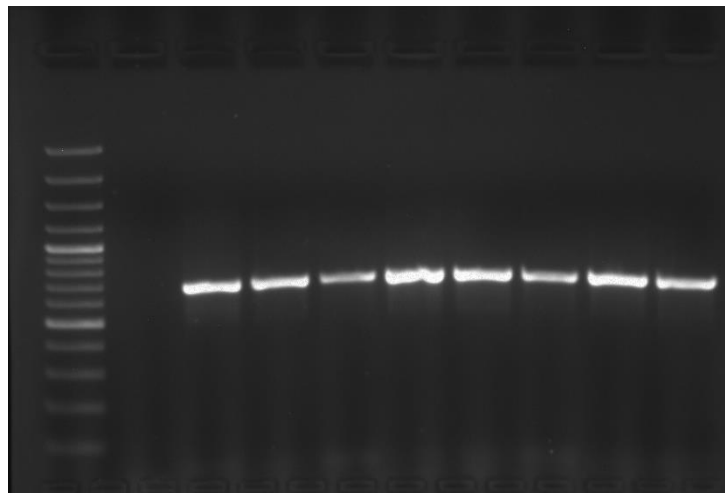
Tablo 1. İncelenen örneklerin yaş gruplarına ve bölgelere göre dağılımı.

Table 1. Distribution of the studied samples by age groups and regions.

Örnek alınan bölge	Örnek alınan işletme sayısı	Yaş grupları						Toplam	
		0-6 ay		6 ay- 1 yaş		1 yaş ve üzeri		Alınan örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı
		Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı	Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı	Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı		
Suruç	2	10	8	10	9	-	-	20	17
Bozova	1			2	1	12	1	14	2
Haliliye	4	19	4	4	1	-	-	23	5
Eyyübiye	4	11	4	8	5	14	2	33	11
Toplam	11	40	16	24	16	26	3	90	35

Bu örneklerin ITS bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu sonucunda 622 bp'de bantlar görüldü (Şekil 1). PCR ürünlerinin sekanslanması sonucunda

izole edilen bütün suşların *T. verrucosum* olduğu saptandı.

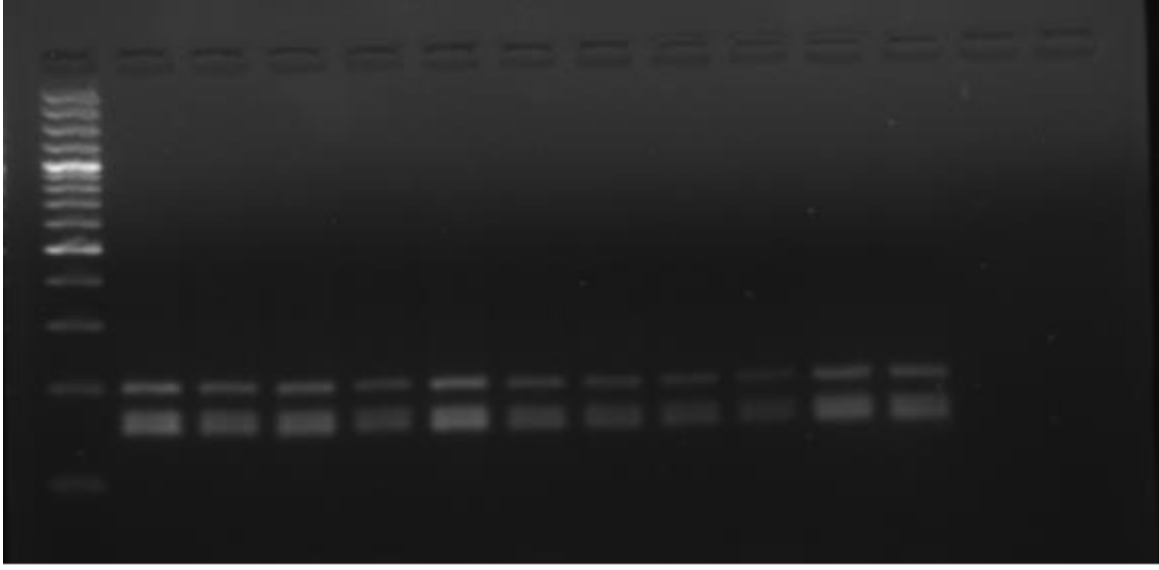


Şekil 1: *T. verrucosum* suşlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşları, 1,2,3,4,5,6,7,8 (622 bp)

Figure 1: Agarose gel view of PCR products of *T. verrucosum* strains. M: marker *T. verrucosum* strains, 1,2,3,4,5,6,7,8 (622 bp)

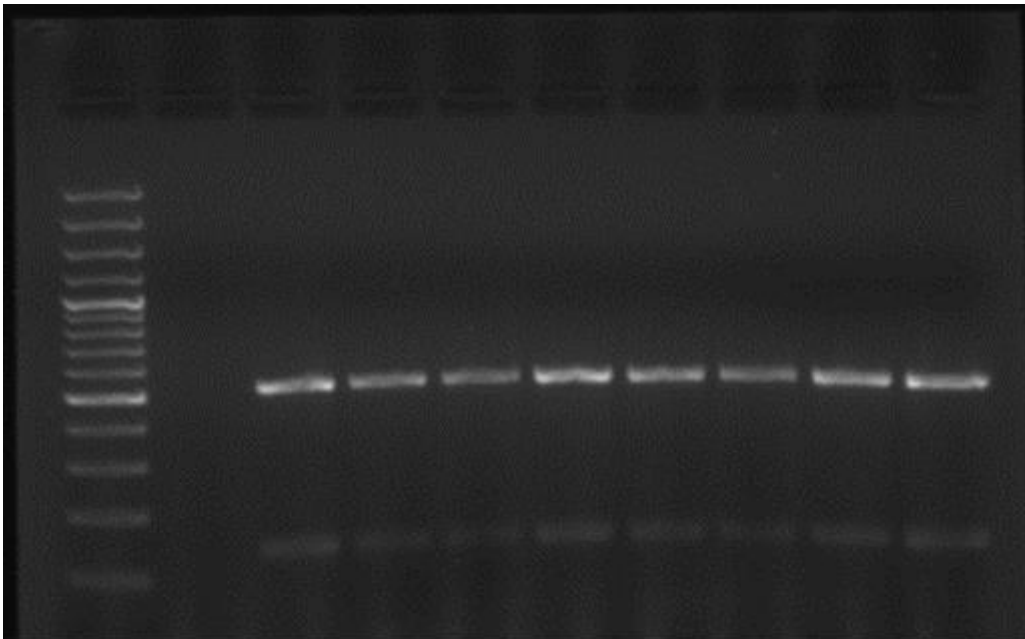
PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucunda Hinfl (200-159-145 bp) ve MvaI (518-140 bp) enzimi kullanılarak

yapılan kesimlerde ise tek bir profil görüldü. (Şekil 2-3).



Şekil 2: Hinfl enzimi kesim sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşlarının RFLP profilleri 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 (200-159-145 bp)

Figure 2: Hinfl enzyme agarose gel electrophoresis image after cutting. M: marker RFLP profiles of *T. verrucosum* strains 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 (200-159-145 bp)



Şekil 3: MvaI enzimi kesim sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşlarının RFLP profilleri 1,2,3,4,5,6,7,8 (518-140 bp)

Figure 3: Agarose gel electrophoresis image after cutting MvaI enzyme. M: marker RFLP profiles of *T. verrucosum* strains 1,2,3,4,5,6,7,8 (518-140 bp)

TARTIŞMA

Sığırlardan genellikle *T. verrucosum* izole edilmektedir. Sığırlardan *T. verrucosum* dışında *M. gypsum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ve *T. simii* izole edildiği bildirilmiştir (Mitra ve ark. 1998). Bu çalışmada dermatofitoz şüpheli 90 sığırın 35 (%38,8)'inden *T. verrucosum* izole edilmiştir. İran'da Khosravi ve Mahmoudi (2003) deri lezyonu olan sığırların %85'inden *T. verrucosum*, %15'inden *T. mentagrophytes* izole etmişlerdir. Abou-Eisha ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada kültürel olarak pozitif olan dermatofit izolatlarından, sığırların 54 (%75)'ünden *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Yıldırım ve ark (2010)'ları Kırıkkale bölgesinde yaptıkları çalışmada klinik olarak dermatofitoz lezyonları gösteren 50 ineğin %44'ünden *T. verrucosum* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Aghamirian ve Ghiasian (2011) yaptıkları çalışmada 380 sığırın 352 (%92,6)'sinden, Papini ve ark. (2009), 294 sığırdan %87,7 oranında *T. verrucosum* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Abd-Elmegeed ve ark. (2020)'nın Mısır'da yaptıkları çalışmada, *T. verrucosum*'un (%25,6) oranında en sık saptanan dermatofit türü olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda izolasyon oranı Yıldırım ve ark (2010) 'nın bulgularına benzer görülürken Abd-Elmegeed ve ark. (2020)'nin bulgularından yüksek, diğer çalışmalardan ise düşük olarak bulunmuştur. Bunun bölgesel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmekle beraber en sık izole edilen etkenin *T. verrucosum* olması diğer çalışmalara benzer olarak görülmüştür.

Bu çalışmada 35 suşun PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucunda Hinfl (200-159-145 bp) ve MvaI (518-140 bp) enzimi ile kesim sonrasında tek bir profil görüldü. Neji ve ark. (2016), çalışmalarında Hinfl enzimiyle 3 profil, MvaI enzimiyle 2 profil elde etmişlerdir. Hinfl ile A [372-159-145 bp] (79.4%), B [372-304-159-145 bp] (14.7%) ve C [306-200-164 bp] (5.9%), MvaI enzimi ile 2 (I [406-125-89-50 bp] (94.1%) ve (II [518-140 bp] (5.9%) profil elde etmişlerdir. Ancak bu profillerden sadece bir tanesinin çok yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Jha ve ark (2012), 11 *T. verrucosum* suşunu HaeIII enzimini kullanarak PCR-RFLP ile inceledikleri çalışmada tek profil elde etmişlerdir. Mirzahoseini ve ark (2009), PCR-RFLP kullanarak dermatofitlerin hızlı identifikasyonlarını amaçladıkları çalışmada 6 dermatofit türünü (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis* ve *Epidermophyton floccosum*) MvaI, Hinfl and HaeIII enzimleri ile kesimlerini gerçekleştirmişlerdir. Kesim sonucunda tek profil elde ederek PCR-RFLP'nin özellikle tür ya da cins düzeyinde identifikasyon için yararlı bir araç olduğunu belirtmişlerdir. ITS bölgesinin MvaI enzimi kullanılarak kesiminin yapıldığı başka bir çalışmada 2 RFLP profili elde edilmiştir. Birinci patern'de iki fragmentten oluşurken

(380 bp-220 bp) ikinci profil kesilmeden tek fragmentten (600 bp) oluşmuştur (Dalis ve ark. 2018). Bu çalışmada tek profil elde edilmesi Jha ve ark (2012) ile Mirzahoseini ve ark (2009)'nın bulgularına benzer görülürken diğer çalışmalardan farklı olarak görülmüştür. Bunun nedeninin örneklemenin küçük bir alanda (Şanlıurfa) yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, izole edilen suşların tek bir profile sahip olduğu ve *T. verrucosum* suşlarının tiplendirilmesinde ITS-RFLP'nin kullanılabilir ve tekrarlanabilir bir test olduğu sonucuna varıldı. Daha sonraki çalışmalarda daha geniş bir alandan örnek alınarak PCR-RFLP tiplendirilmesinin yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı

Proje Destek Bilgileri: Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAK) tarafından 17057 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abd-Elmegeed M, El-Mekawi MF, El-Diasty EM, Fawzi EM.** Dermatophytosis among Ruminants in Egypt: The Infection Rate, Identification and Comparison between Microscopic, Cultural and Molecular Methods. Zagazig Veterinary Journal. 2020; 48(2): 116-127.
- Abou-Eisha A, Sobih M, Fadel H, Elmahallawy H.** Dermatophytes in animals and their zoonotic importance in Suez canal area. Suez Canal Vet Med J. 2008; 13(2): 625-642.
- Aghamirian MR, Ghiasian SAJM.** Dermatophytes as a cause of epizoonoses in dairy cattle and humans in Iran. Epidemiological and clinical aspects. 2011; 54(4): e52-e6.
- Arda M.** Mikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara. 1980 Pp: 15-23.
- Dalis JS, Kazeem HM, Kwaga JK, Kwanashie CN, Yakubu B, Owolodun OA, Jambol AR.** Molecular characterization of dermatophytes isolated from cattle in Plateau State, Nigeria. Vet microbiol. 2018; 219: 212-218.
- Hall TA.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series 1999; 41: 95-98.
- Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, Barton R, Li HC, Chang TC.** Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3760-3768.

- Jackson CJ, Barton, RC, Evans EG.** Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 31: 931-936.
- Jha BK, Murthy SM, Devi NL.** Molecular identification of dermatophytosis by polymerase chain reaction (PCR) and detection of source of infection by restricted fragment length polymorphism (RFLP). *Journal of College of Medical Sciences. Nepal.* 2012; 8(4): 7-15.
- Kac G.** Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med. Mycol.* 2000; 38: 329-336.
- Khosravi AR, Mahmoudi M.** Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses.* 2003; 46: 222-225.
- Larone, D.H.** Medically Important Fungi, In: *A Guide to Identification*, 4th Ed., Washington, ASM press. 2002.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J.** Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology.* 2000; 38(1): 471-471.
- Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, Sadeghi G, Razzaghi-Abyaneh M.** Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iranian Journal of Public Health.* 2009; 18-24.
- Mitra SK, Sikdar A, Das P.** Dermatophytes isolated from selected ruminants in India. *Mycopathologia.* 1998; 142: 13-16.
- Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Makimura K.** Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. *J. Derm.* 1999; 26: 276-281.
- Neji S, Trabelsi H, Hadrach I, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, Ayadi A.** Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Medical Mycology.* 2016; 1-7.
- Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F.** High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56: 59-64.
- Thomas GM, Xu J.** Molecular methods to identify pathogenic fungi In: *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. Ed.: D.H. Howard, Marcel Dekker, NY. 2002 p: 677-702
- Yildirim M, Cinar M, Ocal N, Yagci BB, Askar S.** Prevalence of Clinical Dermatophytosis and Oxidative Stress in Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advance.* 2010; 9(14): 1978-1982.
- White T, Burns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: *PCR protocols, A guide to methods and applications*. Ed.: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1990 p. 315-322