

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Andressa Lorena Silveira Mendes

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA DERMATOFITOSE
FELINA**

Belo Horizonte
2023

Andressa Lorena Silveira Mendes

**COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DA DERMATOFITOSE
FELINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho

Belo Horizonte

2023

M538c Mendes, Andressa Lorena Silveira,1990-
Comparação entre métodos diagnósticos da dermatofitose felina /
Andressa Lorena Silveira Mendes. – 2023.
38f.

Orientadora: Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciência animal.
Inclui Bibliografia

1- Gato - Doença - Teses - 2. Dermatologia Veterinária - Teses
- I. Bicalho, Adriane Pimenta da Costa -Val - II. Universidade
Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III Título.

CDD – 636.708 965

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - ANDRESSA LORENA SILVEIRA MENDES

Às 09:00 horas do dia 28 de junho 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

"Comparação entre métodos diagnósticos da dermatofitose felina"

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Medicina e Cirurgia Veterinárias**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho	X	
Maria Isabel de Azevedo	X	
Larissa Silveira Botoni	X	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	X	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 28 de junho de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 28/06/2023, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel de Azevedo, Membro**, em 28/06/2023, às 14:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Silveira Botoni de Andrade, Usuário Externo**, em 28/06/2023, às 15:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2414901** e o código CRC **D698E222**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANDRESSA LORENA SILVEIRA MENDES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 28 de junho de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho - Orientador(a)

Dr.(a). Maria Isabel de Azevedo

Dr.(a). Larissa Silveira Botoni



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 28/06/2023, às 11:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel de Azevedo, Membro**, em 28/06/2023, às 14:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Larissa Silveira Botoni de Andrade, Usuário Externo**, em 28/06/2023, às 15:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2414908** e o código CRC **9B8CC263**.

RESUMO

A dermatofitose é uma doença importante na medicina veterinária, emergente em várias espécies. Para evitar a disseminação, é necessário um diagnóstico rápido e confiável, o que não é possível com os métodos usuais. Atualmente, nenhum método é considerado padrão-ouro, sendo necessária a associação de diversas metodologias. Foram eleitos 48 gatos da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais, dos quais 24 apresentavam queixa dermatológica sugestiva de dermatofitose e fluorescência sob lâmpada de Wood, e 24 felinos se apresentavam saudáveis. Todos os felinos foram submetidos a seis formas de diagnóstico de dermatofitose felina. Houve alta concordância em relação aos felinos assintomáticos, não havendo falsos positivos neste estudo. Portanto, todos os métodos diagnósticos obtiveram 100% de especificidade e valor preditivo positivo (VPP), exceto o exame direto. O exame direto foi incapaz de detectar o fungo em felinos sintomáticos, portanto, não foi possível calcular sua sensibilidade, bem como seu VPP. Seu valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (51%) foram baixos, sendo considerado um método diagnóstico insatisfatório. A dermoscopia também foi insatisfatória, apresentando baixas sensibilidade (8%), VPN (53%) e acurácia (55%). As culturas fúngicas foram pouco satisfatórias, sendo o meio *Dermatophyte Test Medium* (DTM) discretamente superior aos demais, apresentando valores mais altos de sensibilidade (69%), VPN (77%) e acurácia (85%). O meio *Mycosel* apresentou sensibilidade (65%), VPN (75%) e acurácia (82%) intermediárias e o meio *Sabouraud* apresentou sensibilidade (52%), VPN (68%) e acurácia (76%) inferiores aos demais meios de cultura fúngica. A *Polymerase Chain Reaction* (PCR) apresentou valores máximos (100%) em todos os quesitos avaliados, sendo superior às demais metodologias estudadas.

Palavras-chave: Cultura, PCR, fungo, *Microsporum canis*

ABSTRACT

Dermatophytosis is an important disease in veterinary medicine, emerging in several species. To prevent spread, a quick and reliable diagnosis is needed, which is not possible with the usual methods. Currently, no method is considered the gold standard, requiring the association of several methodologies. Forty-eight cats from the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais, were chosen, of which 24 had dermatological complaints suggestive of dermatophytosis and fluorescence under Wood's lamp, and 24 cats were healthy. All felines were submitted to

six forms of diagnosis of feline dermatophytosis. There was high agreement in relation to asymptomatic cats, with no false positives in this study. Therefore, all diagnostic methods achieved 100% specificity and positive predictive value (PPV), except for direct examination. Direct examination was unable to detect the fungus in symptomatic cats, therefore, it was not possible to calculate its sensitivity, as well as its PPV. Its negative predictive value (NPV) and accuracy (51%) were low, being considered an unsatisfactory diagnostic method. Dermoscopy was also unsatisfactory, with low sensitivity (8%), NPV (53%) and accuracy (55%). Fungal cultures were unsatisfactory, with Dermatophyte Test Medium (DTM) being slightly superior to the others, with higher sensitivity (69%), NPV (77%) and accuracy (85%) values. The Mycosel medium showed intermediate sensitivity (65%), NPV (75%) and accuracy (82%) and the Sabouraud medium showed sensitivity (52%), NPV (68%) and accuracy (76%) lower than the other culture media fungal. The PCR showed maximum values (100%) in all evaluated aspects, being superior to the other methodologies studied.

KEYWORDS: Culture, PCR, fungus, *Microsporum canis*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados dos métodos exame direto, dermoscopia, culturas e PCR do grupo Felinos sintomáticos	24
Tabela 2 - Análise de sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia	25
Tabela 3 - Índice Kappa entre Exame Direto e demais exames - dermoscopia, mycosel, saubouraud, DTM e PCR	25
Tabela 4 - Índice Kappa entre Dermoscopia e demais exames - exame direto, mycosel, saubouraud, DTM e PCR	26
Tabela 5 - Índice Kappa entre mycosel e demais exames - exame direto, dermoscopia, saubouraud, DTM e PCR	26
Tabela 6 - Índice Kappa entre saubouraud e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, DTM e PCR	26
Tabela 7 - Índice Kappa entre DTM e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, saubouraud e PCR	27
Tabela 8 - Índice Kappa entre PCR e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, saubouraud e DTM	27

LISTA DE ABREVIATURAS

CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DTM	Dermatophyte Test Medium
FA	Felinos Assintomáticos
FS	Felinos Sintomáticos
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	11
2.2 EPIDEMIOLOGIA	12
2.3 PATOGENIA	12
2.4 SINAIS CLÍNICOS.....	14
2.5 DIAGNÓSTICO.....	15
2.5.1 Lâmpada de Wood	15
2.5.2 Exame direto.....	16
2.5.3 Dermoscopia.....	16
2.5.4 Cultura Fúngica	16
2.5.5 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase	18
2.6 DESEMPENHO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS	18
3 HIPÓTESE	20
4 OBJETIVOS.....	20
4.1 OBJETIVO GERAL	20
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5 MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 ANIMAIS	20
5.2 AMOSTRAS	21
5.3 EXAMES DIAGNÓSTICOS	21
5.3.1 Dermoscopia.....	21
5.3.2 Exame Direto.....	22
5.3.3 Meios De Cultura Fúngica.....	22
5.3.4 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR).....	22

6 RESULTADOS.....	23
6.1 FELINOS SINTOMÁTICOS.....	23
6.2 FELINOS ASSINTOMÁTICOS.....	25
6.3 DESEMPENHO DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	25
7 DISCUSSÃO.....	28
7.1 GATOS	28
7.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	28
7.3 EXAME DIRETO	29
7.4 DERMOSCOPIA	29
7.5 CULTURAS FÚNGICAS	30
7.5.1 DTM	31
7.6 PCR	33
7.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	33
7.8 ESPÉCIES.....	34
8 CONCLUSÕES.....	35
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

1 INTRODUÇÃO

Dermatofitose é uma afecção cutânea de tecidos queratinizados, como unhas, pelos e estrato córneo, ocasionada, principalmente, por fungos do gênero *Microsporum* (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020). O acometimento em gatos é comum, sendo uma das dermatites infecciosas mais importantes da espécie. Além de felinos, a doença também afeta diversas espécies, entre elas cães e humanos (Frymus *et al*, 2013). Sua distribuição é mundial e de caráter emergente, representando um desafio para a saúde pública (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020).

Por sua importância zoonótica e na medicina felina, o diagnóstico da dermatofitose deve ser rápido para início diligente do tratamento e de planos para limitar a disseminação (Moriello *et al*, 2017).

No passado, a cultura fúngica era considerada o exame de escolha, mas novos consensos afirmam que a técnica não é mais considerada padrão-ouro (Moriello *et al*, 2017). Outras técnicas podem ser usadas para otimizar o resultado, sendo ideal que vários métodos sejam associados (Moriello *et al*, 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

O termo “dermatófito” origina-se do grego “derma”, significando “pele” e “phyton”, significando “planta”. Em contraste com as leveduras unicelulares, dermatófitos são fungos complexos, que crescem como hifas e formam micélio (Frymus *et al*, 2013).

Dermatófitos são um grupo de cerca de 50 espécies de interesse médico, atualmente divididas em nove gêneros - *Guarromyces*, *Ctenomyces*, *Paraphyton*, *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia* e *Trichophyton* (De Hoog *et al.*, 2017). Porém 90% dos casos da doença são causados por *Microsporum canis* (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020). Outras espécies de importância na medicina veterinária são *Nannizzia gypsea* (*prev. Microsporum gypseum*), *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton equinum*, *Trichophyton verrucosum*, e *Nannizzia nana* (*prev. Microsporum nanum*) (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020).

Infecções em felinos por *Trichophyton* podem ser resultantes de contato com roedores infectados. Tais espécies zoofilicas são adaptadas aos hospedeiros animais, enquanto espécies

geofílicas estão associadas à decomposição de queratina em pelos, penas e chifres no meio ambiente. Em sua maioria, os dermatófitos geofílicos não são patogênicos, mas podem infectar animais através do solo contaminado. O principal exemplo é *Nannizzia gypsea* (Moriello *et al*,2017).

A forma infectante dos dermatófitos é formada pela fragmentação de hifas liberadas em forma de esporos (Moriello *et al*, 2017). Os dermatófitos produzem artrosporos, formas vegetativas extremamente resistentes a ambientes secos, podendo permanecer viáveis por 12 meses ou mais. Essa resistência diminui significativamente em ambientes úmidos ou em temperaturas maiores que 100°C (Frymus *et al*, 2013),

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A dermatofitose é uma doença emergente e casos em humanos e outros animais têm aumentado anualmente, principalmente em cães e gatos (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020).

Países de clima tropical, como Brasil, Chile, Índia, ou que alcancem temperaturas altas, como Itália e Sul dos EUA têm apresentado aumento da prevalência de dermatofitoses (Moriello *et al*, 2017). A prevalência em felinos no Brasil varia entre 10% no Sudeste (Da Cunha *et al*, 2019) e 36.8% em estudos em outras regiões (Brilhante *et al*, 2003).

Em felinos, a doença demonstra tendência de idade e raça. Gatos persas do sexo feminino mais jovens são mais predispostos (Indarjulianto *et al*,2017; Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020), gatos de grandes colônias, gatos de abrigos ou em situação de superpopulação são grupo de risco para a doença (Polak *et al*, 2014; García-Romero e Arenas, 2015).

A manifestação da doença depende de diversos fatores, como o *status* imunológico do paciente, a virulência da cepa e a carga fúngica (Aktas, 2015; Ivaskiene *et al*, 2016; Laksmipathy e Kannabiran, 2010). O curso da doença é mais agressivo em gatos com baixa imunidade; as lesões são autolimitantes na maioria dos gatos imunocompetentes (Frymus *et al*, 2013).

2.3 PATOGENIA

Em animais acometidos, a haste capilar infectada é frágil e descamações e fragmentos de pelo contendo artrósporos são capazes de disseminar o fungo (Frymus *et al*, 2013). A transmissão pode ocorrer por contato direto com o portador ou indireto através de fômites

contendo esporos. Os principais objetos responsáveis pela transmissão são camas, brinquedos e roupas (Polak *et al*, 2014).

A pele íntegra e saudável é uma barreira eficaz contra a infecção fúngica, evitando a implantação e eliminando a infiltração, sendo a proliferação celular, queratinização e descamação formas de defesa da pele (García-Romero e Arenas, 2015).

Para que a infecção se instale, é necessário que ocorram lesões pré-existentes, soluções de continuidade na epiderme, que servem como porta de entrada do fungo. Além disso, a pele desvitalizada predispõe ao surgimento da doença (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020). Associado a isso, a umidade é importante para a progressão do quadro (DeBoer e Moriello, 1994).

Na primeira fase da infecção, os dermatófitos se aderem ao tecido queratinizado do pelo ou unhas do hospedeiro (Ilhan *et al*, 2016). Essa ligação ocorre entre 2 e 6 horas após a exposição (Baldo *et al*, 2012). A partir de então, o patógeno inicia o período de incubação. Esse tempo é de 1 a 3 semanas para o *M. canis* (Frymus *et al*, 2013).

A literatura divide o desenvolvimento da doença em três fases. A primeira é referente à implantação do artroconídeo aos corneócitos. Esse processo é mediado por proteases, como a subtilisina, produzidas pelo fungo, além de adesinas em sua superfície (Baldo *et al*, 2012). As proteases são responsáveis pela quebra de queratina para invasão do tecido e para nutrição. A habilidade do dermatófito de secretar tais enzimas é um dos mais importantes fatores de virulência (Laksmipathy e Kannabiran, 2010). A hiperqueratinização da epiderme, na tentativa de defesa do organismo, fornece alimento para o fungo, que é capaz de usar a queratina como única fonte de energia (Frymus *et al*, 2013).

Na segunda fase ocorre a germinação do conídeo, na qual tubos emergem do artroconídeo e penetram o estrato córneo da pele. Esse processo dura entre quatro e seis horas em infecção *in vitro* por *Trichophyton* e em 24 horas *in vivo* em modelo humano (Duek, *et al* 2004). A terceira fase envolve a invasão do tecido queratinizado pelas hifas, que crescem em diferentes direções, incluindo a do folículo. O ciclo termina quando as hifas formam artroconídeos. (Baldo *et al*, 2012). A lesão típica surge entre uma e três semanas após a exposição.

Os dermatófitos têm antígenos não específicos e o processo de colonização resulta em inflamação intensa (Laksmipathy e Kannabiran, 2010). O hospedeiro produz imunidade celular

em resposta a glicopetídeos e imunidade humoral em resposta a polissacarídeos destes glicopetídeos (Kurniati, 2008; Mignon *et al*, 2008). A imunidade humoral não é protetiva. A resposta imune celular é a responsável pela cura e prevenção de reinfecções. Gatos previamente infectados por *M. canis* apresentarão reação linfocitária maior à nova exposição (Mignon *et al*, 2008). Reinfecções naturais são raras, o que sugere imunidade efetiva e duradoura. (Frymus *et al*, 2013).

O estresse tem grande papel na incidência de dermatofitose em felinos. Gatos com produção cronicamente elevada de cortisol tem atrofia de tecidos linfáticos, assim a resposta de citocinas pró inflamatórias Th1 são inibidas, e as anti-inflamatórias Th2 estimuladas (Galluppi *et al*, 2013), o que leva a defesa celular deficitária, facilitando a infecção.

Em gatos imunocompetentes, a dermatofitose é autolimitante, com cura clínica em poucas semanas. O tratamento é indicado em animais nesses casos como forma de encurtar o curso da doença e evitar transmissão (Moriello *et al*, 2017).

2.4 SINAIS CLÍNICOS

Macroscopicamente, a dermatofitose se caracteriza por alopecia multifocal e crostas, formando lesões típicas de 1-3mm (Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020). As principais queixas são queda de pelo, crostas e eritema (Laksmipathy e Kannabiran, 2010). O prurido é variável, mas em geral é mínimo ou ausente. Quando presente, pode alterar a forma característica da lesão devido ao auto trauma (DeBoer e Moriello, 1994).

Em felinos, as lesões são circulares e assimétricas. A conformação em anel é consequência da evolução centrífuga da doença, na qual a região central está mais avançada. As regiões mais acometidas são face, principalmente em orelhas e plano nasal (Frymus *et al*, 2013).

Em casos raros, há também formação de nódulos granulomatosos chamados de pseudomicetomas (Frymus *et al*, 2013). Nestes casos, pode ser necessário o uso da histopatologia (Moriello, 2014), que raramente é usada no diagnóstico de dermatofitose em felinos.

A forma subclínica é mais comum em gatos de pelo longo com mais de 2 anos de idade e estes têm importante papel epidemiológico na proliferação do fungo (Ilhan *et al*, 2016; Sattasathuchana, Bumrunpun e Thengchaisri, 2020).

2.5 DIAGNÓSTICO

Vários exames podem ser usados para diagnóstico de dermatofitose. Exames rápidos são importantes para início imediato do tratamento e bloqueio da transmissão. Alguns deles têm a vantagem de serem feitos em ambulatório (Dasgupta e Sahu, 2012), outros requerem análise em laboratório. A indicação atual é que sejam utilizados mais de um método, para minimizar o risco de erro de diagnóstico (Moriello *et al*, 2017).

2.5.1 Lâmpada de Wood

A lâmpada de Wood é um método rápido e pouco dispendioso que pode ser feito pelo próprio clínico. Trata-se de lâmpada ultravioleta desenvolvida em 1903 por Robert W. Wood para a comunicação na Primeira Guerra Mundial. Os componentes originais foram substituídos por novos materiais, como a chapa de vidro, composto de silicato de bário e 9% de óxido de níquel que reveste o interior dos tubos. A luz ultravioleta é emitida em um comprimento de onda de 320 a 400nm por um arco de mercúrio (Moriello, 2014).

A fluorescência acontece quando luzes de comprimento de onda menores emitidas pela lâmpada são absorvidas pela matéria e ondas de comprimento maiores são emitidas. Isso exclui raios menores que 320nm e luz visíveis maiores que 400nm (Asawanonda e Taylor, 1999).

A luz verde fluorescente característica observada em pelos infectados por *M. canis* é resultado da presença do metabólito pteridina, localizado no córtex ou medula do pelo. Este composto só é produzido durante a infecção, portanto não está presente em formas inativas, como o esporo (Moriello *et al*, 2017).

Apesar de ser produzida em infecções ativas, a pteridina permanece do pelo após a cura. O pelo cresce e leva a porção previamente infectada em direção próximo-distal que ainda fluoresce sob a lâmpada de Wood. O fenômeno criado pela pteridina nas extremidades de pelos saudáveis é chamado de “pontas brilhantes” e pode durar por até 18 anos. Portanto, a lâmpada de Wood não é indicada para acompanhamento da eficácia do tratamento (Moriello *et al*, 2017).

A variação da sensibilidade e especificidade da técnica é muito grande. A pteridina sendo produzida apenas em infecções ativas, falsos negativos podem ocorrer em gatos assintomáticos. Esses carreadores, quando não diagnosticados, podem ser fonte de dispersão do fungo (GarcíaRomero e Arenas, 2015). Falsos positivos podem ser produzidos quando há presença de *debris*, descamações, linhas de tecido e medicações tópicas, como tetraciclina (Frymus *et al*,

2013). Estudos recentes mostram que a lâmpada de Wood é um método útil com valor preditivo positivo (VPP) de 90% e valor preditivo negativo (VPN) de 94% (Moriello et al, 2017).

2.5.2 Exame direto

O exame direto é o exame do pelo e crostas em busca de hifas ou esporos sob o microscópio e é uma forma rápida de confirmação da infecção. Entretanto, a sensibilidade depende da experiência do técnico (Capitan, Schievano e Noli, 2018).

A amostra pode ser obtida por arrancamento do pelo afetado previamente isolado na lâmpada de Wood. Esta pode ser então colocada em óleo mineral, clorofenol ou hidróxido de potássio (KOH) em várias concentrações. De acordo com Levitt *et al* (2010), a sensibilidade da técnica envolvendo KOH foi de 73,3%. Para que a técnica seja executada deve ser feita a digestão do material pelo KOH, o que leva entre 10 e 20 minutos para ocorrer e requer avaliação imediata para evitar artefatos. Outra desvantagem, é que o KOH destrói a fluorescência produzida por pelos contaminados, impedindo que a lâmpada de Wood seja usada para auxiliar na localização dos pelos infectados na lâmina de microscopia. Além disso, o composto de KOH danifica a lente do microscópio (Moriello, 2014).

2.5.3 Dermoscopia

Dermoscopia, ou dermatoscopia é uma técnica de visualização da pele e anexos utilizando uma câmera de aumento variado e um foco de luz (Malvehy *et al*, 2007). É utilizado em humanos para diagnóstico de dermatofitose (Dong *et al*, 2016) e seu uso tem sido útil em medicina veterinária devido a sua rapidez no resultado (Moriello et al, 2017).

Seu objetivo é encontrar pelos com alteração morfológica, principalmente os chamados “pelo em vírgula” (*comma hairs*). Tal fenômeno é resultado de danos causados pela invasão fúngica à cutícula do pelo (Malvehy *et al*, 2007). Em humanos esse achado é comum e característico de dermatofitose e estudos apontam similaridade em medicina veterinária (Scarampella *et al*, 2015).

2.5.4 Cultura Fúngica

A cultura fúngica foi tida por muito tempo como o padrão-ouro para diagnóstico de dermatofitose. No entanto, a técnica é passiva de falsos positivos e falsos negativos (Moriello *et al*, 2017).

Culturas positivas são possíveis em gatos assintomáticos que apresentem o fungo em sua forma vegetativa. O diagnóstico positivo nesses animais não é inválido, por serem importante carreadores do patógeno e importantes para a transmissão (Ilhan *et al*, 2016; Moriello, 2014).

A principal desvantagem da técnica é o grande tempo de espera para obtenção do resultado, podendo ser necessário até quatro semanas para o resultado. Além disso, a identificação morfológica pode ser dificultada devido ao polimorfismo dos dermatófitos (Putignani *et al.*, 2010).

A coleta de amostra pode ser feita de várias formas. Assim como no exame direto, o pelo pode ser retirado por arrancamento, ou pode-se utilizar uma fita adesiva. O modo de coleta mais descrito e mais utilizado é o da técnica da escova, por ser atraumático e rápido. O processo requer uma escova estéril que deve ser usada no pelo em 20 movimentos de escovação. O tempo necessário para obter amostra satisfatória é de 2 a 3 minutos até a escova estar repleta de material (Moriello *et al*, 2017).

Existem diversos meios de cultura utilizados em medicina veterinária. No início do século XX, o Ágar Sabouraud era o meio mais disseminado em medicina e em medicina veterinária. Na década de 1960 o meio *Dermatophyte Test Medium* (DTM) foi desenvolvido para avaliação de infecções cutâneas no exército operando em países tropicais (Taplin *et al*, 1969). O DTM é um meio de cultura com antibióticos para inibição de crescimento bacteriano e fungos contaminantes. Ele contém indicador de cor para identificação precoce de possíveis dermatófitos. A cor da cultura se altera de amarelo para vermelho como resultado da mudança de pH causada por crescimento fúngico. Esse processo leva de três a cinco dias (Guillot *et al*, 2001). Artigos publicados à época afirmam que a mudança de cor em si era indicativa da presença de dermatófitos. Porém, estudos posteriores relatam o fenômeno ocorrendo na presença de diversos fungos contaminantes (Moriello *et al*, 2017).

Quando a técnica é feita de maneira correta e a identificação macroscópica e microscópica é realizada, há concordância de 97% dos achados. Porém, quando não há investigação minuciosa, a chance de um diagnóstico errôneo é de 19,4% (Kaufmann *et al*, 2016).

2.5.5 PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

A PCR, desenvolvida no final dos anos 80, foi uma grande revolução na biologia molecular por possibilitar o diagnóstico rápido, utilizando uma quantidade pequena de amostra. A técnica se baseia na replicação de material genético utilizando uma enzima termoestável e *primers* específicos para o alvo genético a ser replicado. A PCR é altamente específica, extremamente sensível e versátil, permitindo que seja padronizado seu uso na detecção eficaz de patógenos (Garibyan e Avashia, 2013).

O primeiro relato de uso da PCR direto na clínica em dermatofitoses foi de Dazbrowska, Dworecka-Kaszak e Brillowska-Dazbrowska em 2014. A metodologia usada por Dazbrowska em 2014 em sua patente foi proposta por Brillowska-Dąbrowska em 2007, tratando-se de um método por PCR com resultado confiável em cinco horas. A limitação para utilização da PCR na rotina clínica ainda é a falta de consenso em relação à técnica de processamento a ser utilizada (Dazbrowska, DworeckaKaszak e Brillowska-Dazbrowska, 2014).

A técnica de PCR não diferencia fungos mortos e vivos, portanto animais curados podem ser positivos ao exame. Outra causa de falsos positivos são portadores assintomáticos. Encontrar material genético do fungo na amostra pode não ser sinônimo de um diagnóstico positivo. Porém o contrário é verdadeiro, resultados de PCR negativo podem ser usado como diagnóstico de cura (Moriello *et al*, 2017).

2.6 DESEMPENHO DOS TESTES DIAGNÓSTICOS

Para que um tratamento seja eficaz, um diagnóstico confiável é importante. Para obter-se um teste eficaz, a metodologia usada deve passar pelos chamados “estudos diagnósticos”. Estes determinam quão bem uma técnica é capaz de detectar e descartar a doença. (Hoyer e Zapf, 2021)

As principais formas de avaliação do desempenho de testes diagnósticos em medicina são sensibilidade, especificidade, acurácia, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) (Greenhalgh, 1997).

A sensibilidade é a probabilidade de obter-se resultado positivo em indivíduos doentes é calculado na seguinte fórmula matemática:

$$a$$

$$a+c$$

Onde a é quantidade de resultados positivos em indivíduos doentes, ou seja, verdadeiros positivos, e c é quantidade de resultados negativos em indivíduos positivos, ou seja, falsos positivos.

A especificidade é a probabilidade de obter-se resultado negativo em indivíduos não-doentes e é calculado como

$$\frac{d}{b+d}$$

Onde d é quantidade de resultados negativos em indivíduos não-doentes, ou seja, verdadeiros negativos, e b é quantidade de resultados positivos em indivíduos não-doentes, ou seja, falsos negativos.

O VPP, por sua vez, é a probabilidade da presença da doença quando se obtém um resultado positivo, ou seja, a chance de um teste positivo estar correto e é calculado por

$$\frac{a}{a+b}$$

O VPN, portanto, é a probabilidade da ausência de doença quando se obtém um resultado negativo, ou seja, a chance de um teste negativo estar correto. Este é calculado por

$$\frac{d}{c+d}$$

Por fim, a acurácia é a probabilidade de o teste fornecer resultados corretos em ambas as categorias, ou seja, gerar resultados positivos para indivíduos doentes e negativo nos não doentes e é calculado por

$$\frac{a+d}{a+b+c+d}$$

Quando vários testes diagnósticos são avaliados em conjunto, o coeficiente de Kappa é útil para descrever a concordância entre tais métodos. Ele é obtido comparando-se o resultado obtido por dois avaliadores. Esta análise gera resultados de -1 a 1 e, valores próximos de 1 é indicativo da existência de grande concordância entre os testes. Um valor próximo de zero

sugere que houve poucos casos nos quais estes testes obtiveram os mesmos resultados para os mesmos indivíduos, seja positivo ou negativo.

3 HIPÓTESE

A PCR é o método mais sensível e específico para diagnóstico de dermatofitose felina.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da PCR para diagnóstico de dermatofitose felina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia de seis testes utilizados no diagnóstico da dermatofitose felina, sendo eles exame direto, dermoscopia, cultura fúngica em meio Mycosel, cultura fúngica em meio Sabouraud, cultura fúngica em meio DTM e PCR.
- Calcular o índice Kappa entre seis testes e comparar a concordância.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram eleitos para participação atendidos na clínica geral e dermatológica da região metropolitana de Belo Horizonte. O projeto foi registrado e aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da UFMG (CEUA - 315/2022).

Para obtenção do cálculo amostral, utilizou-se a abordagem descrita por Dohoo, Martin e Stryhn (2003), e concluiu-se que, para melhor confiabilidade nos resultados, seriam necessários 24 felinos para grupo amostral positivo e 24 no grupo controle.

Os felinos foram classificados de acordo com idade, raça e, nos pacientes com queixa dermatológica, foram também colhidas informações sobre a cronologia do surgimento das lesões.

Para critério de exclusão, todos os indivíduos foram submetidos a exame clínico geral, avaliando-se as mucosas oral e ocular, cavidade oral, turgor cutâneo, escore corporal, ausculta pulmonar e cardíaca. Realizou-se a palpação do abdome e os linfonodos submandibulares, cervicais superficiais, axilares, inguinais e poplíteos foram examinados.

Para critério de classificação, foi feito então o exame clínico dermatológico, avaliando todo o corpo e manuseando o pelame em sentido caudocranial. Observou-se a vitalidade do pelo, a facilidade de epilação, presença de pelos mortos, secreções e áreas alopecicas. As lesões encontradas foram descritas em relação a aparência, localização e quantidade.

Posteriormente foi feita a avaliação sob lâmpada de Wood em um ambiente escuro. Os felinos foram então divididos em dois grupos – Felinos assintomáticos (FA) e Felinos Sintomáticos (FS) de acordo com a presença de lesão e luminescência sob a lâmpada.

O grupo FS foi composto por indivíduos que apresentaram lesões alopecicas arredondadas, não ulceradas, descamativas, porém sem secreção líquida, de crescimento centrífugo, e de bordas facilmente epiláveis. Para critério de inclusão, tais animais também apresentaram fluorescência verde sob a lâmpada de Wood.

O grupo FA foi formado por gatos que não apresentaram histórico ou queixa dermatológica, não apresentaram alterações no exame clínico geral e dermatológico, e viviam em local sem acesso à rua.

5.2 AMOSTRAS

Foram coletadas amostras, conforme proposto por Moriello *et al* (2017), através de mais de 20 movimentos de escovação repetitivos, usando escovas estéreis descartáveis (Escova Cervical Ginecológica Descartável Estéril Kolplast®). O local eleito para colheita no grupo FS foi a margem das lesões mais recente durante 2 minutos até a escova estar repleta de material. No grupo FA, a escova foi usada em todo o corpo do animal em mais de 20 movimentos crâniocaudais até que se obtivesse amostra o suficiente (Moriello *et al*, 2017).

O pelo colhido foi identificado com o número de cada animal e fracionado em subamostras (**A**, **B**, **C**, **D** e **E**), contendo, cada uma, uma porção de pelos. Todas estas foram mantidas em frascos estéreis de uso clínico ambulatorial, contendo o grupo, a numeração e a subclassificação da amostra.

5.3 EXAMES DIAGNÓSTICOS

5.3.1 Dermoscopia

Sem contenções rigorosas, os felinos passaram por dermoscopia utilizando microscópio eletrônico (Imports® , modelo M 1000X). As imagens foram gravadas utilizando o software AMCap (© NCH Software) e foram posteriormente avaliadas no mesmo software.

5.3.2 Exame Direto

A amostra **A** de cada felino dos dois grupos foi transferida a uma lâmina de vidro e imersa em KOH 10% por 20 min, conforme proposto por Levitt et al (2010). Em seguida, foi feito o exame direto em imersão utilizando lamínula e óleo sob aumento de 40x. As amostras foram classificadas de acordo com a presença ou não de hifas hialinas, macro e microconídios.

5.3.3 Meios De Cultura Fúngica

As amostras **B** dos dois grupos foram inoculadas nas superfícies de placas de 9 cm de diâmetro contendo Ágar Mycosel e as amostras **C** dos dois grupos foram inoculadas nas superfícies de placas de 9cm de diâmetro contendo Ágar Sabouraud. Ambos os meios foram fabricação própria do laboratório de Micologia da Escola de Veterinária da UFMG.

As amostras **D** dos dois grupos foram inoculadas em Ágar DTM (Conclue®, Ouro Fino Saúde Animal, Cravinhos, São Paulo).

Ao final de 14 dias, amostras que apresentaram crescimento foram levadas ao microscópio em busca de elementos fúngicos que possibilitem a identificação das espécies presentes. Para tal, amostras foram transportadas para lâminas de vidro usando fita de acetato, conforme proposto por Moriello (2014) e corados com lactofenol contendo azul de algodão. Amostras que não apresentavam elementos discernidores foram reexaminadas a cada 7 dias durante 28 dias.

Todas as culturas fúngicas foram mantidas ao abrigo de luz, sem utilização de estufas, em um ambiente com temperatura entre 15 e 30°C, conforme proposto por Moriello, Verbrugge e Kesting (2010).

5.3.4 Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras **E** dos dois grupos foram submetidos a extração de DNA e PCR. Os primers utilizados, bem como o método de extração, foram aqueles propostos por Dazbrowska, Dworecka-Kaszak e Brillowska-Dazbrowska, (2014), sendo os iniciadores de DNA fúngico:

panDerm1 (5'GAAGAAGATTGTCGTTTGCATCGTCTC 3')

panDerm2 (5°CTCGAGGTCAAAAGCACGCCAGAG 3')

Para a extração foi utilizado o kit Red Extract-N-Amp Plant (SIGMA). Para tal, as amostras foram colocadas em tubos tipo Eppendorf de 2 ml e adicionado 100 μ L do tampão de extração.

Em seguida, a mistura foi incubada por 10 min a 95°C. Por fim, foram adicionados 100 μ L de tampão de diluição e misturado em vórtex.

Em cada reação de PCR foi utilizado 10 μ L de PCR Ready Mix (SIGMA), de 0,2 μ M de ambos os primers (panDerm1 e panDerm2) e 4 μ L do DNA extraído em um volume de 20 μ L. A PCR foi realizada em um termociclador MiniAmp Thermal Cycler. O perfil de tempo-temperatura da PCR foi de 45 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C, 30 s a 72°C.

A presença de produtos de PCR específicos de aproximadamente 366 pb foi examinada por eletroforese em gel de agarose a 2% e coloração com gel red.

Um dos indivíduos do grupo FS foi retirado do estudo, pois apresentou um resultado ambíguo na PCR. Na eletroforese não houve uma clara marcação na posição de 366 bp. No entanto, foi vista coloração homogênea em toda a extensão da faixa, mais corada do que as demais. Essa peculiaridade não foi vista em nenhum dos outros indivíduos dos dois grupos.

6 RESULTADOS

6.1 FELINOS SINTOMÁTICOS

Apenas 3 dos 23 indivíduos do grupo FS eram mais velhos que um ano de idade. Portanto 87% dos gatos eram filhotes quando apresentaram sintomas de dermatofitose.

Todos os animais do grupo FS apresentavam múltiplas lesões ao exame clínico, variando de 0,5cm a 7cm. Estas foram mais encontradas em face e membros.

Não foram encontrados pelos acometidos no exame direto.

Foram encontrados “pelos em vírgula” em 9% dos animais, apenas dois indivíduos.

Dentre as 23 culturas em meio Mycosel, 15 (65%) produziram algum dermatófito. Dentre as 23 culturas em meio Sabouraud, doze (52%) produziram algum dermatófito.

Apenas oito dos 23 (35%) indivíduos do grupo FS apresentaram crescimento de dermatófitos nas culturas Mycosel e Sabouraud simultaneamente. Onze indivíduos (48%) apresentaram crescimento de dermatófitos em apenas um dos dois meios.

O dermatófito mais cultivado foi o *M. canis*, havendo apenas duas culturas contendo *Trichophyton sp.* Uma delas em meio Mycosel e uma em meio Sabouraud provenientes de diferentes indivíduos.

Todos os indivíduos do grupo FS seriam positivos para dermatofitose no meio DTM caso fosse avaliado apenas a mudança de coloração do meio simultaneamente ao crescimento de uma colônia branca em forma de “nuvem”. Porém, ao fim de 28 dias, foi possível visualização de macronídeos de *M. canis* em apenas 16 (69%) das 23 microscopias.

Todos os resultados dos indivíduos do grupo FS foram positivos na PCR, como mostrado na **tabela 1**.

Tabela 1 - Resultados dos métodos exame direto, dermoscopia, culturas e PCR do grupo Felinos sintomáticos

Indivíduo	Exame direto	Dermoscopia	Mycosel	Sabouraud	DTM	PCR
1	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
4	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo*	Negativo	Positivo
6	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
7	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
8	X	x	x	x	x	x
9	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
10	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
11	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
12	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
13	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
14	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
15	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
17	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
18	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
19	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
20	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
21	Negativo	Negativo	Positivo*	Negativo	Negativo	Positivo

22	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
23	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
24	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

* Amostras nas quais o dermatófito encontrado foi *T. mentagrophyte*

6.2 FELINOS ASSINTOMÁTICOS

Mais da metade dos felinos do grupo FA eram adultos, sendo 18 (75%) mais velhos que 1 ano de idade.

Não foram visualizados pelos acometidos no exame direto ou na dermoscopia do grupo FA.

Não houve crescimento de dermatófitos nas culturas em meios Mycosel e Sabouraud do Grupo FA.

Apenas um dos meios DTM apresentou ausência de crescimento fúngico. Em 23 das 24 (96%) amostras do grupo FA houve crescimento de culturas de diferentes aspectos, nenhuma sendo macroscopicamente semelhante a *Microsporium canis*.

Todos os resultados do PCR do grupo FA foram negativos.

6.3 DESEMPENHO DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Os resultados da acurácia, sensibilidade e especificidade dos testes estão dispostos na **tabela 2**.

Tabela 2 - Análise de sensibilidade e especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia

	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
Exame direto	-	100%	-	51%	51%
Dermoscopia	8%	100%	100%	53%	55%
Mycosel	65%	100%	100%	75%	82%
Sabouraud	52%	100%	100%	68%	76%
DTM	69%	100%	100%	77%	85%
PCR	100%	100%	100%	100%	100%

VPP: Valor preditivo positivo; VPN: Valor preditivo negativo; DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Nas **tabelas 3, 4, 5, 6 e 7** estão apresentadas as concordâncias par-a-par entre os testes diagnósticos.

Tabela 3 - Índice Kappa entre Exame Direto e demais exames - dermoscopia, mycosel, saubouraud, DTM e PCR

		Kappa
ED	Dermoscopia	0,87
	Mycosel	0,36
	Saubouraud	0,49
	DTM	0,32
	PCR	0,02

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 4 - Índice Kappa entre Dermoscopia e demais exames - exame direto, mycosel, saubouraud, DTM e PCR

		Kappa
DERMO	Exame direto	0,87
	Mycosel	0,45
	Saubouraud	0,49
	DTM	0,40
	PCR	0,11

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 5 - Índice Kappa entre mycosel e demais exames - exame direto, dermoscopia, saubouraud, DTM e PCR

		Kappa
MYCOS	Exame direto	0,36
	Dermoscopia	0,45
	Saubouraud	0,53
	DTM	0,61
	PCR	0,66

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 6 - Índice Kappa entre saubouraud e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, DTM e PCR

		Kappa
SAUBO	Exame direto	0,49

	Dermoscopia	0,49
	Mycosel	0,53
	DTM	0,57
	PCR	0,53

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 7 - Índice Kappa entre DTM e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, saubouraud e PCR

		Kappa
DTM	Exame direto	0,31
	Dermoscopia	0,40
	Mycosel	0,62
	Saubouraud	0,57
	PCR	0,70

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

Tabela 8 - Índice Kappa entre PCR e demais exames - exame direto, dermoscopia, mycosel, saubouraud e DTM

		Kappa
PCR	Exame direto	0,02
	Dermoscopia	0,11
	Mycosel	0,66
	Saubouraud	0,53
	DTM	0,70

ED: Exame Direto DTM: *Dermatophyte Test Medium*, PCR: *Polymerase Chain Reaction*

7 DISCUSSÃO

7.1 GATOS

Segundo Moriello e equipe (2017) a raça persa é descrita como predisposta a dermatofitose. Gatos desta raça são mais representados em estudos contendo animais naturalmente infectados em relação a população geral. Neste estudo, apesar de não ser um critério de escolha, os felinos participantes foram Sem Raça Definida (SRD). Nenhum gato de raça foi selecionado durante o período de triagem em nenhum dos grupos.

Dez dos 24 felinos do grupo FS estavam em situação de abrigo no momento da triagem, o que indica a importância da dermatofitose na medicina de populações. Apenas 3 destes 24 gatos tinham mais de 1 anos de idade. Filhotes com menos de 6 meses em situação precária são comumente acolhidos e levados ao atendimento clínico geral diretamente ou através de Organizações Não Governamentais (ONGs). Estes felinos apresentam histórico de desnutrição, amamentação reduzida e abrigo precário até o momento do resgate. Quando mantido em abrigos, os animais podem ter contato com muitos outros gatos, por vezes em situações semelhantes, facilitando a transmissão horizontal. A associação da baixa imunidade nessa faixa etária associada a situação de superpopulação já é descrita como um fator importante na infecção por dermatófitos pelas equipes de Polak (2014) e García-Romero e Arenas (2015).

Segundo Moriello (2014), outro possível agravante na incidência de dermatófitos em grandes populações é a interação social que ocorre entre gatos resgatados. A introdução de um novo gato pode resultar em lesões por briga ou mesmo por brincadeiras. A pele íntegra é descrita por Frymus *et al* (2013) como fator imunológico importante na defesa contra a infecção. O aumento dos níveis de cortisol nesse ambiente de estresse também é desfavorável na manutenção de uma barreira cutânea saudável, de acordo com Galluppi *et al* (2013).

7.2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Em 2013 o Conselho Europeu sobre Doenças de Gatos (European Advisory Board of Cat Diseases ABCD) reconhecia a cultura fúngica como padrão-ouro para diagnóstico de dermatofitose em felinos (Frymus *et al*, 2013). Porém, em 2017 o consenso clínico da Associação Mundial de Dermatologia Veterinária (World Association for Veterinary Dermatology WAVD) já adota a inexistência de um padrão-ouro e indica possíveis formas de diagnóstico clínico (Moriello *et al*, 2017). Isso mostra a desconstrução do que se aceitava como protocolo a ser seguido na rotina clínica.

Um dos métodos mais utilizados na rotina e proposto pelos *guidelines* é o uso da lâmpada de Wood. A ABCD e a WAVD preconizam o uso como triagem, não sendo indicado seu uso de forma única. Neste estudo, essa técnica foi utilizada para localizar lesões. A lupa da lâmpada foi útil, também, como forma de seleção dos animais para o estudo, excluindo indivíduos com queixas dermatológicas, nas quais as lesões eram ulceradas e exsudativas, e selecionando aqueles que apresentavam lesões circulares, descamativas reativas à lâmpada de Wood.

7.3 EXAME DIRETO

Uma grande quantidade de cada amostra foi direcionada a exame direto, utilizando a técnica de Levitt *et al* (2010). Foi possível localizar alterações morfológicas nos pelos afetados, que se apresentavam mais largos, mais claros e fragmentados em relação aos demais. No entanto, não foram vistos elementos fúngicos específicos, como artroconídeos, descritos por Capitan, Schievano e Noli (2018).

Estudos demonstram que a sensibilidade do exame direto é variável, sendo descrito como não satisfatório por Moriello *et al* (2017). Um fator importante descrito por Capitan, Schievano e Noli em 2018 é a experiência do analisador. A falta de prática pode ter sido limitante para a obtenção de resultados positivos no presente estudo.

Devido à falta de resultados positivos, não foi possível calcular a sensibilidade e VPP da técnica. Apesar de 100% de especificidade, VPN 51% e acurácia 51%, sendo os valores mais baixos de todos os testes.

7.4 DERMOSCOPIA

A dermoscopia é descrita como sendo um método rápido, de baixo custo, pouca invasibilidade por Dong *et al* (2016). O desconforto dos animais em relação ao dermoscópico foi mínimo, em concordância com Scarampella *et al* (2015). Porém, neste estudo, foi necessário um nível de contenção física grande durante um tempo longo, contrário do descrito pelos mesmos pesquisadores (Scarampella *et al*, 2015). Certamente a contenção física necessária é grande e demorada se comparada às demais técnicas utilizadas neste estudo. Não foi encontrada na literatura descrição da utilização de contenção química, supõe-se, portanto, não ser indicada.

O grande aumento da câmera associado a um alvo em constante movimento dificultou a análise das imagens. A respiração do indivíduo em repouso já foi o suficiente para que

houvesse mudança accidental do campo sendo analisado. Esse fenômeno não foi descrito na literatura utilizada.

Foram observadas na dermoscopia áreas de alopecia, presença de descamação cutânea e pelos danificados em todos os animais do grupo FS, como descrito por Scarpella *et al* (2015) e Malvehy *et al* (2007).

Dong *et al* (2016) aponta a dificuldade da análise de pelos escuros. Os pelos em vírgula encontrados neste experimento foram em um indivíduo de pelo amarelo e outro, de pelo preto.

Pelos “em vírgula” foram encontrados em dois felinos do grupo FS e apenas estes foram considerados indubitavelmente positivos, como sugerido por Malvehy *et al* (2007).

Ainda não há padronização na medicina veterinária para a interpretação dos pelos “em vírgula”. Estes são interpretados como sinônimo da presença de dermatofitose em humanos (Malvehy *et al*, 2007). Deduz-se que classificação errônea levará a falsos positivos em casos que tais pelos são considerados patognômicos. Por outro lado, se considerarmos que a ausência de tais pelos descarta a doença, mesmo em animais sintomáticos que apresentem as demais alterações, espera-se que haja uma maior quantidade de falsos negativos.

A sensibilidade da técnica neste estudo foi de apenas 8%, já que a presença de pelos “em vírgula” foi usada como determinante para o diagnóstico, sendo o VPN 75%. Por outro lado, como tais pelos não foram encontrados no FA, obteve-se e a especificidade 100%. Isto resultou em um alto VPP (100%).

7.5 CULTURAS FÚNGICAS

A cultura fúngica não é mais o padrão-ouro para diagnóstico de dermatofitose, porém ainda é considerado um dos métodos mais importantes pelos *guidelines* (Moriello *et al*, 2017).

Todos os meios de cultura do grupo FS apresentaram algum tipo de crescimento. No fim de 4 semanas, os meios Mycosel e Sabouraud dos dois grupos apresentaram crescimento de mais de uma colônia em todas as placas, sendo identificada pelo menos uma espécie em cada uma.

É possível a ocorrência de culturas positivas em animais subclínicos, como previsto por Moriello *et al* (2017) e Ilhan *et al* (2016). Porém, os animais do grupo FS apresentavam lesões compatíveis com dermatofitose e fluorescência sob a lâmpada de Wood, sendo improvável a ocorrência de falsos positivos.

O crescimento de fungos contaminantes ocorreu em todas as placas do grupo FS de Mycosel e Sabouraud, mesmo nas quais dermatófitos foram também identificados. Segundo Moriello et al (2017) o crescimento rápido de fungos não patogênicos, como *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.*, pode causar competição sobre dermatófitos na placa. Isso pode impedir o desenvolvimento da espécie de interesse, gerando falsos negativos.

Houve uma tentativa de identificação de todas as colônias presentes, mesmo aquelas de tamanho reduzido no centro ou nas bordas da placa. Colônias que macroscopicamente assemelhavam *M. canis*, mas microscopicamente não apresentavam macroconídeos, foram desconsideradas.

Neste estudo não foram feitas re-inoculações de colônias que não apresentaram crescimento satisfatório no período de 4 semanas para um novo meio de cultura. Essa prática de transferência de colônias com aparência macroscópica sugestiva para uma nova placa, ou *reculturing*, é amplamente utilizada em laboratórios e aceita por Moriello et al (2017) como forma de induzir o crescimento de colônias de dermatófitos. Essa técnica poderia aumentar a quantidade de positivos encontrados no grupo FS, porém, isso comprometeria o objetivo do experimento, que visa comparar métodos diagnósticos. Essa comparação tem, entre os critérios, o tempo necessário para o diagnóstico final.

Outros motivos para falsos negativos são improváveis. O método e local de coleta foi aquele mais aceito por pesquisadores Moriello et al (2017) e proporcionou um volume de amostra aceitável. Os pacientes não estavam sob tratamento antifúngico tópico no momento da triagem, que também é descrito como impeditivo para crescimento de colônias por Kaufmann et al (2016).

Os meios Mycosel e Sabouraud, apresentaram desempenhos semelhantes. O meio Mycosel apresentou sensibilidade de 65% e VPN de 75%, sua acurácia, de 82% foi maior que a do meio Sabouraud. Estes valores são satisfatórios e estão acordo com o encontrado por Kaufmann et al, 2016.

Devido à ausência de falsos positivos, a especificidade de ambas as técnicas seus VPPs foram máximos, de 100%. Portanto, um exame positivo seria sempre confiável.

7.5.1 DTM

Em todos os meios DTM do grupo FS houve a mudança de coloração entre três e seis dias. Também houve o crescimento de colônias esbranquiçadas durante as 4 semanas de

observação. Porém, na microscopia foi possível a confirmação da presença de *M. canis* em apenas 69% dos tubos. Nos demais, foram vistas apenas hifas septadas.

Desta forma, o meio DTM se mostrou superior às demais culturas fúngicas na seletividade do crescimento fúngico neste estudo, não sendo identificadas microscopicamente espécies contaminantes no grupo FS. Todas as colônias encontradas nos tubos deste grupo apresentaram colônias brancas e algodoadas, sugerindo que, possivelmente, todas as amostras continham dermatófito.

No entanto, a avaliação microscópica após a cultura no meio DTM é imprescindível segundo Kaufmann *et al* (2016). E, como não houve o crescimento completo do fungo em sete tubos no fim de 28 dias, estas amostras foram consideradas negativas.

Uma provável causa para o crescimento insatisfatório é a área disponível para expansão do fungo. O tubo do meio de cultura Conclue® tem 2,5cm de largura, menos de um terço (1/3) do diâmetro das placas com os meios Mycosel e Sabouraud utilizadas. A limitação de espaço, e conseqüentemente de nutrientes, pode levar a paralização do crescimento fúngico, impedindo o desenvolvimento de macroconídeos. Esta observação já foi descrita em dermatófitos em DTM por Moriello, Verbrugge e Kesting em 2010.

Outra suposição sobre a limitação do crescimento é a temperatura na qual o meio foi mantido, o que afeta o crescimento de diversos fungos *in vitro*. Brennan *et al* (2003) afirma que grande parte de espécies possuem valores ótimos de crescimento. Porém Guillot *et al* (2001) não encontrou diferença na velocidade de esporulação de dermatófitos em DTM quando submetidos a temperaturas maiores, como de 37°C. De toda forma, o meio DTM da Ouro Fino, e demais empresas que fornecem produtos para clínicos, os fazem com o propósito de uso ambulatorial (*in-house*). Portanto, as empresas prometem bons resultados sem o uso de estufas.

No Grupo FA houve algum grau de variação de coloração em 66% dos tubos. Porém, em grande parte, não se obteve a coloração vermelho escura encontrada no grupo FS e a mudança ocorreu apenas no contorno na cultura. Esse fenômeno demonstra que fungos contaminantes também são capazes de causar a mudança de pH responsável pela conversão da cor, como citado por Moriello *et al* (2017). Quando desenvolvida no fim da década de 1960, acreditava-se que a mudança da coloração era evidência da presença de dermatófitos no meio. Porém Carroll, ainda em 1974, constatou que 20% de amostras consideradas positivas pela coloração não continham dermatófitos.

Em nenhum dos tubos nos quais ocorreu modificação da cor inicial houve crescimento simultâneo de culturas brancas. Segundo a bula do produto, estes dois eventos devem ser concomitantes para que a amostra seja considerada positiva. Esse fato foi confirmado microscopicamente, não sendo encontrados dermatófitos em nenhuma das amostras. Portanto, a especificidade e VPP do DTM, assim como das demais técnicas estudadas, foi de 100%.

A sensibilidade desta técnica foi de 69% e VPN de 77%, sendo as maiores dentre as culturas fúngicas. A acurácia também foi a mais alta (91%), se mostrando o método mais eficaz de diagnóstico dentre os meios tradicionais.

7.6 PCR

A técnica de PCR para dermatofitose foi desenvolvida por Brillowska-Dabrowska e publicada em 2006 e prevê o diagnóstico em 5 horas. Dos primers descritos por ela, foram escolhidos para este trabalho aqueles referidos com "Pan-dermatophyte". Estes são derivados de um gene comum a todos dermatófitos. Portanto, a técnica de biologia molecular usada neste trabalho não diferencia entre as espécies de dermatófitos.

O diagnóstico positivo para dermatofitose já é o suficiente para o início do tratamento, que não é específico para cada espécie de dermatófito. Portanto, a confiabilidade no resultado e sua rapidez são fatores mais úteis para o veterinário clínico do que a diferenciação das espécies.

Não houve falsos positivos ou negativos para PCR neste estudo, apresentando 100% de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia. O teste também se mostrou um dos mais rápidos, podendo ser comparado com a dermoscopia e o exame direto em prontidão do resultado, em menos de 8 horas.

7.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

Houve concordância significativa entre todos os métodos diagnósticos, não havendo índices Kappa negativos. Apesar de resultados discrepantes obtidos em cada método, essa divergência se resumiu ao grupo FS.

Devido à ausência de falsos positivos em todas as técnicas, houve 100% de concordância entre eles no grupo FA. Portanto, caso o estudo se resumisse ao grupo FA, o índice Kappa de todos os métodos seriam 1, ou seja, concordância completa.

Neste estudo, as maiores concordância não ocorreram entre os testes de maior desempenho. O maior índice (0,87) foi obtido entre o exame direto e a dermoscopia, os testes com os menores valores nos demais parâmetros. Isso se deve, além da concordância do grupo FA, à incapacidade dos dois métodos em detectar o patógeno no grupo FS, apresentando sensibilidade, VPN e acurácia insatisfatórios. As acurácias, próximas de 0,5, preveem que estes métodos diagnósticos seriam capazes de produzir resultados corretos apenas em metade das vezes em que forem usados.

As culturas fúngicas apresentaram resultados intermediários, com sensibilidades maiores de 50%. O DTM e Mycosel apresentaram VPN e acurácia semelhantes, sendo o DTM discretamente superior. A concordância das três culturas fúngicas foi alta, acima de 0,50 para quaisquer pareamentos entre elas.

A PCR não só obteve o maior desempenho entre os testes, como também alcançou o valor máximos em todos os parâmetros estudados. Na prática, portanto, pode-se esperar resultados verdadeiros em 100% dos seus usos.

As culturas fúngicas, em especial o DTM e o Mycosel, foram a que mais se aproximaram da PCR em concordância. Portanto, na ausência da possibilidade do uso da PCR, esses dois métodos seriam as próximas escolhas.

7.8 ESPÉCIES

O pelo felino não é estéril, sendo composto por diversas espécies que compõe sua rica microbiota (Hoffmann, 2017). No entanto, dermatófitos não são parte da microbiota normal de felinos domésticos e sua presença indica infecção ativa ou um carreador assintomático (Sattasathuchana, Bumrunpun e Thengchaisri, 2020).

A espécie mais detectada nas culturas fúngicas positivas foi *Microsporum canis*, sendo também a espécie mais prevalente em outros estudos em todo o mundo (Moriello *et al*, 2017; Da Cunha *et al*, 2019; Paryuni, Indarjulianto e Widyarini, 2020). Outro dermatófito prevalente em felinos domésticos, *Nannizzia gypsea*, não foi encontrada neste estudo. Este patógeno está associado ao contato com solo em gatos de vida livre (Frymus *et al*, 2013). Os gatos deste estudo são mantidos sem contato com meio externo, sejam eles de abrigo ou não, dificultando infecção de patógenos geofílicos.

A única outra espécie de dermatófito encontrado nas culturas foi o *Trichophyton mentagrophytes*, em dois indivíduos provenientes do mesmo abrigo. Esta espécie de dermatófito

também é adaptada a hospedeiros vivos, em específico pequenos roedores (Moriello *et al*, 2017). Sua presença na cultura de gatos do grupo FS indica possível interação prévia destes animais com ratos, presumivelmente por predação.

Segundo Sattasathuchana, Bumrungpun e Thengchaisri (2020) a espécie mais abundante de fungo contaminante no pelame felino é o *Aspergillus*. Neste estudo os fungos mais encontrados foram *Aspergillus* e *Penicilium*, sendo os principais fungos observados no Grupo FA.

8 CONCLUSÕES

A incidência de dermatofitose foi maior em felinos com menos de 1 ano de idade e a espécie mais prevalente foi *Microsporum canis*.

Todos os testes produziram resultados negativos confiáveis.

O exame direto e a dermoscopia apresentaram desempenho insatisfatório.

Os meios de cultura fúngica apresentaram resultados pouco satisfatórios.

Dentre as culturas fúngicas, o meio com melhor desempenho foi o DTM, se mostrando discretamente superior ao Mycosel, seguido do Sabouraud.

A PCR se mostrou superior às demais técnicas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo não leva em consideração o preço de cada um dos métodos. Apesar de ter sido superiora às demais em termos diagnósticos, a PCR também foi a mais onerosa. O Kit custou R\$ 1772,80 e possibilitou analisar 100 amostras. Portanto, R\$ 17,73 por amostra. Mesmo acrescido do custo de outros insumos, como o gel de eletroforese, este valor não é proibitivo para uso em grande escala. Por já possuírem os eletrônicos necessários, laboratórios com alta demanda podem implementar seu uso na rotina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, E.; YIGIT, N. **Hemolytic activity of dermatophytes species isolated from clinical specimens.** *J. Mycol. Med.*, v.25(1), p.25-30, 2015.

ASAWANONDA P.; TAYLOR C. **Wood's light in dermatology.** *Int. J. Dermatol.*, v38, p.801–807, 1999.

BALDO, A.; MONOD, M.; MATHY, A.; CAMBIER, L.; BAGUT, E. T.; DEFAWEUX, V.; SYMOENS, F.; ANTOINE, N.; MIGNON, B. **Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes.** *Mycoses*, 55(3), 218–223, 2012.

BRENNAN, J.M.; FAGAN, B.; VAN MAANEN, A.; COOKE, B.M.; DOOHAN, F.M. **Studies on in vitro growth and pathogenicity of European Fusarium fungi.** *European Journal of Plant Pathology* v.109: p.577–587, 2003.

BRILHANTE, R.; CAVALCANTE, C.; SOARES-JUNIOR, F.; CORDEIRO R.; SIDRIM J.; ROCHA, M. **High rate of Microsporum canis feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features.** *Mycopathologia*, v.156, n.4, p.303- 308, 2003.

BRILLOWSKA-DĄBROWSKA A.; SAUNTE D.; ARENDERUP M. **Five-hour diagnosis of dermatophyte nail infections with specific detection of *Trichophyton rubrum***. *Journal of clinical microbiology*, v.45(4), p.1200–1204, 2007.

CĂPITAN, R.; SCHIEVANO, C.; NOLI, C. **Evaluation of the value of staining hair samples with a modified Wright–Giemsa stain and/or showing illustrated guidelines for the microscopic diagnosis of dermatophytosis in cats**. *Vet Dermatol*, v.29, p.308–e106, 2018.

CARROLL H. Evaluation of dermatophyte test medium for diagnosis of dermatophytosis. *J Am Vet Med Assoc*; v.165, p192–195, 1974.

DA CUNHA M.; CAPOTE-BONATO F.; CAPOCI I.; BONATO, D.; GHIZZI, L.; PAIVALIMA, P.; BAEZA, L.; SVIDZINSKI, T. **Epidemiological investigation and molecular typing of dermatophytosis caused by *Microsporum canis* in dogs and cats**. *Prev Vet Med.*, v.167, p.3945, 2019.

DASGUPTA T.; SAHU J. **Origins of the KOH technique**. *Clin. Dermatol.*, v.30, p.238–242, 2012.

DAZBROWSKA I.; DWORECKA-KASZAK B.; BRILLOWSKA-DAZBROWSKA A. **The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets**. *Acta Biochim Pol*, v.61, p.375–378, 2014.

DE HOOG, G. S; DUKIK, K.; MONOD, M.; PACKEU, A.; STUBBE, D.; HENDRICKX, M. KUPSCH, C.; STIELOW, B.; FREEKE, J.; GÖKER, M.; REZAEI-MATEHKOLAEI, A.; MIRHENDI, H.; GRÄSER, Y. **Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes**. *Mycopathologia*, v. 182, n. 1–2, p. 5–31, 2017.

DEBOER, D.; MORIELLO, K. **Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats**. *Vet Microbiol*, v.42, p.289–295, 1994.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. **Veterinary epidemiologic research**. Charlottetown, Canada: AVC Incorporated, 2003.

DONG C.; ANGUS J.; SCARAMPELLA F.; NERADILEK, M. **Evaluation of dermoscopy in the diagnosis of naturally occurring dermatophytosis in cats**. *Vet Dermatol*, v.27, p.275–e65, 2016.

DUEK L.; KAUFMAN G.; ULMAN Y.; BERDICEVSKY I. **The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections**. *J Infect* v.48, p175-180, 2004.

FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; PENNISI, M.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; HARTMANN, K.; HOSIE, M.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MOSTL, K.; RADFORD, A.D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORNIZEK, M. **Dermatophytosis in cats: ABDC guidelines on prevention and management.** *J. Feline Med. Surg.*, v.15(7), p.598-604, 2013.

GALLUPPI, R.; LEVEQUE, J.; BEGHELLI, V.; BONOLI, C.; MATTIOLI, M.; OSTANELLO, F.; TAMPIERI, M.; ACCORSI, P. **Cortisol levels in cats, hair in presence or absence of *Microsporum canis* infection.** *Res. Vet. Sci.*, v.95(3), p.1076-1080, 2013.

GARCÍA-ROMERO, M.; ARENAS, R. **New insights into genes, immunity, and the occurrence of dermatophytosis.** *J. Invest. Dermatol.*, v.135(3), p.655-657, 2015.

GARIBYAN L.; AVASHIA N. **Polymerase chain reaction.** *The journal of investigative dermatology*, v. 133, p. 1-4, 2013.

GUILLOT J.; LATIE L.; DEVILLE M.; L.; CHERMETTE R. **Evaluation of the dermatophyte test medium RapidVet-D.** *Vet. Dermatol.*, v.12, p.123–127, 2001.

GREENHALGH T. **How to read a paper. Papers that report diagnostic or screening tests.** *BMJ* v.315 p.540–543, 1997.

HOFFMANN, A. **The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals.** *Veterinary Dermatology*, v.28(1), p.60–e15, 2017.

HOYER, A.; ZAPF, A. **Studies for the Evaluation of Diagnostic Tests.** *Dtsch Arztebl Int* , v.118, p.555–60, 2021.

ILHAN, Z.; KARACA, M.; EKIN, I.; SOLMAZ, H.; AKKAN, H.; TUTUNCU, M. **Detection of seasonal asymptomatic dermatophytes in Van cats.** *Braz. J. Microbiol.*, v.47(1), p.225-230, 2016.

INDARJULIANTO, S.; YANUARTONO; WIDYARINI, S.; RAHARJO, S.; PURNAMANINGSIH, H.; NURURROZI, A.; HARIWIBOWO, N.; JAINUDIN, H. ***Microsporum canis* infection in dermatitis cats.** *J. Vet.*, v.18(2), p.207-210, 2017.

IVASKIENE, M.; MATUSEVICIUS, A.; GRIGONIS, A.; ZAMOKAS, G.; BABICKAITE, L. **Efficacy of topical therapy with newly developed terbinafine and econazole formulations in the treatment of dermatophytosis in cats.** *Pol. J. Vet. Sci.*, v.19(3), p.535-543, 2016.

- KAUFMANN R.; BLUM S.; ELAD D. ZUR G. **Comparison between point-of-care dermatophyte test medium and mycology laboratory culture for diagnosis of dermatophytosis in dogs and cats.** *Vet. Dermatol.*, v.27, p.284–e68, 2016.
- KURNIATI, C.; **Etiopathogenesis of dermatophyto-ses.** *BIKKK*, v.20(3), p243-250, 2008.
- LAKSMIPATHY, D.; KANNABIRAN, K. **Review on dermatomycosis: Pathogenesis and treatment.** *Nat. Sci.*, v.2(7), p.726-731, 2010.
- LEVITT O.; LEVITT B.; AKHAVAN A.; YANOFSKY H. **The sensitivity and specificity of potassium hydroxide smear and fungal culture relative to clinical assessment in the evolution of tinea pedis: a pooled analysis.** *Dermatol. Res. Pract.*, 2010.
- MALVEHY J.; PUIG S.; ARGENZIANO G.; A.; SOYER H. **Dermoscopy report: proposal for standardization. Results of a consensus meeting of the International Dermoscopy Society.** *J Am Acad Dermatol*, v.57, p.84–95, 2007.
- MIGNON B.; TABART J.; BALDO A.; A.; B.; S. **Immunization and dermatophytes.** *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v.21, p.134–140, 2008.
- MORIELLO, K.; COYNER K.; PATERSON S.; MIGNON B. **Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology.** *Vet Dermatol.*, v.28(3), p.266-e68, 2017.
- MORIELLO K.; VERBRUGGE M.; KESTING R. **Effects of temperature variations and light exposure on the time to growth of dermatophytes using six different fungal culture media inoculated with laboratory strains and samples obtained from infected cats.** *J Feline Med Surg* v.12, p.988–990, 2010.
- MORIELLO K. **Feline dermatophytosis aspects pertinent to disease management in single and multiple cat situations.** *J. Feline Med. Surg.*, v.16, p.419–431, 2014.
- PARYUNI A.; INDARJULIANTO S.; WIDYARINI S. **Dermatophytosis in companion animals: A review.** *Vet World*, v.13(6), p.1174-1181, 2020.
- POLAK K.; LEVY J.; CRAWFORD P.; LEUTENEGGER C.; MORIELLO K. **Infectious diseases in large-scale cat hoarding investigations.** *Vet J.*, v.201(2), p;189-195, 2014.
- PUTIGNANI L.; D'AREZZO S.; PAGLIA M.; VISCA P. **DNA-based detection of human pathogenic fungi: dermatophytes, opportunists, and causative agents of deep mycoses.**