ALINE ELISA SANTANA

Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e *Western blot*) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis*

São Paulo
2015

ALINE ELISA SANTANA

Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e *Western blot*) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3223
FMVZ

Santana, Aline Elisa
Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e Western blot) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis* / Aline Elisa Santana. -- 2015.
74 p. il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1. Dermatofitose. 2. Antropozoonose. 3. Persa. 4. Zoonose. 5.Microsporíase. 6. Fungo. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e Western Blot) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por microsporum canis", protocolado sob o nº 3086/2013, utilizando 70 (setenta) gatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, foi aprovado em reunião de 16/10/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Development of enzyme immunoassays (ELISA and Western Blot) for the serological diagnosis of feline dermatophytosis entailed by Microsporum canis", protocol number 3086/2013, utilizing 70 (seventy) cats, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, was approved in the meeting of day 16/10/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 4 de novembro de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTANA, Aline Elisa

Título: Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e *Western Blot*) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: _____/ _____/ _____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Combati o bom combate, completei a corrida, perseverei na fé!”

Carta de Paulo dirigida a Timóteo

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu fiel amigo, meu refúgio e minha fortaleza. Nem mesmo uma infinidade de palavras poderia descrever a Sua importância em minha vida. Agradeço pela Tua infinita misericórdia e por sempre me guardar em paz.

A minha querida família, representada pelo meu pai Marcos, minha mãe Márcia e minha irmã Karen, que sempre me apoiaram e nunca mediram esforços para que eu tivesse todas as condições para prosperar.

Ao Professor Carlos Eduardo Larsson, meu orientador, que me ensinou muito além da dermatologia veterinária. Seu grande amor e dedicação pela docência sempre me inspiraram. Agradeço imensamente por ter sido agraciada por sua orientação e por poder desfrutar da sua amizade e de seus grandes ensinamentos.

Ao Professor Carlos Pelleschi Taborda, que gentilmente me recebeu em seu laboratório e fez despertar em mim uma grande paixão pela micologia. Agradeço pelo seu acolhimento, pelas palavras de incentivo e por tantos momentos de alegria que me foram proporcionados em seu laboratório.

Ao Professor Lissandro Gonçalves Conceição que me debutou no mundo da dermatologia veterinária e permitiu o nascimento de toda esta história. Seus ensinamentos e conselhos foram fundamentais para que eu conseguisse realizar um dos meus grandes sonhos que era me tornar mestre.

A querida Ana Claudia Balda que me inspirou através de suas palestras e trabalhos científicos. A considero uma das maiores pesquisadoras brasileiras de dermatofitose animal e me sinto extremamente lisonjeada pelo aceite em participar da minha banca examinadora.

Aos meus queridos amigos da micologia, em especial a Glauce Rittner que me acompanhou nos “primeiros passos” e me habilitou para que eu pudesse iniciar minha carreira na micologia. Agradeço imensamente por toda a sua paciência e ensinamentos ministrados.

A minha querida amiga Shirlei Marques que com seu grande conhecimento me ensinou a “plaquear”, identificar os dermatófitos e assim ficar mais “íntima” desses meus amigos fungos. Sua ajuda foi fundamental para que eu pudesse realizar meus experimentos. Além disso, agradeço pelas risadas, pelas palavras de incentivo e pela nossa grande amizade que nasceu durante esse período.

Agradeço ao Julito (Julián Esteban) que me ensinou a fazer ELISA, me ajudou na estatística e sempre me fez dar boas risadas no laboratório. Obrigada por sempre ter palavras de otimismo e por se tornar um grande amigo.

Aos meus amigos do laboratório “Fungos dimórficos patogênicos”: Elúzia, Martha, Cleison, Leandro, Marcelo, Mariana, Lucas, Cris e Diego que desde o principio me receberam super bem e fizeram-me “sentir em casa”. Obrigada pela ajuda em meus experimentos, pela companhia sempre alegre nos almoços e pelas nossas festinhas micológicas.

A minha amiga Julia So Severo que foi minha fiel companheira na “dermato”, nas aulas da pós, nos cafezinhos da copa, nos choros e nas risadas. Sua amizade e sua companhia foram essenciais nessa caminhada. Obrigada por tudo, inclusive por “pegar dermatofitose” no meu lugar (risos).

As minhas amigas dermatológicas Rita Carmona, Raquel Minami e Juliana Odaguiri que estiveram comigo no Serviço de Dermatologia da FMVZ-USP e tornaram aquele ambiente extremamente alegre e amigável. Ao Carlos Eduardo Larsson Jr que muito me ensinou na prática dermatológica.

A Professora Maria Claudia Araripe Sucupira a quem tive o grande prazer de acompanhar de perto durante minha gestão como RD na pós-graduação. Agradeço pelos seus conselhos e por ser uma pessoa tão afetuosa e humana.

A Professora Mitika Kuribayashi Hagiwara a quem considero uma das pessoas mais brilhantes na medicina veterinária. Agradeço pelos seus ensinamentos nas aulas da pós-graduação, pelos debates vigorosos em seu gabinete e por me despertar e guiar nas veredas da saúde publica.

As Professoras Maria Helena Larsson e Marcia Mery Kogika pela oportunidade de acompanhá-las durantes as aulas práticas de Clínica Médica e por me ensinarem importantes e valiosos fundamentos.

Ao Professor José Antônio Sanches Júnior por me orientar durante meu estágio no Ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

A Adelaide F. J. Borges, secretária da pós-graduação, por me ajudar em tantos afazeres e por me “salvar” em vários momentos.

A bibliotecária Evadne Azeredo pela paciência e correções desta dissertação.

A FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa durante a realização deste projeto.

RESUMO

SANTANA, A. E. **Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e *Western blot*) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis.*** [Development of enzyme immunoassays (ELISA and western blot) for the serological diagnosis of feline dermatophytosis caused by *Microsporum canis*]. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

No Brasil, a casuística de dermatofitose de cães e gatos, atendida em hospitais escola e clínicas veterinárias oscila entre 1,7 à 11,5%. E embora o percentil de casos de dermatofitoses na rotina da clínica veterinária, seja reduzido, quando cotejado a outras dermatopatias, tem relevância pelo fato de tratar-se de uma antropozoonose, refletindo então sua grande importância em saúde pública. Relata-se que cerca de 15% dos casos de dermatofitose em humanos sejam de origem zoonótica. A dermatofitose animal é uma dermatopatia causada por fungos queratinofílicos e queratinolíticos pertencentes aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*. Assim sendo, o fungo zoofilico *M. canis* é o dermatófito mais comumente isolado em carnívoros domésticos, sendo considerado como o agente causador de 90 a 100% dos casos de dermatofitose. Os dermatófitos são transmitidos por contato direto com pelos ou escamas infectadas por artrósporos, presentes nos animais, no ambiente ou por fômites. A diferenciação diagnóstica deve ser considerada em todo e qualquer caso de presença de lesões alopécicas, ceratóticas e escamocrostosas. A consecução diagnóstica é desafiadora e o emprego de cultivos fúngicos é bastante útil, porém requerem experiência laboratorial e necessitam de tempo, de cerca de 21 dias, para se obter o resultado final. Diante da escassez de trabalhos envolvendo procedimentos diagnósticos alternativos, a exemplo de técnicas sorológicas para a diagnose da microsporíase, e da necessidade de dispor de exames confiáveis e rápidos para um precoce diagnóstico, objetivou-se desenvolver e avaliar a eficácia diagnóstica dos testes imunoenzimáticos ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e *Western blot* (WB), para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *M. canis* em gatos Persas assintomáticos. Para tanto, selecionou-se 70 felinos de idades variadas e de quaisquer dos sexos, os quais foram alocados em três Grupos: S (Sintomático) com 20 animais, AS (Assintomáticos) com 30 animais e N (Negativos) constituído por 20 felinos. Todos os animais foram submetidos à colheita de sangue

para realização dos testes sorológicos, interposição pela Lâmpada de Wood e cultivo micológico. Comparando-se os valores de ELISA entre os grupos positivos e negativos, obtiveram-se 94% de sensibilidade e 75% especificidade. Obteve-se, também, área sob a curva ROC de 0,92. Observou-se que não houve diferença estatística entre os Grupos Sintomáticos e Assintomáticos ($p<0,05$). Ao WB detectou-se 13 bandas dos seguintes pesos moleculares: 132, 83, 75, 73, 57, 54, 50, 40, 35, 33, 32, 30 e 25 kDa. Considerou-se a proteína mais imunogênica a de 50 kDa, onde observou-se reatividade de 83,3% no Grupo sintomático e de 66,6% no Grupo assintomático. Conclui-se que a dermatofitose induz evidente resposta imune humoral, que se expressa pela elevação dos níveis de IgG anti-*M.canis*. Conclui-se, também, que as técnicas de ELISA e WB são eficazes para o diagnóstico sorológico da dermatofitose causada por *M. canis* em gatos Persas sintomáticos e assintomáticos.

Palavras chave: Dermatofitose. Antropozoonose. Persa.

ABSTRACT

SANTANA, A. E. **Development of enzyme immunoassays (ELISA and western blot) for the serological diagnosis of feline dermatophytosis caused by *Microsporum canis*.** [Desenvolvimento de testes imunoenzimáticos (ELISA e Western blot) para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *Microsporum canis.*]. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The number of dogs and cats affected by ringworm seen at teaching hospitals and veterinary clinics in Brazil ranges from 1,7 to 11,5 %. And although the percentile of ringworm cases in veterinary practice routine is reduced when compared with other skin diseases, it has relevance because it is anthropozoonosis with public health significance. In humans, 15% of ringworm's *(tinea*) cases come from zoonotic transmission and most of these cases are acquired through contact with affected cats. Animal dermatophytosis is a skin disease caused by keratinolytics and keratinophilics fungi belonging to the genera *Microsporum* and *Trichophyton.* The zoophilic fungus *M. canis* is the most frequently isolated dermatophyte in domestic carnivores, being regarded as the causative agent associated with 90 to 100% of ringworm cases. Dermatophytes are transmitted by direct contact with scales or hairs infected by arthrospores, present in the animals, in the environment or in fomites. The differential diagnosis for dermatophytosis should be considered in every case of alopecia, keratotic scales and crusty lesions. The diagnosis is challenging and the use of fungal cultures is quite useful but requires laboratorial experience and need at least 21 days to get the result. Given the scarcity of studies involving alternative diagnostic procedures, like serological techniques for the dermatophytosis's diagnosis, and the need for reliable and rapid tests for early diagnosis, this study aimed to develop and evaluate the diagnostic efficacy of enzyme immunoassays ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) and Western blot (WB), for the diagnosis of feline's dermatophytosis caused by *M. canis* in Persian cats. Seventy cats of various ages and any of the sexes were divided into three groups: S (symptomatic) with 20 animals, AS (asymptomatic) with 30 animals and N (negative) with other 20 cats. All animals were submitted to mycological cultivation, Wood lamp and blood samples for carrying out the serological tests. Comparing the ELISA values between positive and negative groups yielded 94% sensitivity and 75%

specificity. There was no statistic difference between groups symptomatic and asymptomatic (p <0,05). The WB technique detected 13 bands of the following weights: 132, 83, 75, 73, 57, 54, 50, 40, 35, 33, 32, 30 and 25 kDa. The 50 kDa protein was considered the most immunogenic protein, observing reactivity in 83.3% in the symptomatic group and 66.6% in the asymptomatic group. The study concludes that the ringworm induces clear humoral immune response. In addition, the ELISA and WB techniques are effective for the diagnosis of dermatophytosis caused by *M. canis* in symptomatic and asymptomatic Persian cats.

Keywords: Ringworm. Anthropozoonosis. Persian.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gatil comercial da raça Persa localizado no bairro Vila Formosa, na Zona Leste da Capital paulista (A) e felino selecionado para coleta de material (B). São Paulo, 2014. 34

Figura 2- Técnica de microcultivo (A) e avaliação microscópica de hifas e conídios de *Microsporum canis* oriundo de material colhido pela Técnica do carpete a partir dos felinos selecionados para o estudo - Azul de lactofenol 40x (B). São Paulo, 2014. 36

Figura 3- Colônia de *Microsporum canis* de aspecto cotonoso branco em Mycosel-Agar (BD™) dos animais “Blackjack” (A) e “Emily” (B). Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos -ICB/USP. São Paulo, 2014. 37

Figura 4- Resposta de anticorpos da classe IgG contra *M. canis* soros dos felinos positivos sintomáticos ou assintomáticos e negativos. A linha horizontal representa o ponto de corte da reação. DO-densidade ótica, S-sintomáticos, AS–assintomáticos e N–negativos. São Paulo, 2015. 51

Figura 5- Curva Roc para o diagnóstico de dermatofitose felina de acordo com valores de IgG anti-*M.canis* dos felinos.São Paulo, 2015. 51

Figura 6- Fotodocumentação de Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%) corado com nitrato de prata. Canaleta A: antígeno sonicado, B: antígeno sonicado ; C: antígeno sobrenadante ; D: antígeno sobrenadante; E: antígeno sobrenadante; PM:Marcador de peso molecular 160 a 20 KDa (Novex Sharp Pre-stained Protein Standard). São Paulo, 2015 52

Figura 7- *Western blot* realizado após separação eletroforética do antígeno protéico em gel de poliacrilamida 10% com soro reagente (1/50). PM - Padrão de massa molecular em KiloDaltons (kDa). . Marcador de peso molecular 160 a 20 KDa (Novex Sharp Pre-stained Protein Standard). São Paulo, 2015. 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Cepas de *Microsporum canis* selecionadas a partir de cultivos fúngicos dos felinos, para a confeccção do antígeno. São Paulo, 2015. 37

Tabela 2- Resultados obtidos em animais submetidos à interposição a Lâmpada de Wood. São Paulo, 2015.....44

Tabela 3- Valores de DO (densidade óptica) para o ELISA anti-*M.canis* segundo amostras séricas de felinos.São Paulo,2015.....48

Tabela 4- Combinação binária entre os resultados obtidos no ELISA anti-*M.canis* frente aos obtidos pelo cultivo micológico de material provindo de felinos. Avaliação da técnica de ELISA frente aos três critérios de *cut off*.São Paulo, 2015. 50

Tabela 5- Reatividade de anticorpos anti-*M.canis* das amostras de soro de felinos testados para o WB. São Paulo, 2015.....54

Tabela 6- Reatividade de anticorpos anti-*M.canis* em amostras séricas de felinos nos testes imunodiagnósticos ELISA e WB. São Paulo,2015 56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Felinos constituintes dos Grupos S (sintomáticos), AS (assintomáticos) e N (negativos), segundo os resultados dos cultivos micológicos e da interposição a Lâmpada de Wood. São Paulo, 2015.....45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Anticorpo
DO	Densidade óptica
ELISA	*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
FeLV	Leucemia felina
FIV	Imunodeficiência felina
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
HOVET	Hospital Veterinário
ICB	Instituto de ciências biomédicas
IgG	Imunoglobulina G
PBS	*Phosphate Buffer Saline*
PBS-T	PBS contendo Tween 20 0,05%
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida
SRD	Sem raça definida
USP	Universidade São Paulo
UV	Ultravioletra
WB	*Western blotting*
TBS	Tampão prisma base
p	Valor de significância
CV	Coeficiente de variação

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
p/v	peso/volume
>	maior
h	horas
µL	microlitro
mL	mililitro
nm	nanômetro
ng	nanograma
µg	micrograma
mg	miligrama
kg	quilograma
µm	micrometro
ºC	graus celsius
kDa	kiloDalton
M	molar
mM	milimolar
rpm	rotações por minuto
V	volts
HCl	ácido clorídrico
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H_2SO_4	ácido sulfúrico

Sumário

1 INTRODUÇÃO 19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 23
3 OBJETIVOS 32
3.1 OBJETIVO GERAL 32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
4 MATERIAL E MÉTODOS 33
4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS 33
4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS 34
4.3 CULTIVO DE *MICROSPORUM CANIS* 36
4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS 39
4.5 SDS-PAGE 39
4.6 *WESTERN BLOT* 40
4.7 ELISA 41
5 ESTATÍSTICA 43
6 RESULTADOS 44
6.1 EXAMES MICOLÓGICOS 44
6.2 FIV e FeLV 47
6.3 ELISA 47
6.4 SDS-PAGE 52
6.5 *WESTERN BLOT* 53
7 DISCUSSÃO 57
8 CONCLUSÕES 67
REFERÊNCIAS 68

1 INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, a ocorrência de dermatopatias em pequenos animais pode ultrapassar 30% do total de casos clínicos atendidos, tanto como queixa principal, quanto secundária (LARSSON, 1995; SCOTT et al., 2001). Dentre essas dermatopatias, destacam-se as dermatites fúngicas que se configuram entre as enfermidades infecciosas mais prevalentes na América Latina e que assumem grande relevância tanto para os animais domésticos quanto para o homem (LACAZ et al., 2002).

Nesse cenário, as infecções dermatofíticas assumem posição de destaque, face ao caráter cosmopolita dos fungos dermatófitos, o que as tornam entidades contumazes nos consultórios dermatológicos (SEEBACHER; BOUCHARA; MIGNON, 2008). De modo geral, esses fungos são encontrados em diversas regiões do mundo, havendo variações regionais em relação à freqüência de ocorrência das espécies, uma vez que condições sociais e geoclimáticas podem interferir, consideravelmente, na distribuição das espécies dermatofíticas (SPARKES et al., 1993; MORIELLO et al., 2013).

Fatores climatológicos, tais como: temperatura e umidade, refletem-se diretamente na distribuição do fungo e, consequentemente, na prevalência da doença (SPARKES et al., 1993; SIMPANYA; BAXTER, 1996). A exemplo disso, diversos autores nacionais e alóctones relatam haver maior prevalência da dermatofitose em climas tropicais e subtropicais (SPARKES et al., 1993; DEBOER; MORIELLO, 1994; BALDA, 2001; CAFARCHIA et al., 2004). Segundo Cabañes (2000), isso se explica pelo fato de existir uma correlação positiva entre as dermatofitoses e a alta umidade. Ainda, segundo Pinheiro et al. (1997), as doenças infecciosas perpetuam-se nas estatísticas de saúde dos países tropicais a despeito do grande progresso da ciência e da tecnologia visando a proteção do homem contra as enfermidades infecciosas, e dos esforços das entidades governamentais para controlá-las ou erradicá-las.

Estudos retrospectivos obtidos por pesquisadores a exemplo de Balda et al. (2004), demonstraram que a casuística de dermatofitoses de cães e gatos, atendida em hospitais-escola e clínicas veterinárias brasileiras oscila entre 1,7% à 11,0%.

Embora o percentil de casos de dermatofitoses na rotina da clínica veterinária, seja relativamente reduzido, quando cotejado a outras dermatopatias, esse agravo assume grande relevância pelo fato de tratar-se de antropozoonose, refletindo, então, em sua grande importância em saúde pública (CARLOTTI et al., 2010; ALLEN, 2015).

Dados epidemiológicos indicam que essas micoses estão entre as zoonoses mais comuns sendo consideradas como a terceira das enfermidades tegumentares mais diagnosticadas em crianças menores de 12 anos (SIDRIM; ROCHA, 2004). Larsson et al. (1997) e Londero (1963), explicam que esta grande morbidade em crianças deve-se ao fato delas manterem maior contato com os potenciais reservatórios. Inadvertida e ingenuamente carregam, acariciam ou mesmo dormem com animais acometidos pelos dermatófitos. Além disso, Gurtler, Diniz e Nicchio (2005) e Hay et al. (1991), consideram que no couro cabeludo de indivíduos pré-púberes ocorre ausência de ácido graxos de cadeia média (C8-C12), ácidos graxos estes, que funcionariam como inibidores naturais do desenvolvimento dos agentes causadores da *tinea capitis.*

A dermatofitose transmitida por animais domésticos, mormente os domiciliados ou querenciados, também tem importância em adultos, tal como exposto por Larsson et al. (1997) e Scott et al. (2001). Segundo estes autores, 15% dos casos de dermatofitose de adultos são de caráter zoonótico. Ademais, pesquisas datadas da penúltima década indicam que a ocorrência dessa dermatopatia sofreu um sensível incremento devido a crescente tendência do homem urbano em conviver intimamente com os animais domésticos de companhia (PINHEIRO et al., 1997; REICHMANN, 2000; ROBERTSON, 2000; MURPHY, 2008). Estudos hodiernos demonstram que aproximadamente um terço dos lares estadunidenses possui ao menos um felino compondo o nicho familiar e que este número está aumentando progressivamente. Além disso, algumas pesquisas têm demonstrado a importância desses animais no convívio familiar e segundo afirmam Dabritz e Conrad (2010), 41% dos proprietários de gatos nos EUA consideram seu felino como membro de sua família.

Realidade essa, que também ocorre em lares brasileiros. Dados obtidos a partir da pesquisa nacional de saúde (PNS), realizada em 2013, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que 17,7% dos domicílios

nacionais possuem ao menos um felino. Ainda, segundo informações oriundas do mesmo Instituto, evidencia-se que a população de gatos em residências brasileiras foi estimada em 22,1 milhões, o que representa aproximadamente 1,9 gatos por domicílio brasileiro. Assim, é incontestável considerar a importância dos felinos nas relações humanas que passaram a compor, intimamente, o ambiente doméstico, destacando-se por sua lealdade, independência e hábitos de higiene inata que são características que se encaixam dentro do agitado estilo de vida dos dias de hoje (REICHMANN, 2000).

Nesse contexto da inter-relação do homem e seu felino, ressaltam-se as doenças por ele transmitidas. Destaca-se, então, a dermatofitose, por seu caráter altamente contagioso. Miller Jr, Griffin e Campbell (2013) referem que em até 70% das famílias que possuem gatos infectados, pelo menos um de seus membros poderá, potencialmente, desenvolver dermatofitose. Além disso, os felinos carreadores assintomáticos de *M. canis* também representam uma séria ameaça ao controle epidemiológico da dermatofitose (FARIAS et al., 2011; NITTA; LARSSON, 2015). Por ser um risco frequentemente insuspeito, esses felinos são inseridos no ambiente familiar e se tornam uma importante fonte de contágio ambiental e de infecção intra e interespecífica. Na Capital de São Paulo, tais animais pressupostamente “saudáveis”, quando introduzidos em uma propriedade, mesmo quando submetidos a exame clínico prévio, não são facilmente caracterizados como fontes de infecção. Todavia, é contumaz que semanas após a sua adoção instale-se um surto de dermatofitose, acometendo boa parte ou mesmo a totalidade dos contactantes humanos e animais.

Apesar do notório aspecto zoonótico da dermatofitose (BRILHANTE et al., 2004), ela não figura entre as enfermidades de notificação obrigatória até pelos baixos índices de letalidade. Além disso, considera-se que os levantamentos de dados dispostos na bibliografia são meras conjecturas, posto que muitas vezes o diagnóstico de tais moléstias no âmbito da dermatologia humana é realizado sem um precedido diagnóstico laboratorial. Inúmeras vezes, os diagnósticos são firmados única e exclusivamente com base na observação clínica (HAY et al., 1991; BRILHANTE et al., 2004). Assim, considerando-se o exposto, admite-se que a exata prevalência das dermatofitoses, transmitidas pelos animais domésticos, é tida como ignota e, desta forma, possam ter frequência ainda maior do que assinalam as

pesquisas e levantamentos.

Nesse contexto de saúde pública, é incontestável a importância do médico veterinário como agente promotor da saúde coletiva. Assim, é imprescindível que esses profissionais estejam cada vez mais preparados e aptos para identificar e atuar no controle das dermatopatias de caráter zoonótico. Destarte, nesse âmbito, o diagnóstico das infecções dermatofíticas representa um verdadeiro desafio para os clínicos veterinários, que anseiam dispor de exames complementares que permitam um rápido e preciso diagnóstico de tais enfermidades. Idealiza-se que sejam exames rápidos na evidenciação da infecção fúngica, superando o preciso, mas lento cultivo micológico, o invasivo e custoso histopatológico, ao pouco sensível exame pela Lâmpada de Wood e, finalmente, o aparentemente fácil e rápido exame fungoscópico, que, no entanto exige longo treinamento e sagacidade do examinador.

Considerava-se já há 15 anos (SPARKES; STOKES; GRUFFYDD-JONES, 1995), a existência de um teste sorológico confiável para um diagnóstico precoce da dermatofitose, uma vez que o cultivo fúngico, considerado como padrão para o cabal estabelecimento do diagnóstico de dermatofitoses, é relativamente demorado. Em trabalho, realizado na penúltima década, constatou-se que o teste de ELISA conseguia discriminar bem os caninos com dermatofitose destes animais controle negativo, obtendo-se boa sensibilidade (83,3%) e alta especificidade (95,2%) (PEANO; RAMBOZZI; GALLO, 2005). Porém, *a posteriori* não foi evidenciado na bibliografia científica mundial, a realização de testes ELISA e WB para o diagnóstico dessa enfermidade em felinos Persas considerados como portadores assintomáticos.

2 REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA

Dermatofitoses, também conhecidas como *tinea* ou “tinhas”, são infecções cutâneas fúngicas, causadas por fungos queratinofílicos e queratolíticos pertencentes aos gêneros *Microsporum, Trichophyton* e *Epidermophyton*. Esses fungos, denominados insolitamente dermatófitos, possuem a capacidade de infectar porções queratinizadas ou semiqueratinizadas do tegumento, tais como a camada córnea da epiderme, epitélio folicular e fâneros, tais como pelos, garras, cascos e cornos (BALDA, 2001; CAFARCHIA et al., 2004; FRYMUS et al., 2013).

Normalmente, a infecção se restringe à camada mais superficial da pele, devido à incapacidade do fungo em penetrar em tecidos mais profundos (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SAENZ, 2001). Segundo Cutsem e Rochette (1991), nas camadas não queratinizadas não há o substrato necessário para o sustento fúngico e, além disso, existem diversas proteínas séricas que exercem papel protetor em face a poderosa ação antifúngica.

Até o decênio passado, existiam cerca de 40 espécies de dermatófitos já identificadas (SIDRIM; ROCHA, 2004) porém, somente as espécies pertencentes aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são, usualmente, os agentes causadores de dermatofitoses em cães e gatos. Os principais agentes etiológicos envolvidos nessas espécies são o *M. canis, M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (FOIL, 1998).

Segundo a classificação proposta por Merchant (1990), esses dermatófitos são categorizados de acordo com o seu habitat em: geofílicos, que são aqueles encontrados frequentemente no solo e têm como principal representante o *M. gypseum*; Zoofílicos, que infectam animais e em especial os felinos e, finalmente, os antropofilicos, que são os fungos que sobrevivem às custas da queratina humana. Assim sendo, o fungo zoofilico *M. canis* é o dermatófito mais comumente isolado em carnívoros domésticos, sendo considerado como o agente causador de 90 a 100% dos casos de dermatofitose (DEBOER; MORIELLO, 1994; BALDA et al., 2004; MILLER JR.; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Em estudo, realizado no Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica e do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo, Larsson et al. (1997) relataram percentis de isolamento de 99,2 % de *Microsporum canis* e 0,8%

de *Microsporum gypseum*, provindo de material colhidos de 130 felinos com lesões dermatofíticas. Em trabalho semelhante, realizado na Itália central, MANCIANTI et al. (2002) também encontraram elevadas taxas de isolamento de *M. canis.* Aqueles autores italianos descreveram que dos 1890 gatos positivos para dermatófitos, 97% tinham como agente etiológico o *M. canis,* 2,6% *M. gypseum* e 0,2% o *T. mentagrophytes.*

Estudos brasileiros realizados nos estados do Paraná e de Minas Gerais, apontaram o *M. canis* como único dermatófito, isolado em 100% das amostras (BATISTA JÚNIOR; NICO, 1967; YAMAMURA et al., 1997). E, apesar da elevada frequência no isolamento do *Microsporum canis*, este não é considerado como parte da microbiota normal da pele (MORIELLO; DEBOER, 1991; DEBOER; MORIELLO, 1994; SCOTT et al., 2001; CABAÑES, 2008).

Os gatos, especialmente os de pelos longos, tais como os Persas e Himalaios, são bastantes predispostos a esta infecção (BALDA et al., 2004; MILLER JR.; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Segundo Sparkes et al. (1993), os pelos longos possibilitam condições ótimas de temperatura e umidade para que as estruturas fúngicas fiquem protegidas contra a dessecação, favorecendo assim a sua propagação. Entretanto, outros autores observaram, paradoxalmente, maior prevalência em felinos de pelame curto (DUBUGRAS et al., 1992; CABAÑES, 2000) e outros tantos afirmam não notar diferenças entre os dois tipos de pelagem (MORIELLO; DEBOER, 1991; BOYANOWSKI et al., 2000).

Apesar do comprimento da pelagem e a prevalência de dermatofitose não serem unânimes entre os autores, é de comum acordo que a espécie felina é considerada a principal fonte de infecção para seres humanos e para outros animais (DUBUGRAS et al., 1992; MIGNON et al., 1999a; LARSSON; LUCAS, 2015). Segundo Cabañes (2000), a dermatofitose em felinos domésticos é duas vezes ou mais prevalente do que a dermatofitose canina. As razões para tal predisposição ainda não estão bem elucidadas. Alguns autores defendem que os espécimes felinas sejam os hospedeiros naturais e reservatórios de *M. canis*, visto que a espécimes felina se comporta como carreadora assintomática, passiva, de artroconídios dermatofíticos (SPARKES et al., 1993; BALDA et al., 2004; NEWBURY; MORIELLO, 2014).

Segundo Sparkes et al. (1993), essa característica pode ser resultante de

aspectos intrínsecos aos animais, mas é mais provável que ela reflita as condições ambientais e de manejo desses gatos. Uma vez que quando mantidos em ambientes livres de estruturas fúngicas, podem perpetuar-se com exames micológicos negativos, provando assim que o animal nada mais é do que o reflexo do seu ambiente, de suas condições de criação e, provavelmente, do seu “status” imune.

De acordo com Manciati et al. (2002), os animais jovens são mais pré-dispostos a contrair infecções devido ao incompleto desenvolvimento do seu sistema imune. Animais imunocomprometidos, como aqueles portadores dos vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou da leucemia felina (FelV), geralmente apresentam infecções mais graves, generalizadas ou de curso prolongado (FOIL, 1998). Porém, segundo Ribeiro (2005), apesar da relação entre a dermatofitose e a infecção pelo FIV ter sido estudada por alguns pesquisadores (SIERRA et al., 2000), muito há ainda aclarar. Além disso, outros fatores, tais como: doenças sistêmicas, comprometimento da imunidade mediada por células, desnutrição, prenhez e mesmo a lactação podem tornar os animais mais suscetíveis à infecção (DEBOER; MORIELLO, 1994; NEWBURY; MORIELLO, 2014)

Os dermatófitos são transmitidos por contato direto com pelos ou escamas infectadas por artrósporos, presentes nos animais, no ambiente ou por fômites (MILLER JR.; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Segundo Sidrim e Rocha (2004), o primeiro contato do fungo com o hospedeiro se dá pela colonização do extrato córneo. Em seguida, para que se inicie o processo patogênico é deveras importante e necessário que ocorra a inoculação de artroconídio ou fragmento de hifa depositado por sobre a pele, favorecido por escoriação preexistente, mesmo que seja mínima.

Após essa inoculação, o fungo germina, prolifera e invade a camada superficial da pele, os pelos ou garras (HAY et al., 1991; LACAZ et al., 2002). O principal mecanismo de invasão fúngica, se dá através da produção e secreção de enzimas proteolíticas, notadamente queratinases, colagenases e elastases (VERMOUT et al., 2008; HUBE et al., 2015). A hidrólise da queratina por essas proteinases é considerado um aspecto conspícuo na patogenia das dermatofitoses, uma vez que essas enzimas possibilitam a utilização desse substrato como fonte de carbono e nitrogênio, o que, para os dermatofitos, é uma condição *sine qua non* para o seu crescimento e desenvolvimento (SIMPANYA; BAXTER, 1996).

A agilidade do fungo em produzir essas enzimas contribuem para a perpetuação e disseminação fúngica (VERMOUT et al., 2008; MATHY et al., 2010). A quantidade dessas enzimas pode variar de cepa para cepa e pode explicar, em parte, a variabilidade de apresentação clínica da doença (SIMPANYA; BAXTER, 1996; VERMOUT et al., 2008; BALDO et al., 2012). O estabelecimento da infecção sugere a existência de outros fatores que facilitam a invasão fúngica da pele. Embora ainda não estejam bem compreendidos, sabe-se que são importantes as condições em que pele se encontra, bem como outros fatores inatos como: a composição do material sebáceo, o pH da pele, a sudorese, a taxa de epidermopoese e a presença de transferrina insaturada, que se constitui em potente inibidor dos dermatófitos (VERMOUT et al., 2008).

Além dos fatores intrínsecos ao hospederio, previamente citados, existem outros que contribuem para a não ocorrência de uma infecção dermatofítica. E entre eles, vale ressaltar a clássica resposta imune inespecífica, a imunidade mediada por células e mesmo a humoral. A resposta, dita inespecífica, é constituída pela descamação epidérmica, na qual os queratinócitos são responsáveis pelas características do microambiente do espaço intercelular e tem o potencial de fagocitose de antígeno e, ainda, de secretar várias linfocinas, entre elas, a interleucina-1 (RUIZ; ZAITZ, 2001).

Quanto a apresentação clínica, a maioria dos autores de tratados de dermatologia veterinária afirma que, em decorrência do envolvimento folicular, que ocorre em infecções dermatofiticas, a lesão mais comumente evidenciada é a alopecia decorrente da foliculite fúngica (MORIELLO et al., 2004; MILLER JR.; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; LARSSON; LUCAS, 2015). Porém, tal lesão, é observada em inúmeras outras dermatopatias e, talvez, em decorrência deste fato, a dermatofitose acabe sendo superdiagnosticada na prática clínica. Deve-se ressaltar, também, que além da alopecia, outras lesões cutâneas elementares também podem ocorrer (NEWBURY; MORIELLO, 2014)

Segundo Scott et al. (2001), em geral, a dermatofitose manifesta-se sob a forma de máculas hipotricóticas ou francamente alopecias, isoladas ou múltiplas, com pele discrômica, com presença de lesões sempre descamativas, dando lhes um aspecto “sujo”, de distintas configurações. Ainda segundo aqueles autores, o padrão lesional que pode ser evidenciado em felinos é o da dermatite miliar, que se

caracteriza por pápulas e crostas, muitas vezes sem a presença de alopecia, comumente localizadas em região cervical ou mesmo de forma disseminada. O prurido varia, sendo mais intenso quando de infecção por espécies geofílicas (MILLER JR.; GRIFFIN; CAMBELL, 2013). Alguns quadros são considerados autolimitantes, podendo então ocorrer remissão espontânea. Por outro lado, quadros crônicos podem persistir por meses ou anos (SPARKES et al., 1993).

O diagnóstico dessa infecção pode ser, por vezes, desafiador e os cultivos fúngicos embora tardem bastante, são extremamente úteis, uma vez que permitem caracterizar o agente etiológico, com o qual pode-se deduzir a evolução do processo, conhecer sua fonte de origem e estabelecer o correto tratamento (CUTSEM; ROCHETTE, 1991). Além disso, sua elucidação se faz necessária visto que pacientes portadores de espécies zoofílicas são candidatos a vetorizar infecções para contactantes animais e humanos que com eles coabitam (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Outras técnicas de diagnóstico, tais como a Lâmpada de Wood e o exame citofungoscópico, podem contribuir para a diagnose. Porém, apresentam muitas limitações. O exame pela Lâmpada de Wood, por exemplo, evidencia cepas de *M. canis, M. audouinii, M. distortum* e *T. schoenleinii*. Porém, em média, somente 50% dos casos de infecções por *M. canis* fluorescem. Já, o exame citofungoscópico dos pelos avulsionados pode revelar hifas e artrósporos em apenas 40 a 70% dos casos. Dessa forma, o cultivo fúngico passa a ser o teste diagnóstico mais confiável e reportado como “padrão” (SCOTT et al., 2001; MILLER JR.; GRIFFIN; CAMBELL, 2013). Segundo Cabañes (2000), o diagnóstico realizado através do cultivo micológico, representa a maior demanda de exames em laboratório de micologia veterinária.

No diagnóstico laboratorial, pelo cultivo fúngico, é imprescindível que a colheita do material, assim como a sua conservação e transporte sejam realizados de forma adequada já que influenciarão, e muito, no resultado final do exame. Primeiramente, é importante que o paciente não esteja sendo submetido a medicamentos antifúngicos, no momento da coleta, mas, caso isto ocorra, é necessário que haja a suspensão do uso por pelo menos uma semana antecedendo a realização do exame. A quantidade de material a ser colhido deve ser, por óbvio, suficiente para a sua realização e deve-se respeitar a questão do crescimento radial

do fungo, evitando colher material de áreas caducas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; VIANI et al., 2001; LARSSON; LUCAS, 2015).

Em animais domésticos utilizam-se duas principais técnicas de colheita de pelame: a “técnica de avulsão pilar” e a “técnica do carpete”. Essa última, descrita por Mariat e Adam-Campos (1967), tem como principal alvo os animais assintomáticos, umas vez que ao friccionar os quadrados de carpete estéril por toda a sua superfície tegumentar, amplia-se a possibilidade de isolamento fúngico. Aqueles autores preconizam que esse material seja processado logo após a coleta, mas caso não seja possível realizar o exame laboratorial rapidamente, o mesmo pode ser mantido por até 48 horas em ambiente seco e ao abrigo da luz (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004; VIANI et al., 2007). O cultivo dos dermatófitos é realizado, rotineiramente, em meio de Ágar Sabouraud-dextrose ou em meio Ágar-Mycosel, que é o clássico meio de Sabouraud dextrosado acrescido de inibidor bacteriano, cloranfenicol, e de inibidores fúngicos tais como cicloheximida que, por sua vez, impede o crescimento de fungos filamentosos ditos contaminantes. Tais meios, após a semeadura, são incubados a 25°C e o crescimento máximo tende a ocorrer por volta do 15° dia, no entanto, para considerar um cultivo como negativo, deve-se aguardar, pelo menos, 21 dias (SAENZ, 2001; LACAZ et al., 2002)

Após o crescimento fúngico em cultivo, é realizada a detecção da espécie do dermatófito, através da avaliação das características macro e micromorfológicas das colônias. O estudo da macromorfologia inclui características macroscópicas como coloração da superfície do verso e anverso da colônia, topografia, textura e velocidade de crescimento. Já, a avaliação das características micromorfologicas, inclui a colheita e a subsequente análise dos macro e microconídios, eventualmente presentes na superfície do micélio. Para a avaliação destes coleta-se fragmentos da colônia, dispõem em lâminas de microscopia, cora-se com Lactofenol azul de algodão e então, examina-se segundo ao seu arranjo e morfologia (LACAZ et al., 2002; SIDRIM; ROCHA, 2004).

As colônias de *Microsporum canis*, quando semeadas, tem crescimento estimado em cerca de seis a dez dias. Macroscopicamente, formam micélios de textura cotonosa, discreto relevo umbilicado, radiado e de coloração branca ou amarelada, podendo aparentar, também, uma tonalidade marrom-clara. Já, o reverso da colônia é, igualmente, amarelado ou marron-claro. Microscopicamente,

há grande quantidade de macroconídios, em forma de fuso, de paredes grossas, rugosas, com um pico terminal característico e numerosas septações, que variam de cinco a sete, porém, em determinadas ocasiões, podem ser observadas até mais. Quando presentes nos cultivos, os microconídios são sésseis e sem valor diagnóstico (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; SAENZ, 2001; LACAZ et al., 2002; GÜRTLER; DINIZ; NICCHIO, 2005)

As colônias de *Microsporum gypseum*,por sua vez, apresentam superfície plana, pulverulenta, com pigmentação que varia entre diversos tons de amarelo a castanhado. Apresentam cepas, com micélio inicialmente branco, tornando-se opacas, posteriormente. Em geral, o reverso da colônia é amarelo claro, ocasionalmente avermelhado, em algumas cepas. Microscopicamente, a colônia apresenta macroconídios abundantes, de formato fusiforme com paredes delgadas, contendo três a sete septos, de paredes finas e extremidade menos pontiaguda. Já, as colônias de *Trichophyton mentagrophytes*, têm duas apresentações distintas, uma de coloração branca, com reverso incolor, e outra de coloração acamurçada e reverso acastanhado (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; SIDRIM et al, 2004; LACAZ, et al.,2002;SAENZ,2001).

Quando observa-se um aspecto macromorfológico bastante sugestivo de um determinado dermatófito mas não se evidenciam os macroconídeos, deve-se proceder a técnica do microcultivo, que consiste na obtenção do crescimento fúngico em meio pobre em nutrientes, favorecendo a esporulação e o aparecimento das estruturas de frutificação. Para isso utilizam-se meios de cultura pobres em nutrientes, tais como ágar-fubá ou ágar-batata. Inicialmente, realiza-se a montagem de lâmina com lamínula por sobre um suporte de vidro, sendo este material previamente esterilizado em autoclave. Em seguida procede-se com o corte do meio de cultura em forma de blocos e a transferência de um destes para a lâmina. Com o auxílio de uma alça em L, retiram-se fragmentos da colônia, a ser identificada, inoculando-os nos quatro lados do bloco. Coloca-se, uma lamínula por sobre o cubo de ágar inoculado. Incuba-se em câmara úmida estéril por aproximadamente 15 a 20 dias, à temperatura ambiente. Quando houver crescimento adequado, remove-se a lamínula do bloco de ágar e esta é colocada por sobre lâmina acrescida de uma gota de Azul de lactofenol (SAENZ, 2001; SIDRIM; ROCHA, 2004)

O cultivo fúngico ainda permanece sendo o principal método de diagnóstico

das dermatofitoses, em virtude de suas elevadas taxas de sensibilidade e especificidade. No entanto, cabe ressaltar que essa técnica apresenta alguns entraves: demanda longo treinamento e sagacidade do examinador; despende tempo relativamente longo para o correto preparo dos meios de cultura e consiste em técnica morosa para a obtenção do resultado final, que segundo (SIDRIM; ROCHA, 2004) gira em torno de duas a três semanas.

Com o intuito de auxiliar, ou até mesmo substituir, os métodos convencionais de diagnóstico utilizados na rotina dos laboratórios de micologia, houve um crescente progresso no desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas de diagnóstico. Esses novos ensaios proporcionaram um importante avanço na área de microbiologia médica, que culminou na rapidez da obtenção dos diagnósticos das enfermidades infecciosas (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Nesse contexto, relata-se que uma das técnicas sorológicas mais comumente utilizadas é o ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), a qual é considerada uma metodologia de execução relativamente simples e que apresenta boa sensibilidade. O princípio básico da técnica consiste na detecção e/ou quantificação do complexo antígeno-anticorpo. Para isso, inicialmente promove-se a imobilização de um dos reagentes (anticorpo ou antígeno) em uma fase sólida. A seguir, procede-se com a adição da amostra a ser testada e, também com o anticorpo secundário ligado a uma enzima o qual reagirá com o complexo antígeno-anticorpo. Finalmente, os imunocomplexos são revelados ao adicionar-se o substrato da enzima que consiste em uma solução cromógena. A fluorescência emitida pela reação é então quantificada e expressa objetivamente (PERUSKI; PERUSKI, 2003). Atualmente, diversas doenças infecciosas e parasitárias são pesquisadas pelos métodos imunológicos, sobretudo a ELISA. Em virtude de sua simplicidade, rapidez e possibilidade de automação, a qual permite analisar um grande número de amostras com um pequeno volume de amostra (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001)

Outro método também utilizado na área de microbiologia médica é o *Western blot* ou também chamado de *Immunoblotting,* o qual se baseia na detecção de frações antigênicas imunodominantes e na identificação da reatividade específica de anticorpos. Para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário em primeiro lugar a obtenção da membrana com as frações antigênicas, e para isso as proteínas são separadas de acordo com o seu tamanho molecular, através de

eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Depois de separadas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF, onde ficam inertes e posteriormente serão utilizadas como suporte para a detecção da interação antígeno-anticorpo. O complexo antígeno-anticorpo é visualizado por aplicação de conjugado enzimático, ao qual se adiciona substrato cromagênico, resultando em cor à reação. Ao término do processo, realiza-se a leitura visual da possível reação. Essa metodologia apresenta como vantagem, a menor ocorrência de reações inespecíficas, o que reduz o aparecimento de resultados falso-positivos (MADRUGA; ARAÚJO; SOARES, 2001).

Sabe-se que apesar dos dermatofitos provocarem apenas uma infecção epidérmica superficial, é sabido que eles são capazes de evocar respostas imune celular e humoral (PINTER et al., 1992; DEBOER; MORIELLO, 1993; SPARKES; STOKES; GRUFFYDD-JONES, 1995; PEANO; RAMBOZZI; GALLO, 2005), sendo essa última passível de ser evidenciada pelos métodos sorológicos. Alguns poucos ensaios foram previamente desenvolvidos na tentativa de otimizar o diagnóstico sorológico da dermatofitose em animais (MIGNON et al., 1999b; PEANO; RAMBOZZI; GALLO, 2005), e até apresentaram resultados satisfatórios. Porém, até o presente momento, nos bancos de dados acessados, não foi evidenciado um método sorológico capaz de detectar e diagnosticar via ELISA e WB, os felinos tidos como assintomáticos ou carreadores de *M. canis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia diagnóstica dos testes imunoenzimáticos, ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e *Western blot* (WB), para o diagnóstico sorológico da dermatofitose felina causada por *M. canis* em gatos Persas assintomáticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Investigar a resposta imune humoral de gatos naturalmente infectados, quer enfermos quer portadores assintomáticos, por meio de teste imunoenzimático ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) para a detecção de anticorpos contra dermatófitos.

2) Padronizar e validar os testes ELISA e WB para o diagnóstico precoce da dermatofitose felina.

3) Cotejar o desempenho do teste ELISA perante ao clássico cultivo micológico (“gold standard”), para o diagnóstico da infecção em felinos.

4) Comparar valores de ELISA obtidos em gatos portadores assintomáticos relativamente aos ditos sintomáticos.

5) Analisar possível correlação dos resultados obtidos pelo ELISA frente à gravidade do quadro clínico.

6) Identificar as proteínas imunogênicas do *M. canis* pela técnica de *Western blot.*

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho constituiu-se em um estudo clínico observacional, prospectivo e transversal, conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, com aprovação das Comissões de ética no uso de animais bem como de Ética hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

A coleta das amostras transcorreu após a devida concordância e assinatura do "Termo de consentimento livre e esclarecido" por parte dos proprietários, previamente informados sobre todos os aspectos científicos e metodológicos da pesquisa em tela.

4.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

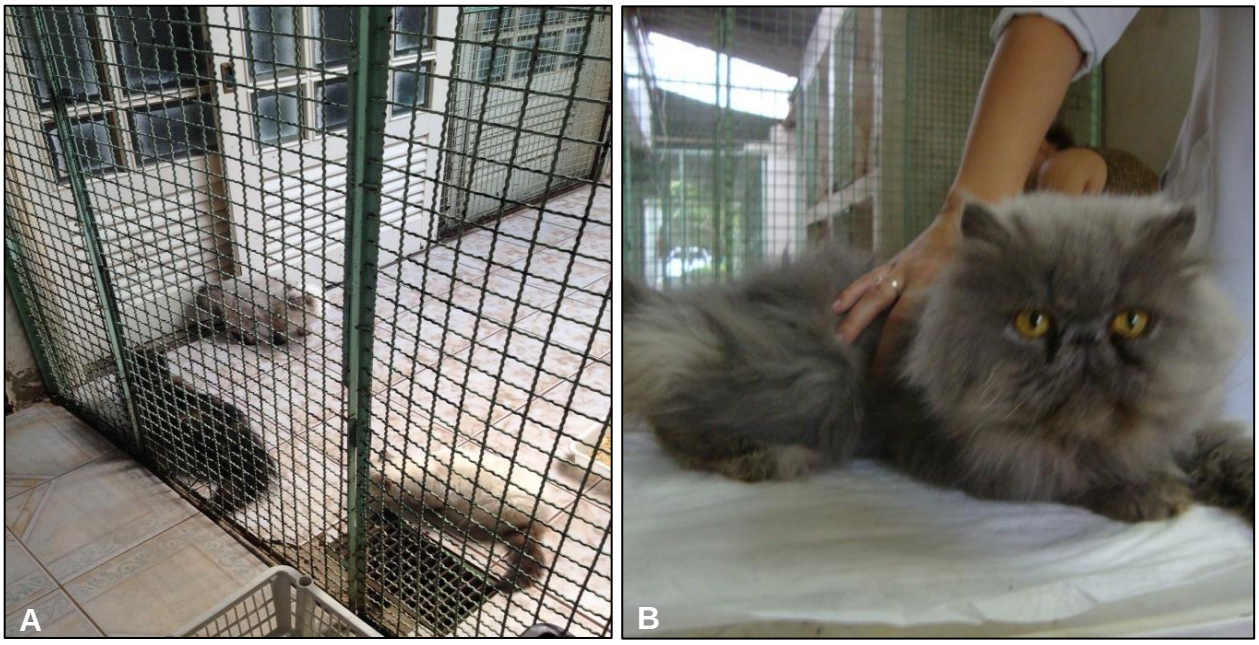
Foram selecionados três gatis comerciais da raça Persa localizados nas zonas leste e sul da cidade de São Paulo, compreendendo os bairros Vila Formosa (Figura 1), Ipiranga e Saúde. Após a visita a estes gatis foi possível a inclusão de 47 felinos no projeto. Além disso, no Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ-USP foram selecionados outros 23 animais, totalizando, então, 70 animais. Esses animais foram alocados em três grupos:

- Grupo sintomáticos (S): consideraram-se como critérios de seleção, felinos da raça Persa, de idades variadas e de quaisquer dos sexos, que apresentassem lesões tegumentares decorrentes de microsporíase, cujo diagnóstico foi confirmado por exames micológicos (fluorescência obtida pela interposição da Luz de Wood e pelo cultivo em Mycosel-Agar BD™). Posteriormente, esses animais foram escalonados conforme a distribuição corpórea de suas lesões, em três subgrupos: lesões localizadas (uma a três lesões), múltiplas lesões (quatro a seis lesões) e lesões generalizadas (mais de seis lesões, coalescentes pelo corpo).

- Grupo assintomáticos (AS): consideraram-se como critérios de seleção e inclusão, felinos da raça Persa, de idades variadas e de quaisquer dos sexos e desprovidos de lesões tegumentares, negativos à Luz de Wood, no entanto com resultado positivo para *Microsporum canis* ao exame de cultivo fúngico. Esses animais foram caracterizados como portadores assintomáticos.

- Grupo negativos (N): selecionou-se similarmente, felinos preferencialmente, da raça Persa, de idades variadas e de quaisquer dos sexos e que se mostravam negativos à Luz de Wood e nos cultivos micológicos.

Figura 1- Gatil comercial da raça Persa localizado no bairro Vila Formosa, na Zona Leste da Capital paulista (A) e felino selecionado para coleta de material (B). São Paulo, 2014.



Fonte: (SANTANA,2014)

4.2 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Todos os animais foram submetidos à minuciosa anamnese, criterioso exame físico, coleta de sangue, para execução das provas sorológicas, e de pelame, para realização de cultivo fúngico. Além disso, todos os animais foram examinados pela interposição da Lâmpada de Wood (250 nm - Biobrasil®). Para tanto, inicialmente o aparelho era conectado à rede elétrica e pré-aquecido por cinco minutos, para

estabilização das ondas UV. A seguir o animal, a ser examinado, era deslocado a recinto escuro e todo a superfície corpórea era exposta à luz ultravioleta por cerca de dois minutos e prontamente firmava-se o resultado como positivo (fluorescência esverdeada, ou em “maçã verde”) ou negativo. Esse exame foi realizado sempre por um mesmo observador a fim de se evitar a indesejável subjetividade do teste.

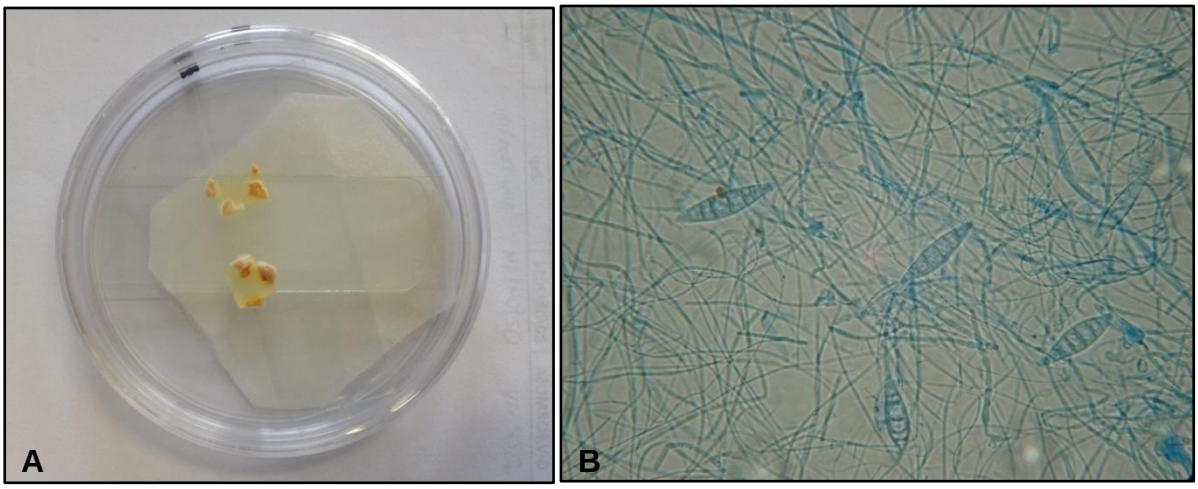
O pelame foi coletado pela Técnica do carpete, segundo metodologia descrita por Mariat e Adam-Campos (1967), utilizando-se de quadrados (5x5cm) de carpete estéril, friccionados por toda a superfície tegumentar. Padronizou-se que os carpetes fossem friccionados em faixas paralelas, em ambas as metades longitudinais do corpo, iniciando-se pela região da face e progredindo caudalmente por toda a superfície corpórea até o término da cauda. A fricção do pelame foi realizada a favor e contra o sentido de inserção dos pelos. Após a colheita, os carpetes foram re-embrulhados, no invólucro aluminizado original, identificados, e processados em até 24 horas no Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos do ICB-USP.

O material colhido foi decalcado, em condições de esterilidade, em placas de Petri contendo Mycosel-Agar (BD™), previamente preparadas e, então, incubado em estufa a 25ºC por 21 dias. Realizou-se a leitura das placas semanalmente e quando da evidenciação do crescimento de dermatófitos, estes foram identificados por análise morfológica macroscópica utilizando-se da técnica da colônia gigante, e/ou pela morfologia microscópica, por microcultivo em lâmina (Figura 2) descritos por Rebell e Taplin (1971). Para se atribuir o resultado negativo quanto ao crescimento de dermatófitos no cultivo fúngico, aguardou-se um prazo de até vinte um dias a contar da data de admissão do exame sendo as placas novamente analisadas e então era firmado o diagnóstico negativo.

Para a execução das provas sorologias foram coletados aproximadamente 3 mL de sangue, por meio de punção venosa jugular e, em seguida, as amostras foram individualmente dispostas em tubos estéreis contendo solução anticoagulante contendo ácido etilenodiamino tetra-acético e, então armazenados sob refrigeração em temperatura de 4º a 8ºC até o processamento das amostras. Decorridas, aproximadamente, quatro horas, as amostras sanguíneas foram submetidas à centrifugação a 1077g, e os soros foram então separados em alícotas de 50 microlitros e armazenados à temperatura de 20ºC negativos.

Para o diagnóstico da imunodeficiência felina (FIV) e da leucemia felina (FeLV) foi utilizado o teste de ELISA com os ensaios imunoenzimáticos comerciais Snap Combo FeLV Antigen/FIV Antibody Test Kit ® (IDEXX Laboratories), realizado de acordo com as orientações do fabricante. Esses kits combinam um teste direto para identificação do antígeno viral p27 do FeLV e um indireto para identificação de anticorpos específicos contra o vírus da imunodeficiência felina.

Figura 2- Técnica de microcultivo (A) e avaliação microscópica de hifas e conídios de *Microsporum canis* oriundo de material colhido pela Técnica do carpete a partir de felinos - Azul de lactofenol 40x (B). São Paulo, 2014.



Fonte: (SANTANA,2014)

4.3 CULTIVO DE *MICROSPORUM CANIS*

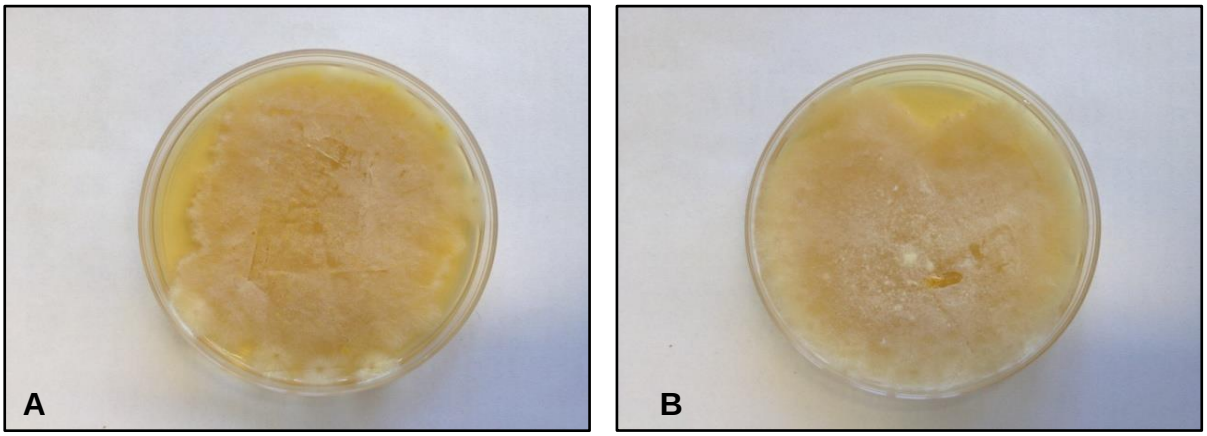
Após a identificação e caracterização dos cultivos fúngicos realizou-se a padronização da técnica de produção de antígeno de *Microsporum canis.* Nesta etapa seguiu-se a metodologia descrita por Peano et al. (2005) com modificações. Inicialmente foram selecionados seis isolados de *M. canis* obtidos a partir de felinos da raça Persa, naturalmente infectados, como disposto na tabela 01. O critério adotado para a seleção dos isolados fúngicos foi o da evidenciação de colônia de *M. canis* de, crescimento exuberante e sem o crescimento de fungos contaminantes (Figura 3). Além disso, decidiu-se por selecionar cepas de distintos gatis a fim de promover um *pool* de antígenos, pressupostamente heterogêneos.

Tabela 1 - Cepas de *Microsporum canis* selecionadas a partir de cultivos fúngicos de felinos Persas, para a confeccção do antígeno. São Paulo, 2015.

Animal (Nº)	Sexo	Idade (meses)	Procedência
Kate (8)	F	84	HOVET-USP
Chupa cabra (12)	M	4	Gatil 01
Black Jack (28)	M	48	Gatil 01
Emilly (17)	F	72	Gatil 02
Ink Link (49)	F	24	Gatil 03
Kora (46)	F	12	Gatil 03

Fonte: (SANTANA, 2015)
F: fêmea; M:macho ; Gatil 01: Ipiranga ; Gatil 02: Vila Formosa ; Gatil 03: Saúde

Figura 3- Colônia de *Microsporum canis* de aspecto cotonoso branco em Mycosel-Agar (BD™) provindo dos animais “Blackjack” (A) e “Emily” (B). Laboratório de Fungos Dimórficos Patogênicos -ICB/USP. São Paulo, 2014.



Fonte: (SANTANA, 2014)

Em cabine de segurança biológica, as colônias dos isolados fúngicos foram levemente escarificadas com auxílio de alça descartável e o material obtido foi então transferido individualmente para frascos tipo Erlenmeyer, contendo 400 mL de meio Saboraud líquido estéril (dextrose 8g, peptona 4g e 400 ml de água destilada) com o objetivo de promover expansão fúngica. Em seguida, os frascos foram incubados em estufa tipo “shaker” (C25KC Incubator Shaker® - Edison, EUA) por 15 dias a 25º C e sob agitação constante de 1200 *g*.

Posteriormente, os Erlenmeyer foram retirados do agitador e, em seguida, adicionaram-se 4 ml de Timerosal a 5% (Sigma, St. Louis, EUA) em cada um dos frascos, com o intuito de promover a morte dos micélios. Na sequência, os materiais foram mantidos sob refrigeração a 5º C por 48 horas. Após esse período, realizou-se

a distribuição das amostras em alícotas de 40 ml em tubos Falcons e então submeteram-nos à centrifugação de 4600 *g* durante 60 minutos a 10º C (Sorvall, modelo Biofuge Primo R®).

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram “alicotados” e transferidos para recipiente identificado como “Pool de antígeno sobrenadante”, e esse foi então armazenado a 20º C negativos até o momento de uso. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em solução salina tamponada com fosfatos 0,01M (PBS) e submetidos a uma centrifugação a 4600 *g* durante 60 minutos a 10º C. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram “alicotados”, identificados como “Pool de antígeno pré-sonicado” e congelados a 20º C negativos por 24 horas. Sequencialmente o material foi descongelado em temperatura ambiente (25º C), resuspendido em PBS e submetido a sonicação por três ciclos de um minuto/40 Khz, em “banho de gelo”, utilizando o sonicador US 1400 (Sonicador Unique®), para promover a destruição das hifas, cujo resultante foi confirmada por microscopia direta.

O material sonicado foi centrifugado a 4600 *g* por 60 minutos a 10º C, e então o sedimento foi desprezado e os sobrenadantes foram armazenados em tubos identificados como “Pool de antígeno sonicado”. Logo a seguir, tanto os antígenos sonicados quanto os de sobrenadante foram dialisados separadamente em solução contendo água destilada acrescida de dextrose (0,8 grama/litro) a 4°C durante 24 horas sob agitação mecânica, utilizando membrana de diálise (Sigma®, D-0405) com *cut off* de 12 KDa. Realizaram-se ao todo três trocas da solução de diálise.

Posteriormente, os materiais foram filtrados separadamente com filtro (TPP®) membrana 22 (0,22 µm) e em seguida, realizou-se o processo de liofilização (LABCONCO®, modelo Free Zone Benchtop Freeze Dry System) com o intuito de promover a concentração das proteínas. A liofilização foi conduzida até secagem completa de ambas as amostras, que perdurou por cinco dias, tendo como base o controle de umidade residual do próprio equipamento. Após a liofilização, os materiais foram resuspensos em água miliqué e distribuídos em alíquotas de 150 µL e armazenados a 20°C negativos.

4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração proteica dos extratos fúngicos foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), em que se utiliza 1,0 mg/ml de soro albumina bovina BSA-(Sigma®, St. Louis, EUA) como proteína de referência para a obtenção da curva padrão. Após o desenvolvimento da reação, a leitura da absorbância foi realizada utilizando-se espectrofotômetro (Epoch® - Biotek) com filtro de 595 nm de comprimento de onda.

4.5 SDS-PAGE

Para a etapa de observação do perfil eletroforético foi utilizado o método descrito por Laemmli (1970), o qual utiliza gel de poliacrilamida associado a dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de separação foi utilizado na concentração de 10 % de acrilamida e bisacrilamida e o gel de empilhamento a 3% de acrilamida. As amostras em análise foram diluídas em tampão de amostra sem agentes redutores, na proporção de 1:5 e em seguida submetidas à fervura a 100º C por cinco minutos. Após o término do processo de fervura, aplicou-se 20 microlitros da mistura em cada um dos poços do gel SDS-PAGE e procedeu-se a eletroforese.

Para a migração eletroforética utilizou-se aparelho Mini-Protean® (Bio-Rad) ajustado com voltagem inicial de 60 Volts, durante 30 minutos e após a penetração no gel de corrida, a voltagem foi mantida a 80 Volts até que o corante indicador atingisse o final do gel de separação. O padrão de massa molecular utilizado como curva de referência foi o Pre-stained Protein Standard (Novex®) que compreende proteínas entre 260 a 3,5 kDa. Após o término da corrida, os géis foram corados pelo método da Prata (ANSORGE, 1985).

4.6 WESTERN BLOT

Após o término da corrida eletroferética, o gel a ser transferido foi imerso em tampão de transferência de *Western blot,* contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM, e metanol a 20% durante 15 minutos. Em seguida, utilizou-se o aparelho Mini Protean® (Bio-Rad) para realizar a transferência das proteínas do gel para membrana de PVDF de 0,45 µm (Immobilon-P Membrane®). Esse processo perdurou durante uma hora à voltagem constante de 90 Volts e para o controle da transferência foi utilizado o padrão de massa molecular pré-corado (Pre-stained Protein Standard - Novex®), o qual permitiu a visualização das bandas coloridas na membrana.

Após a confirmação da transferência, a membrana em fluoreto polivinidileno foi cortada em tiras verticais de aproximadamente 4 mm e essas foram imersas em solução bloqueadora contendo PBS-T (0,05% de Tween-20) acrescido de 5% de leite em pó desnatado, sob à temperatura ambiente por uma hora e em constante agitação. Após o bloqueio dos sítios de ligação inespecíficos, as membranas foram então lavadas por quatro vezes durante 5 minutos com PBS-T e incubadas "overnight" com anticorpos primários diluídos 1:50 em PBS-T contendo 1,5% de leite em pó desnatado.

Após a incubação com os soros dos animais, as tiras foram lavadas com PBS-T por seis vezes, contabilizando cinco minutos para cada lavagem. Para a detecção dos anticorpos, foi adicionado conjugado enzimático IgG-anticat-peroxidase (Sigma Chemical®, St. Louis, MO, USA), diluído a 1/100 no mesmo diluente do soro e incubado por uma hora a temperatura ambiente. Novo ciclo de lavagem com PBS-T foi realizado e em seguida a reação foi revelada com solução cromógena composta de diaminobenzina (Sigma Chemical ®., St. Louis, MO, USA). Para cada 0,05 g da solução cromógena acrescentou-se 50 mL de TrisHcl e 10 µL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 30 volumes). A revelação das bandas foi acompanhada visualmente e quando da evidenciação das mesmas, a reação foi interrompida com água destilada.

As tiras foram então colocadas para secar, ao abrigo da luz, e analisadas conforme o perfil imunológico de reatividade para as diferentes frações protéicas examinou-se, também, a intensidade de revelação, a qual foi graduada nos

seguintes níveis: (+1) reatividade fraca, (+2) reatividade moderada ou (+3) reatividade intensa.

4.7 ELISA

Para a reação do ELISA indireto foram utilizadas microplacas de poliestireno de fundo chato com 96 poços (Jet Biofil®). Na fase inicial de padronização foram utilizadas amostras positivas e negativas de acordo com os resultados obtidos no cultivo micológico. Testou-se quatro diferentes concentrações de antígeno (2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15µg/mL) frente a seis diluições dos soros (1:20, 1:50, 1:100 e 1:200). A concentração de conjugado empregado foi de 1: 1000, conforme o recomendado pelo fabricante (Sigma Aldrich®).

A diluição ideal para uso foi determinada através da combinação entre as concentrações de antígeno e de anticorpos capazes de produzir o maior valor de absorbância para as amostras positivas, baixa leitura de densidade ótica do soro do individuo hígido e apresentar maior diferença das médias de absorbância entre as amostras positivas e negativas. Assim sendo, a padronização indicou que a melhor concentração protéica para a sensibilização da placa foi de 5 µg/mL e de 1:50 para a diluição do anticorpo primário.

Os poços foram então sensibilizados com 500 nanogramas de antígeno bruto de *M. canis*, durante uma hora a temperatura constante de 37º C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com 200 µ l de 5% de leite desnatado em PBS-T (solução de bloqueio) por duas horas a 37º C. Após nova lavagem, foram adicionados os soros diluídos a 1/50 conforme padronização prévia e incubados por 18 horas (“overnight”).

Após a incubação do anticorpo primário (soro) foram realizadas três lavagens na placa, para promover a retirada dos anticorpos que eventualmente não reagiram com o antígeno. Adicionou-se a cada um dos poços 100 µl de conjugado anti-IgG felina marcado com peroxidase (Sigma®) diluído 1:100 e incubou-se por 1 hora a 37ºC. Realizaram-se outras três lavagens para remoção dos anticorpos que não reagiram com o anticorpo primário. Todas as etapas de lavagem foram realizadas

em lavador automático de placas ELX50 Washer, BioTek®, com 250 µl de solução de lavagem por cavidade.

Para finalizar, foram adicionados 50 µL da solução cromogênica (tetrametilbenzidina - TMB/H_2O_2) e as placas foram então incubadas por 15 minutos ao abrigo da luz. A seguir, foram adicionados 50 µ l de H_2SO_4 4N e realizado leitura das densidades ópticas das amostras à 405nm em leitora ELISA Biotek ELX808®, associada ao *software* de análise Gen5 (Biotek®). Com o intuito de verificar possíveis ligações inespecíficas do anticorpo secundário com o antígeno sensibilizado à placa, foi realizado o chamado “controle branco” que consistia na adição de tampão PBST em substituição do soro.Todos as amostras foram analisadas em duplicata e as absorvâncias finais foram obtidas subtraindo-se a absorvância da amostra dita controle branco, ou seja, desprovida de anticorpo primário. Todos os experimentos realizados, neste trabalho, foram repetidos nas mesmas condições em dias diferentes por três vezes. O valor de absorbância de cada soro em todos os experimentos realizados foi a média aritmética dos valores obtidos na duplicata onde o soro foi aplicado.

5 ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio da utilização do programa computacional GraphPad Prism®, versão 5.0, (GraphPad Software, Inc.) para Windows. Para avaliar a normalidade dos dados empregou-se o teste de hipóteses Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$) e para comparar as densidades ópticas nos Grupos utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn. Para todos os testes, foi considerado um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$), o que corresponde ao nível de confiança de 95%. Realizou-se, também, a análise estatística descritiva, com medidas de posição e dispersão. Determinou-se frequências para variáveis categóricas, média, mediana, moda e os percentis 25 (P_{25}) e 75 (P_{75}) para variáveis contínuas.

Para determinar o limiar de reatividade (“cut-off”) do ELISA, ou seja, o ponto de corte do teste que discrimina os grupos positivos e negativos, adotou-se como padrão ouro o cultivo micológico e realizou-se o cálculo utilizando a média dos valores de ELISA entre os animais negativos acrescido de uma vez o desvio padrão (Cut-off = μDO(neg) + 1xDP), conferindo ao teste ótima sensibilidade. Com vistas a produzir um aumento de especificidade ao teste, foi utilizado um segundo critério para interpretação dos resultados, que correspondeu à média aritimética da densidade óptica dos soros controle negativos acrescido de dois desvios padrão (Cut-off = μDO(neg) + 2xDP).

Com a finalidade de avaliar a validade do teste, foram calculados: curva ROC, acurácia, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN). O padrão-ouro com o qual o novo teste foi contrastado e comparado foi o do cultivo fúngico.

6 RESULTADOS

6.1 Exames micológicos

Recrutou-se, ao todo, 70 felinos oriundos de gatis comerciais ou do atendimento clínico rotineiro do Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP. Dos 70 felinos avaliados, 65 (92,8%) eram da raça Persa e cinco (7,2%) sem raça definida. Quanto ao sexo, 37 (52,8%) eram machos e os 33 (47,2%) remanescentes fêmeas. A média de idade foi de 48 meses (± 30,9)., variando entre um mês e 130 meses. O numero de felinos com menos de um ano de idade foi sete (10 %). Quanto a distribuição lesional do Grupo dos positivos sintomáticos, 13 (65%) animais apresentaram lesões localizadas, três (15%) apresentaram múltiplas lesões e quatro (20%) apresentaram lesões generalizadas. Não foi observada diferença estatística (α=0,05) quanto à distribuição lesional.

Assinalou-se fluorescência com a Lâmpada de Wood em apenas oito (10,6%) felinos, como demonstra a tabela 2. Porém, ao todo cinquenta animais apresentaram positividade ao *M. canis* através do cultivo micológico. Desses cinquenta animais positivos, 20 possuíam lesão dermatológica compatível com microsporíase e portanto foram alocados no Grupo S. Os outros 31 não apresentaram lesão tegumentar aparente e portanto foram alocados no Grupo AS, que corresponde ao grupo dos animais assintomáticos.

Tabela 2-Resultados obtidos em felinos submetidos à interposição pela Lâmpada de Wood. São Paulo, 2015

Resultado	**Número**	**Porcentagem** (%)
Positivo	8	10,6
Negativo	62	89,4
Total	70	100,0

Fonte: (SANTANA, 2015)

Para compor o Grupo negativo (N) obteve-se, cinco animais com lesão dermatológica não atribuída a microsporíase e outros 15 felinos sem lesão dermatológica aparente. Todos esses animais apresentaram negatividade à inspeção direta pela Lâmpada de Wood e ao exame micológico de cultivo fúngico.

No quadro 1, dispõem-se os 70 animais incluídos no estudo nos Grupos dos animais sintomáticos, assintomáticos e negativos.

Quadro 1- Felinos constituintes dos Grupos S (sintomáticos), AS (assintomáticos) e N (negativos), segundo os resultados dos cultivos micológicos e da interposição pela Lâmpada de Wood. São Paulo, 2015.

(continua)

Nº	Nome	Raça	Sexo	Idade	Procedência	Lâmpada de Wood	Exame micológico	Grupo
1	Wikka	Persa	F	48	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
2	Elemental	Persa	M	48	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
3	Enia	Persa	F	48	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
4	Hector	Persa	M	72	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
5	Alluri	Persa	F	60	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
6	Frapucina	Persa	F	24	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
7	Nirvana	Persa	F	84	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	S
8	Kate	Persa	F	84	FMVZ/USP	Positivo	*Microsporum canis*	S
9	Grazi	Persa	F	36	FMVZ/USP	Negativo	*Microsporum canis*	S
10	Chico	Persa	M	72	FMVZ/USP	Negativo	*Microsporum canis*	S
11	Yasmin	Persa	F	24	FMVZ/USP	Negativo	*Microsporum canis*	S
12	Chupa cabra	Persa	M	48	Gatil 02	Positivo	*Microsporum canis*	S
13	Lady Kiss	Persa	F	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
14	Gato escama	Persa	M	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
15	Riti	Persa	M	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
16	High Fashion	Persa	F	60	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
17	Emily	Persa	F	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
18	Eloi	Persa	M	48	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
19	Pom Pom	Persa	F	36	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
20	Jerry	Persa	M	48	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	S
21	Lotie Black	Persa	M	72	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
22	Sorbet	Persa	F	36	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
23	Double Black	Persa	M	72	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
24	Belle	Persa	F	36	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
25	Lotie	Persa	M	108	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
26	Pyerre	Persa	M	144	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS

(continuação)

Nº	Nome	Raça	Sexo	Idade	Procedência	Lâmpada de Wood	Exame micológico	Grupo
27	Skyfall	Persa	F	12	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
28	Blackjack	Persa	M	48	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
29	Parti Wai	Persa	F	72	Gatil 01	Negativo	*Microsporum canis*	AS
30	Tinker Bel	Persa	F	48	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
31	Lana Turner	Persa	F	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
32	Yame	Persa	F	60	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
33	Latifa	Persa	F	36	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
34	Sr. Wilson	Persa	M	96	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
35	Wilbor	Persa	M	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
36	Hercules	Persa	M	72	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
37	Aslan	Persa	M	48	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
38	Clark	Persa	M	96	Gatil 02	Negativo	*Microsporum canis*	AS
39	Dawn	Persa	M	72	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
40	NeverMind	Persa	F	7	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
41	Touch	Persa	F	24	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
42	Rigoleto	Persa	M	12	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
43	Melborn	Persa	F	12	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
44	Amapola	Persa	F	96	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
45	Lucrécia	Persa	F	12	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
46	Kora	Persa	F	12	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
47	Dancing Queen	Persa	F	48	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
48	Rosinha	Persa	F	72	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
49	Inklink	Persa	M	24	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
50	Solaris	Persa	M	60	Gatil 03	Negativo	*Microsporum canis*	AS
51	Manx	Persa	M	12	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
52	Enzo	Persa	F	84	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
53	Shanaia	Persa	F	48	Gatil 02	Negativo	Negativo	N
54	Marie	Persa	F	36	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
55	Boneca	Persa	M	72	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
56	Leona	Persa	F	48	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
57	Sasha	Persa	M	48	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N

(conclusão)

Nº	Nome	Raça	Sexo	Idade	Procedência	Lâmpada de Wood	Exame micológico	Grupo
58	Leo	Persa	M	24	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
59	Lion	Persa	F	12	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
60	Zica	Persa	F	120	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
61	Simba	Persa	M	36	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
62	Filho	Persa	M	48	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
63	Branquinha	Persa	F	84	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
64	Zafar	Persa	M	72	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
65	Lion	Persa	M	132	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
66	Pantera	SRD	F	8	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
67	Sophie	SRD	F	7	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
68	Menina	SRD	F	24	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
69	Ramona	SRD	F	12	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N
70	Farofa	SRD	F	12	FMVZ/USP	Negativo	Negativo	N

Fonte: (SANTANA, 2015)
M: macho, F: fêmea, SRD: sem raça definida; Gatil 01: Ipiranga ; Gatil 02: Vila Formosa ; Gatil 03: Saúde

6.2 FIV e FeLV

Os 70 animais testados para a presença de anticorpos contra os vírus da leucemia felina e da imunodeficiência felina, por meio do Comercial assay Kit SNAP® FIV Antibody/FeLV Antigen Combo Test (IDEXX Laboratories Inc., EUA), apresentaram negatividade ao teste.

6.3 ELISA

As 70 amostras de soro foram submetidas ao teste ELISA e os seus resultados foram expressos em densidade óptica (DO). Todas as amostras foram analisadas em duplicata e as DO finais foram definidas a partir da média aritimética

das absorvâncias nos diferentes testes executados, seguida da subtração do controle nulo, ou seja, o do poço desprovido de anticorpo primário. Na tabela 3 estão dispostos os resultados das densidades ópticas obtidas nos três grupos.

Tabela 3- Valores de DO (densidade óptica) para o ELISA anti-*M.canis* segundo amostras séricas dos felinos.São Paulo,2015.

	Densidade Óptica ELISA (450nm)		
Amostra	**Grupo S**	**Grupo AS**	**Grupo N**
01	1.2	1.1	0.43
02	0.86	0.96	0.34
03	0.83	0.77	0.35
04	0.82	0.65	0.27
05	0.77	0.57	0.25
06	0.77	0.54	0.19
07	0.75	0.51	0.16
08	0.69	0.49	0.16
09	0.60	0.44	0.15
10	0.57	0.43	0.15
11	0,53	0.41	0.15
12	0,46	0.39	0.14
13	0,38	0.37	0.13
14	0,36	0.36	0.13
15	0,33	0.36	0.12
16	0,32	0.36	0.09
17	0,32	0.36	0.07
18	0,31	0.35	0.07
19	0,25	0.34	0.07
20	0,14	0.34	0,07
21	-	0.33	-
22	-	0.32	-
23	-	0.32	-
24	-	0.32	-
25	-	0.31	-
26	-	0.28	-
27	-	0.28	-
28	-	0.27	-
29	-	0.22	-
30	-	0.16	-

Fonte: (SANTANA, 2015)

As DO médias dos Grupos foram, respectivamente, 0.55 para os sintomáticos, 0.36 assintomáticos e 0.10 negativos. Com o intuito de verificar a reprodutibilidade do teste, foram realizadas as análises inter-teste e intra-teste de modo a estabelecer a variância entre as repetições. O coeficiente de variação (CV) intraensaio foi determinado, por meio da análise, em duplicata, em um mesmo dia, de valores de IgG anti-*M.canis* de 10 pacientes de cada um dos Grupos experimentais. Para cada um desses Grupos foram contempladas amostras com densidades ópticas altas, baixas e intermediárias. O CV interensaio, por sua vez, foi estabelecido utilizando-se as mesmas amostras de soro em três dias consecutivos. Os coeficientes de variação inter e intra-ensaio foram calculados pelo *software* Gen 5 e apresentaram valores de, respectivamente, 8,8% e 9,3%.

Para se determinar o limiar de reatividade (“cut-off”) do ELISA, ou seja, o ponto de corte, que discrimina os grupos positivos dos negativos, adotou-se como padrão ouro o cultivo micológico e realizou-se o cálculo utilizando três critérios:

- Critério 1: média dos valores de ELISA entre os animais negativos, acrescido de duas vezes o desvio padrão (*Cut off* = μ DO + 2xDP) .
- Critério 2: média dos valores de ELISA entre os animais negativos, acrescido de uma vez o desvio padrão (*Cut off* = μ DO + 1xDP)
- Critério 3: *cut-off* obtido pela curva ROC

Assim, as amostras foram consideradas positivas para anticorpos contra *M. canis*, quando a D.O. (405nm) fosse superior a 0,35 para o Critério 1, 0,25 para o Critério 2 e 0,14 para o Critério 3. Segundo tais critérios, classificaram-se, então, os soros em VP= verdadeiro positivo (soros de felinos com cultivo micológico positivo); FP= falso positivo (soros de felinos negativos no cultivo micológico e que apresentaram DO acima do *cut off*); VN= verdadeiro negativo (soro de felinos negativos ao cultivo micológico); e FN= falso negativo (soros de felinos positivos no cultivo micológico e que apresentaram DO abaixo do *cutoff*). Diversos parâmetros sorológicos foram testados a partir do teste Elisa: sensibilidade ([VP]/[VP+FN]), especificidade ([VN]/[VN+FP]x100, valor preditivo positivo ([VP]/[VP+FP]), o valor preditivo negativo ([VN]/[VN+FN]) e a acurácia ([VP+VN/N]. Esses valores estão disposto na tabela 04.

Tabela 4- Combinação binária entre os resultados obtidos no ELISA anti-*M.canis* frente aos obtidos pelo cultivo micológico de material provindo de felinos. Avaliação da técnica de ELISA frente aos três critérios de *cut off*.São Paulo, 2015.

		Critério 1 ELISA Anti-*M.canis* *Cut-off* 0,35		Critério 2 ELISA Anti-*M.canis* *Cut-off* 0,25		Critério 3 ELISA Anti-*M.canis* *Cut-off* 0,14	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Cultivo Micológico	Positivo	32 (VP)	18 (FN)	47 (VP)	03 (FN)	49 (VP)	01 (FN)
	Negativo	2 (FP)	18 (VN)	5 (FP)	15 (VN)	9 (FP)	11 (VN)
		Sensibilidade:64% Especificidade:90% Acurácia: 71% VPP: 94% VPN: 50%		Sensibilidade:94% Especificidade:75% Acurácia: 88% VPP: 90% VPN: 83%		Sensibilidade:98% Especificidade:55% Acurácia: 71% VPP: 84% VPN: 91%	

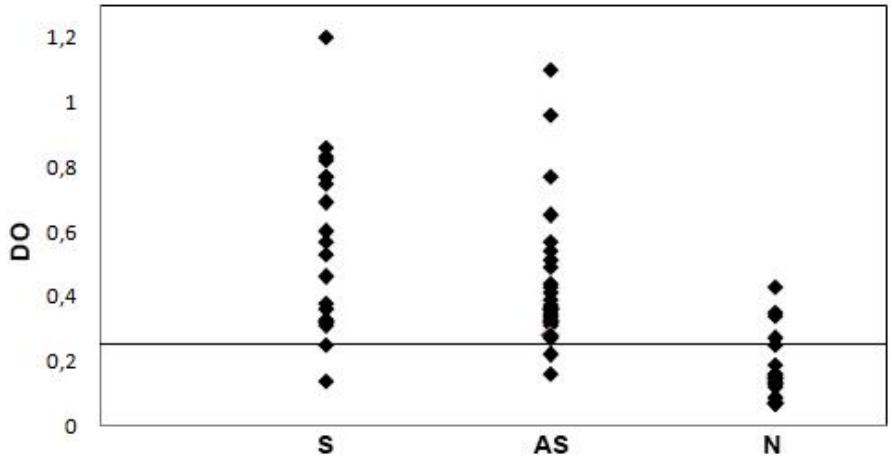
Fonte: (SANTANA, 2015)
VPP-valor preditivo positivo; VPN- valor preditivo negativo;
Critério 1= média da DO dos soros controle negativos + dois desvios padrão (Cut-off = μ DO + 2xDP)
Critério 2= média da DO dos soros controle negativos + um desvios padrão (Cut-off = μ DO + 1xDP)
Critério 3= *cut-off* obtido pela curva ROC

Optou-se por considerar o critério no qual houvesse o equilíbrio mais adequado entre sensibilidade e especificidade. Assim sendo, decidiu-se optar por utilizar o Critério 2 em que foram consideradas positivas as amostras que apresentaram absorvância maior que 0,25 (Figura 4). Dessa maneira, das 50 amostras de soros positivos, apenas três (6%) tiveram valores de absorbância abaixo do ponto de corte. No Grupo de animais negativos, cinco apresentaram valores de absorvância acima do ponto de corte. Foi verificada diferença estatística ($p<0,05$) da densidade ótica, entre a média obtida das leituras dos soros dos felinos negativos com aqueles positivos (sintomáticos e assintomáticos). Porém, quando comparados os valores de densidade ótica nos soros do grupo sintomáticos perante os assintomáticos, não foi observada diferença estatística ($p<0,05$). A avaliação da presença de reatividade cruzada ao teste de ELISA foi determinada a partir de cinco amostras de soro de indivíduos com distintas doenças infecciosas ou inflamatórias, tais como a dermatite alérgica à picada de pulgas (DAPP), malassezíase tegumentar, dermatite atópica, alergia alimentar e esporotricose.

Outro método utilizado para medir o desempenho e acurácia do teste ELISA foi a construção da curva ROC, onde o conhecimento da área sob a curva possibilitou quantificar a exatidão do teste. A área sob a curva ROC constitui-se em indicador importante, pois fornece uma medida da precisão total, independente de

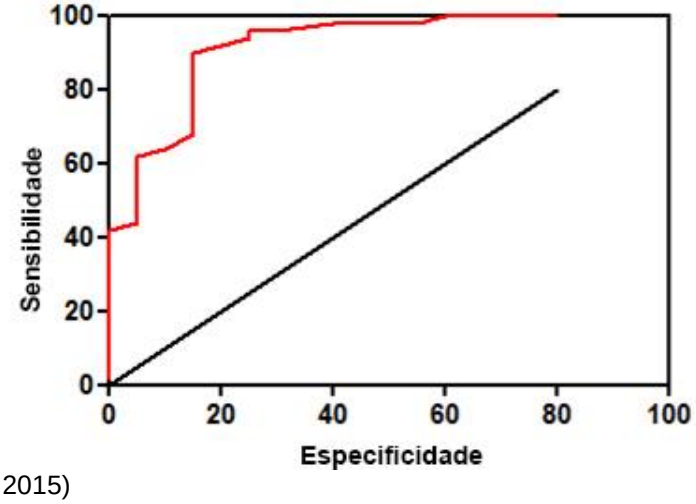
um limiar particular, constituindo-se em um dos índices mais usados para sumarizar a qualidade da curva. Um valor de área menor que 0,7 determina que o teste não tem o poder de discriminar verdadeiros positivos e falsos positivos. Em valores de área situados entre 0,7 a 0,8 e de 0,8 a 0,9 determinam, respectivamente, que o teste é considerado de desempenho “regular” e “bom”. Já, os valores situados acima de 0,9 determinam que o teste possui uma capacidade preditiva considerada de desempenho excelente. A curva ROC para os valores de ELISA anti-*M.canis* teve área de 0,925 (Intervalo de confiança de 95%) o que a configura de desempenho excelente (Figura 5).

Figura 4- Resposta de anticorpos da classe IgG contra *M. canis* soros dos felinos positivos sintomáticos ou assintomáticos e negativos. A linha horizontal representa o ponto de corte da reação. DO-densidade ótica, S-sintomáticos, AS–assintomáticos e N–negativos. São Paulo, 2015.



Fonte: (SANTANA,2015)

Figura 5- Curva Roc para o diagnóstico de dermatofitose felina de acordo com valores de IgG anti-*M.canis* dos felinos.São Paulo, 2015.

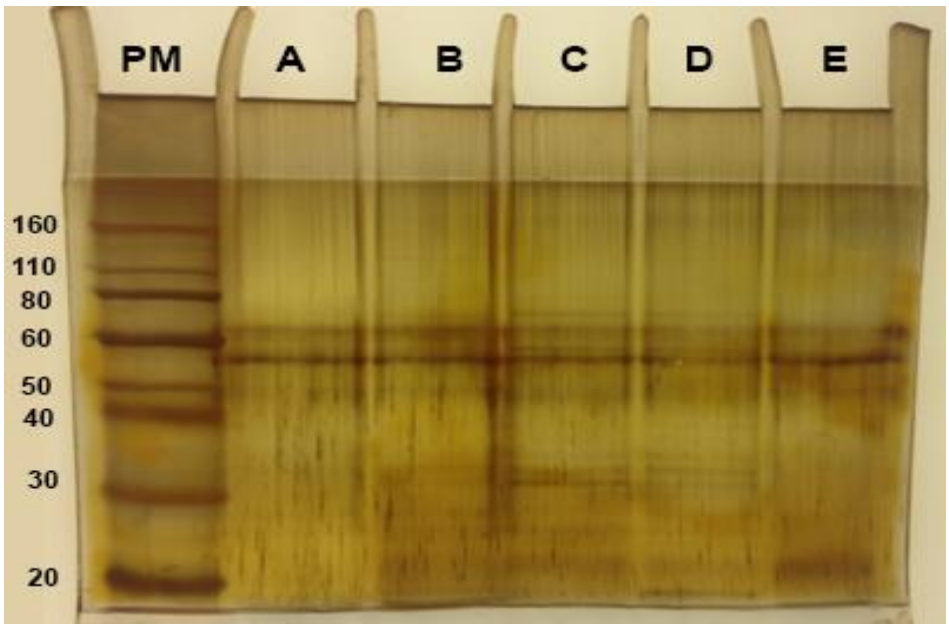


Fonte: (SANTANA,2015)

6.4 SDS-PAGE

A concentração proteica dos extratos fúngicos foi de 0,9 mg/ml para o antígeno sobrenadante e 0,6 mg/ml para o antígeno sonicado, conforme a determinação, utilizando-se do método de Bradford (1976).Quando os antígenos foram submetidos ao SDS-PAGE para observação do padrão eletroforético, observou-se que o antígeno sobrenadante apresentou perfil protéico mais abrangente, contendo as mesmas bandas do antígeno sonicado, além de outras sete bandas. Essas bandas se encontravam em intervalo de 132 a 25 kDa, tal como demonstra a figura 6.

Figura 6- Fotodocumentação de Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE a 10%) corado com nitrato de prata. Canaleta A: antígeno sonicado, B: antígeno sonicado ; C: antígeno sobrenadante ; D: antígeno sobrenadante; E: antígeno sobrenadante; PM:Marcador de peso molecular 160 a 20 KDa (Novex Sharp Pre-stained Protein Standard). São Paulo, 2015

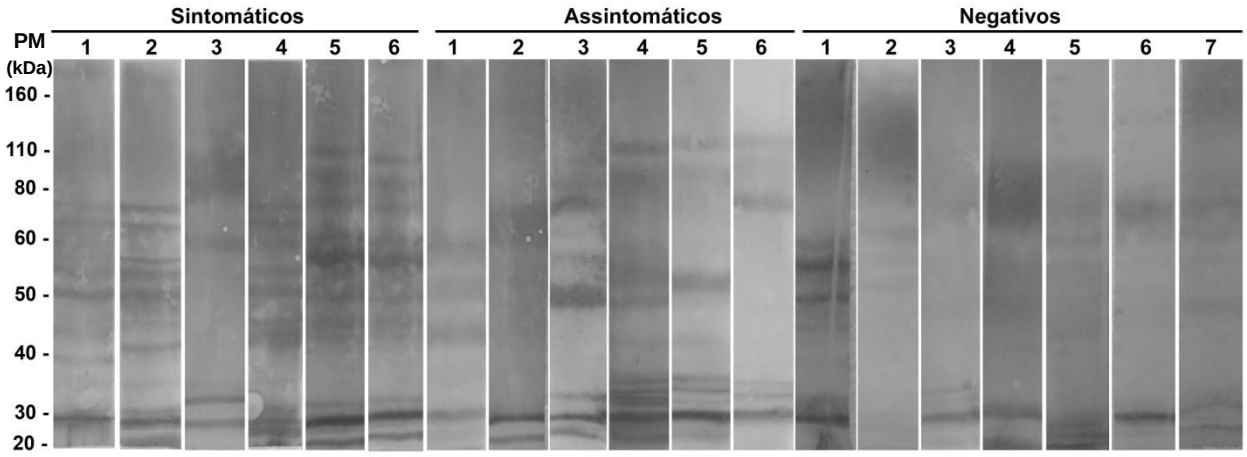


Fonte: (SANTANA,2015)

6.5 *WESTERN BLOT*

O teste de *Western blot* evidenciou a detecção de 13 bandas nas amostras soropositivas nos testes de ELISA. As proteínas imunoreativas tiveram seus pesos moleculares estimados entre 132 a 25 kDa, tal como demonstra a figura 7. O peso molecular de cada banda foi calculado utilizando o método descrito por Hames e Rickwood (1990), que estima o peso da banda segundo o padrão de peso molecular de referência. Para isso utilizou-se um padrão de proteínas com peso molecular previamente conhecido e após a corrida de eletroforese mediu-se a distância percorrida por cada proteína marcadora e calculou-se a razão entre a distância percorrida pela proteína sobre a distância total da corrida eletroforética. Após o arranjo desses dados, obteve-se uma equação baseada na curva de Log PM (massa da proteína padrão) *versus* a migração relativa (da proteína padrão). Por conseguinte, foi realizada a interpolação linear a partir da equação da reta obtida na curva padrão e obtiveram-se, então, os seguintes pesos moleculares: 132, 83, 75, 73, 57, 54, 50, 40, 35, 33, 32, 30 e 25 kDa.

Figura 7- *Western blot* realizado após separação eletroforética do antígeno protéico em gel de poliacrilamida 10% com soro reagente (1/50). PM - Padrão de massa molecular em KiloDaltons (kDa). . Marcador de peso molecular 160 a 20 KDa (Novex Sharp Pre-stained Protein Standard). São Paulo, 2015.



Fonte: (SANTANA,2015)

Das seis amostras de soros provenientes do Grupo S (positivos sintomáticos), todas as seis (100%) apresentaram anticorpos que reagiram com a região de 30

kDa, cinco (83,3%) reagiram com as regiões de 75, 57, 54, 50 e 40 kDa, três (50%) reagiram com a região de 73 kDa e duas (33,3%) reagiram com a região de 132, 83, 32 e 25 kDa. Assim sendo, as regiões de 30, 40, 50, 54, 57 e 75 kDa foram reconhecidas com maior frequência nesse grupo.

No Grupo AS (assintomático) quatro amostras reagiram com as regiões de 50, 33 e 30 kDa, três com as regiões de 132,35 e 25 kDa, duas com de 75 e 32 kDa. Desta forma, os principais antígenos ditos imunodominantes de ambos os Grupos positivos foram as frações proteicas de 30 e 50 kDa. Dentre os soros dos Grupos negativos, foi observado que algumas amostras apresentaram reatividade com uma ou mais bandas, porém em menor quantidade quando comparadas a Grupos positivos. A Tabela 5 sumariza a frequência de aparecimento das treze proteínas nos três grupos.

Tabela 5- Reatividade de anticorpos anti-*M.canis* das amostras de soro de felinos testados para o WB. São Paulo, 2015

Tamanho molecular (kDa)	**Grupo S (Sintomático) n=6**	**Grupo AS (Assintomático) n=6**	**Grupo N (Negativo) n=7**
132	2 (33,3%)	3 (50%)	-
83	2 (33,3%)	-	-
75	5 (83,3%)	2 (33,3%)	1 (14,2%)
73	3 (50%)	-	2 (28,5%)
57	5 (83,3%)	-	-
54	5 (83,3%)	1 (16,6%)	1(14,2%)
50	5 (83,3%)	4 (66,6%)	1(14,2%)
40	5 (83,3%)	1 (16,6%)	-
35	1 (16,6%)	3 (50%)	-
33	1 (16,6%)	4 (66,6%)	-
32	2 (33,3%)	2 (33,3%)	-
30	6 (100%)	4 (66,6%)	6 (85,7%)
25	2 (33,3%)	3 (50%)	-

Fonte: (SANTANA, 2015)

Além da determinação das frações proteícas imunoreagentes, examinou-se a intensidade das reações por meio de classificação visual das bandas. Assim sendo, a intensidade das reações entre os soros e as treze proteínas foi variável, observando-se maior intensidade de reação com o polipeptídeo de 30 kDa, provavelmente pela sua abundância. As leituras de D.O. obtidas para cada amostra no ELISA, assim como seu perfil de reatividade pelo WB, podem ser observadas na tabela 6.

Tabela 6 - Reatividade de anticorpos anti-*M.canis* das amostras de soro dos felinos nos testes imunodiagnósticos ELISA e WB. São Paulo,2015

Animal	Grupo	ELISA DO	WB
01	S	0,15	30(+2), 33(+2)
02	S	0,77	75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 30(+3)
03	S	0,83	75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 35(+2), 30(+3)
04	S	0,53	75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 30(+3)
05	S	0,69	132(+2), 83(+2), 75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 5(+2), 32(+2), 30(+3), 25(+3)
06	S	1,20	132(+2), 83(+2), 75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 5(+2), 32(+2), 30(+3), 25(+3)
01	AS	0,82	50(+2), 40(+2), 30(+3)
02	AS	0,77	50(+2), 40(+2), 30(+3)
03	AS	0,27	75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 35(+2), 30(+3)
04	AS	0,96	132(+2), 83(+2), 75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 5(+2), 32(+2), 30(+3), 25(+3)
05	AS	0,16	132(+2), 83(+2), 75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 5(+2), 32(+2), 30(+3), 25(+3)
06	AS	0,22	132(+2), 83(+2), 75(+2), 73(+2), 57(+2), 54(+2), 50(+2), 40(+2), 5(+2), 32(+2), 30(+3), 25(+3)
01	N	0,13	50(+2), 40(+2), 30(+3)
02	N	0,35	73(+2), 30(+3)
03	N	0,07	30(+3)
04	N	0,43	30(+3)
05	N	0,16	73(+2), 30(+3)
06	N	0,09	30(+3)
07	N	0,07	75(+2), 33(+2), 30(+3)

Fonte: (SANTANA, 2015)
Wb: intensidade fraca (+1), intensidade média (+2) e intensidade alta (+3)

7 DISCUSSÃO

A dermatofitose é uma das enfermidades cutâneas mais frequentes no cotidiano da clínica médica de felinos. Segundo Larsson et al. (1995), as dermatites micóticas se constituem na segunda dermatopatia mais frequente nestes espécimes, atendidos no Serviço de Dermatologia do VCM e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Ainda, aqueles autores, referem que a cada dez gatos atendidos no referido Serviço, pelo menos dois tiveram o diagnóstico estabelecido de dermatofitose.

Dentre as raças felinas mais acometidas por essa dermatose, destacam-se aquelas de pelos longos tais como os Persas e Himalaios. Muitas são as especulações a cerca dessa predisposição e apesar de ainda haver muitos fatos a aclarar, diversos autores nacionais e estrangeiros continuam referindo a raça Persa como a principal raça predisposta a desenvolver dermatofitose (DEBOER; MORIELLO, 1994; BALDA, 2001; FRYMUS et al., 2013). Em função disso, elegeu-se principalmente felinos da raça Persa para compor os Grupos experimentais.

Dos 70 felinos selecionados, 65 (92,8%) eram da raça Persa e demais cinco (7,2%) eram animais sem raça definida. A inclusão desses últimos animais decorreu da dificuldade em obterem-se gatos Persas negativos quanto à presença de dermatófitos, para que se pudesse compor o Grupo negativo. Diversos estudos (ROMANO, 1997; FARIAS et al., 2011) apontaram que felinos da raça Persa podem não apresentar distúrbios tegumentares de microsporíase e, ainda assim, apresentar positividade ao *M. canis*, fato esse que se postula ser uma relação de adaptação do agente fúngico ao hospedeiro. Segundo Deboer e Moriello (1993), em alguns casos a relação de adaptação é tão presente, que o *M. canis* evoca uma mínima resposta inflamatória cutânea, e que muitas vezes não é evidenciada ao exame clínico. Ainda, segundo os mesmos autores, pode-se comparar essa relação com àquela observada entre o homem e as espécies antropofílicas do *Trichophyton.*

No que tange a predisposição etária, a média de idade dos felinos foi de 48 meses (± 30,9), oscilando entre quatro a 130 meses. Dado esse que difere do referido nas bibliografias nacionais e internacionais, onde se dispõe que a enfermidade se desenvolve principalmente em felinos jovens com menos de dois

anos de idade ou em felinos senectos (YAMAMURA et al., 1997; BALDA, 2001; LARSSON; LUCAS, 2015). No entanto, aproximadamente 70% (49/70) dos animais situavam-se na faixa etária doas 24 aos 84 meses de vida, reputada como aquela da faixa fértil relativa a reprodução . Assim sendo, majoritariamente os felinos selecionados para esse estudo provinham de gatis comerciais, e era de se esperar um grande número de felinos nessa faixa etária devido à manutenção visando à procriação e comercialização dos animais.

Quanto ao sexo verificou-se uma maior ocorrência de machos (52,8 %) frente ao número de fêmeas (47,2 %). Porém, não houve diferença estatística. Esse resultado corrobora com o disposto na bibliografia consultada, onde diversos autores afirmam não haver predisposição sexual relacionada às infecções fúngicas superficiais (MIGNON et al., 1999a; BALDA, 2001; CAFARCHIA et al., 2006; NEWBURY; MORIELLO, 2014).

Quanto a sorologia para FIV e FelV nos 70 animais avaliados, evidenciou-se negatividade ao exame para todos os felinos. Dado esse que é corroborado por SIERRA et al. (2000), que também não observaram correlação desses vírus com a presença de dermatófitos. Ainda, segundo os mesmos autores, sugerem que a única correlação existente é da dermatofitose com o ambiente em que os animais vivem. Porém, existem autores que referem associação entre o isolamento de *M. canis* com as infecções virais citadas. A exemplo de Manciati et al. (1992), que observaram uma frequência de isolamento fúngico três vezes maior em gatos FIV/FeLV positivos em comparação com o controle. O fato é que assim como afirmou Ribeiro (2005), sugere-se a realização de estudos prospectivos para maiores esclarecimentos dessa possível relação.

Dos 70 felinos avaliados pela interposição da Lâmpada de Wood, apenas oito (10,6%) apresentaram positividade à radiação UV. No entanto, destes, 50 felinos foram positivos ao cultivo micológico, o que conferiu ao exame pela Lâmpada de Wood sensibilidade de apenas 16%. Assim sendo, os resultados obtidos nesse estudo divergem dos dispostos na bibliografia, onde Cafarchia et al. (2004) e Sparkes et al. (1993), relatam índices de positividade à Lâmpada de Wood em 45,5 e 50%, respectivamente. Esse baixo percentil encontrado poderia ser explicado pelo fato que dos 50 felinos positivos, 30 (60%) eram assintomáticos e esses não apresentavam lesões visíveis que pudessem emitir fluorescência à radiação UV.

No que tange aos resultados obtivos a partir dos cultivos micológicos, encontrou-se positividade ao *Microsporum canis* em 50 (71,4%) deles. Houve uma adição de 10 animais no Grupo assintomático, totalizando ao todo 30 felinos, em virtude da busca dos animais negativos. Em um primeiro momento estes foram selecionados por não apresentarem lesões tegumentares, mas quando da evidenciação do fungo, foram re-alocados no Grupo negativo.

Dos 47 animais provenientes de gatis, apenas um demonstrou negatividade ao exame micológico. Acredita-se que o alto contingente populacional e a permanência dos animais em aglomerados, por vezes até em promiscuidade, foram fatores facilitadores da transmissão do fungo intra-espécie e, consequentemente, da alta taxa de isolamento de dermatófitos. Além disso, constatou-se higienização irregular quanto à escolha dos produtos e a periodicidade de aplicação, o que provocou pressupostamente, uma substancial contaminação ambiental, tornando o ambiente propício à transmissão.

O teste ELISA utilizado para a pesquisa de IgG anti-*M.canis* mostrou-se efetivo para o suporte laboratorial visando o diagnóstico da dermatofitose felina. Utilizando-se como ponto de corte a DO com valor de 0.25, obteve-se 94% de sensibilidade e 75% de especificidade. Na avaliação do Grupo dos felinos positivos sintomáticos, apenas um deles, o animal de número 12, apresentou DO (0.14) abaixo do ponto de corte. Para tal fato, aventaram-se duas possíveis explicações: animal poderia estar na fase aguda da infecção, onde os anticorpos IgG ainda não são detectáveis ou que portasse *déficit* no sistema imunológico e, como consequência, não produzisse resposta imune humoral.

Segundo Mignon et al. (1999a), em experimento realizado utilizando-se de cobaias, evidenciou-se anticorpos IgG contra dermatófitos quando decorridos 15 dias do aparecimento das manifestações tegumentares decorrentes de microsporíase. Ainda segundo Peano et al. (2005), afirma que provavelmente exista uma “janela imunológica” entre o início do quadro clínico e a soro-conversão, fato esse que foi observado em seu estudo em cães com dermafotitose. Dessa forma, para se confirmar tal suposição, poder-se-ia realizar uma nova dosagem de IgG dentro de um período de 15 a 20 dias, ou então, investigar uma imunoglobulina de fase aguda, tal como IgM, porém não se contemplaram essas metodologias no presente estudo. Em relação a hipótese de *déficit* no sistema imunológico, procedeu-

se inicialmente com a realização dos testes de FIV e FelV, os quais foram negativos. Portanto, a partir desses resultados, excluíram-se umas das principais causas de imunossupressão em felinos. Dessa forma, para averiguar o possível *déficit* imune dever-se-ia realizar a pesquisa de outras doenças imunossupressoras, tais como câncer e PIF (peritonite infecciosa felina), por exemplo.

Dentre os animais negativos, quatro deles (felinos 51, 52, 53 e 66) apresentaram valores de DO acima do ponto de corte. Um desses animais, com a DO de 0.43, apresentou cultivo positivo para o Complexo *Sporothrix schenckii* e o outro felino com a DO de 0,34 apresentou-se positivo para *Malassezia pachydermatis*. Postula-se que em ambos os casos pode ter havido reações cruzadas do *Microsporum canis* com àqueles das espécies citadas. No entanto, em um estudo similar realizado em cães, não foi observado reatividade cruzada com outros fungos, a exemplo de *Candida albicans* e *Malassezia pachydermatis* (PINTER et al., 1992). Ainda assim, é necessário avaliar um maior número de conjugados heterólogos para se confirmar, ou refutar tal suspeita.

Dos outros dois animais negativos, com DO acima do ponto de corte, um deles (animal 53) era proveniente de gatil comercial onde todos os demais animais contactantes apresentaram positividade ao *M. canis*. A partir desse fato poder-se-ia inferir que a gata seria um falso-negativo, dado ao alto valor de DO e pelo fato de conviver com felinos infectados onde a chance de infecção era intensa. Além disso, é válido discutir a possibilidade de uma infecção pretérita, e que apesar do animal aparentemente ter debelado a infecção, os níveis de IgG ainda persistiriam elevados.

Do grupo dos felinos positivos assintomáticos, apenas dois deles (23 e 49) apresentaram valores abaixo do ponto de corte, sendo que um destes valores foi considerado valor limítrofe. Acredita-se que para esses animais, exista uma relação de adaptação do fungo ao hospedeiro, o que pode culminar com a elevação não substancial dos níveis de IgG. Porém, a maioria dos animais deste Grupo, vinte e oito felinos (93,3%), apresentaram valor de absorvância acima do ponto de corte o que demonstra que os felinos assintomáticos da raça Persa também tem eliciado uma importante resposta imune humoral. Assim considerando, permite-se inferir este teste permite não só o discernimento entre animais doentes e sadios, mas, também, a caracterização dos animais considerados portadores assintomáticos.

Ao se cotejar as densidades ópticas dos Grupos sintomáticos e assintomáticos observou-se que não houve diferença estatística (P<0,005). Isto posto, permite-se inferir que ambos os Grupos produziram quantidades semelhantes de IgG anti-*M.canis*. Dessa maneira, confirma-se, também, que na microsporíase felina a resposta imune humoral não é suficiente para debelar a infecção, uma vez que, os felinos sintomáticos apresentaram altos títulos de anticorpos IgG mas, ainda assim, desenvolveram lesões cutâneas decorrentes do dermatófito.

Tal como postulou Dahl (1994), acredita-se que a imunidade humoral seja importante para o controle da infecção, mas não pode ser considerada suficiente para vencê-la por si só. Conclui-se, então, que a presença de efetiva imunidade celular é primordial para a resolução das dermatofitoses. Este fato já havia sido demonstrado por inúmeros estudos. Dentre eles destaca-se aquele de Sparkes, Stokes e Gruffydd-Jones (1995), que infectaram experimentalmente seis felinos com *M. canis*, demonstrando ao final que houve um aumento significativo em três das classes de anticorpos (IgA,IgM e IgG) durante a evidenciada infecção dermatofitica, porém não observou-se uma relação temporal entre a resposta sorológica e a plena recuperação. Demonstraram, também, que houve o estabelecimento da fase de regressão da doença somente quando se observou aumento significante da produção de linfócitos T.

Esses resultados sugerem que o que torna um felino assintomático, provavelmente, é um adequado *"status*" imunológico, sobretudo com eficiente imunidade mediada por células, além da cepa fúngica pouco virulenta e de uma carga fúngica insuficiente para transformar a colonização em infecção. Ainda assim, Carlotti et al. (2010) sugerem que o principal fator facilitador da infecção seja o *déficit* no sistema imune e por conta disso orientam que os animais imunosuprimidos sejam simplesmente eliminados do gatil.

Deve-se, contudo avaliar com bastante cuidado esse "*status*" de portador assintomático. Esses felinos são constantemente expostos ao fungo, fato esse que pode em algum momento transformar a colonização fúngica em verdadeira infecção e assim torná-los sintomáticos. Symoens et al. (1989), demonstraram, em estudo realizado em um gatil com felinos infectados, que existe pelo menos 1000 conidios de *M. canis* por metro cúbico de ar, fato esse que torna o ambiente altamente propicio a contaminação e disseminação, no mínimo aerógena. Além disso, vale

ressaltar que felinos que vivem em grupos possuem hábitos inatos de interação lúdica ou até mesmo conflitos físicos, que podem aumentar a chance de trauma cutâneo e assim do risco de infecção pela perda da contiguidade epidérmica.

Não foi observada correlação entre os níveis de anticorpos e a gravidade da doença. A título de exemplo, o animal de número 12 (Grupo S) que apresentava lesões generalizadas e DO de 0.14, enquanto que o felino de número quatro (Grupo S) possuía escassas lesões e DO de 0.86. Afora isso, quase que a totalidade dos animais assintomáticos apresentou altos títulos de anticorpos. Dessa forma, esse teste sorológico não permitiu correlacionar a gravidade do quadro com resposta imune humoral. Fato esse que já havia sido observado por Pinter et al. (1992) em um estudo semelhante realizado em cães com dermatofitose.

Nos ensaios de WB foram detectadas treze bandas com os seguintes pesos moleculares: 132, 83, 75, 73, 57, 54, 50, 40, 35, 33, 32, 30 e 25, kDa. Tais pesos encontrados estão relativamente de acordo com aqueles evidenciados em estudos prévios, onde Sparkes et al. (1994) realizaram SDS-PAGE e encontraram bandas com pesos entre variavam de 120 a 25 kDa para *Microsporum canis* e Peano et al. (2011) que fizeram WB em cães e encontraram bandas de 180 a 48 kDa para *M. canis*.

A banda com o peso molecular de 30 kDa foi encontrada na totalidade dos felinos ditos positivos, demonstrando padrão imunodominante. Dados bibliográficos sugerem que essa protease possa ser a chamada “Sub3”, uma protease da família das subtilisinas a qual é frequentemente produzida por dermatófitos (TAKIUCHI et al., 1982; BALDO et al., 2008; BĂGUŢ et al., 2012). Porém, também se evidenciou alta reatividade (85,7%) dessa proteína no Grupo considerado negativo. Aventa-se que esse elevado aparecimento seja devido a uma possível reação cruzada, uma vez que esses glicopepetídeos podem não ser espécie-específicos. Alguns autores demonstraram, previamente, a atividade imunogênica dessa protease e concluíram que ela era imunologicamente idêntica às proteases produzidas por fungos ambientais à exemplo do *Aspergillus fumigatus* (SIMPANYA; BAXTER, 1996; BROUTA et al., 2001; GARCIA et al., 2001). Assim, acredita-se que tenha ocorrido uma reação cruzada pelo fato desse fungo ter ampla distribuição e ser comumente isolado no pelame dos felinos (SIERRA et al., 2000).

Houve, também, intensa reatividade com a proteína de peso molecular de 50 kDa tanto no Grupo sintomático (83,3%) quanto no assintomático (66,6%). Enquanto que no Grupo negativo apenas um animal (14,2%), o de número 60, apresentou reatividade à mesma. Postula-se que a referida proteína seja uma metaloprotease, que desempenha um importante papel nos fatores de virulência, ajudando na invasão do estrato córneo, na aderência aos ceratinocitos e na indução de respostas imunes, humoral e celular (BROUTA et al., 2001, 2002; BALDO et al., 2008, 2012). Segundo SPARKES; GRUFFYDD-JONES; STOKES (1996), tais antígenos eliciam forte resposta celular tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Apesar dos mecanismos de patogenicidade de *M. canis* não estarem completamente elucidados, acredita-se que as referidas proteínas desempenhem um importante papel de virulência, pois permitem tanto a invasão de estruturas queratinizadas quanto a própria sobrevivência do fungo. Em estudo dirigido por Viani et al. (2007), observou-se que a produção de queratinases em grupos de felinos sintomáticos era estatisticamente maior que nos grupos assintomáticos, sugerindo que existia uma correlação entre a ocorrência de dermatofitose e a intensidade da produção de queratinases. Porém, Baldo et al. (2008), demonstraram que gatos sintomáticos e assintomáticos secretavam mesma quantidade da protease “Sub3”. Além disso, Mathy et al. (2010), também compararam a transcrição *in vitro* das metaloproteases (MEP1, MEP2 e MEP3) e das dipeptil-peptidases (DPP IV e DPP V), enzimas estas envolvidas na aderência fungica ou invasão, e não observaram diferenças entre os grupos sintomáticos e assintomáticos. Postularam então que o aspecto clínico da enfermidade depende muito mais dos fatores do hospedeiro do que da própria atividade proteolítica das enzimas. Isto posto, ainda existem muitos fatos a aclarar a cerca do papel das proteases na dermatofitose.

A técnica de *Western blot* pode ser considerada mais sensível quando comparada ao ELISA, porém tem como desvantagem o fato de ser uma técnica laboriosa e morosa, além de não permitir a obtenção de resultados quantitativos. Já, o teste imunoenzimático desenvolvido e padronizado neste estudo se apresentou de execução relativamente fácil e de maior sensibilidade quanto cotejado aos exames pela Lâmpada de Wood e pelo próprio micológico direto. Além disso, o referido Teste apresentou altas taxas de sensibilidade e especificidade, quando comparado ao cultivo fúngico. Sendo esse último, ainda, considerado prova padrão e soberana,

face a sua elevada acurácia no diagnóstico. Entretanto, já foi exposto previamente que é um teste que demanda um longo tempo de execução, a contar da coleta do material clínico e até o crescimento do fungo, nos meios de cultura, e a realização de todas as análises necessárias para sua correta identificação (SAENZ, 2001).

Com base nos resultados deste estudo, constatou-se que o ensaio imunoenzimático ELISA se mostrou capaz de diferenciar felinos soropositivos daqueles soronegativos para imunoglobulinas G anti-*M.canis*. Além disso, considera-se que após sua padronização, a execução pode ser considerada relativamente fácil, apresentando como uma das principais vantagens a presteza no diagnóstico, uma vez que esse Teste é realizado em menos de sete horas, período esse considerado bastante curto quando comparado ao tradicional cultivo micológico.

Além disso, ressalta-se como característica profícua do Teste, a possibilidade de diagnóstico em larga escala. Uma única placa de ELISA sensibilizada é capaz de diagnosticar cerca de 44 amostras de uma só vez. Assim, a manipulação de apenas uma placa se torna muito menos dispendiosa e onerosa que a manipulação de 44 placas de cultivo micológico com o intuito de se firmar o diagnóstico de dermatofitose. Permitindo então, o diagnóstico simultâneo de diversos animais em um curto período de tempo.

Dessa maneira, essa técnica seria de grande valia em gatis comerciais que possuem elevado contingente populacional, por permitir um rápido e preciso inquérito epidemiológico. Além disso, essa técnica também apresenta relevância quando aplicada em avaliações pontuais, principalmente na detecção dos felinos assintomáticos. O referido teste possibilita ao clínico veterinário uma rápida ação terapêutica e profilática, o que o torna uma poderosa arma de saúde publica e de profilaxia, principalmente quando se trata de exposição desses animais a crianças, idosos e outros contactantes imunossuprimidos, bem como a outros animais da propriedade.

Contudo, apesar dos ensaios terem se mostrado adequados, devem eles ser interpretados com precaução. Atenta-se para a possibilidade de reatividade cruzada com alguns fungos ambientais o que poderia culminar com uma sorologia falso-positiva. Além disso, relata-se a possibilidade da detecção das imunoglobulinas IgG anti-*M.canis* em decorrência de infecção pretérita já solucionada e por conta disso é imperativo que esse exame seja sempre interpretado em conjunto com uma boa

avaliação clínica e epidemiológica. E por último, deve-se atentar que as infecções dermatofíticas agudas não são identificadas pela mensuração de imunoglobulinas G, e por conta disso deve-se proceder com a sorologia pareada em um intervalo de 15 a 30 dias.

Em face a essas ponderações permite-se inferir que a mensuração dos níveis de IgG anti-*M.canis* é de inequívoca contribuição para o estabelecimento do diagnostico da dermatofitose felina. No entanto, vale ressaltar que as técnicas sorológicas não são excludentes das técnicas ditas convencionais. A metologia diagnóstica desenvolvida e obtida pelo presente estudo não permite que se olvide ou que se exclua da rotina o tão tradicional cultivo micológico. Pretende-se, com essa nova metodologia aplicá-la em determinadas circunstâncias para os fins já discutidos anteriormente. Assim, é axiomático afirmar que o desenvolvimento e padronização dos testes imunoenzimáticos do presente estudo, propiciaram o estabelecimento de novas diretrizes para o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses.

Na capital paulista e muito provavelmento no restante do País, infelizmente, as provas sorológicas destinadas ao diagnóstico de enfermidades fúngicas em animais, não fazem parte da rotina do clínico veterinário, em decorrência do escasso número de laboratórios dispostos para executá-las. No entanto considera-se que são técnicas exequíveis na maioria dos laboratórios de micologia, e que muitas vezes as divergências observadas no desenvolvimento de padronizações, bem como a falta de controle de qualidade dos protocolos diagnósticos, são considerados os elementos chave do insucesso dos métodos moleculares na rotina diagnóstica. Constatou-se ainda que a concentração ótima do antígeno de 0,90 µg/µL permite, teoricamente, a realização de 1.100 testes com a quantidade de proteína extraída a partir de 500 mL de meio de cultura. Assim sendo, apresenta boa aplicabilidade, com elevados percentís de sensibilidade e especificidade. Demonstrando ser uma metodologia bastante promissora e que além de gerar contribuição no âmbito experimental/científico, pode também servir à comunidade dos clínicos veterinários que militam em clínicas e hospitais-veterinários.

É salutar desejar que esses métodos sejam aprimorados em aspectos previamente discutidos para que se obtenham resultados ainda mais satisfatórios. E por último, é desejável que sejam realizados novos estudos prospectivos e com

casuísticas ainda maiores (muito possivelmente estudos multicêntricos) e, em certa medida, generalizáveis a outras populações de felinos com dermatofitose.

8 CONCLUSÕES

Com base na metodologia, ora empregada, e nos resultados obtidos e analisados permite-se, concluir que:

1) as técnicas de ELISA e *WB* são eficazes para o diagnóstico sorológico da dermatofitose causada por *M. canis* em gatos Persas sintomáticos e assintomáticos.

2) a dermatofitose induz evidente resposta imune humoral, que se expressa pela elevacão dos níveis de IgG anti-*M.canis*.

3) o método de ELISA, quando cotejado ao clássico cultivo micológico, apresenta resultados bem satisfatórios e pode ser aplicado para o cabal diagnóstico da dermatofitose.

4) não foi observada diferença estatística entre os Grupos sintomático e assintomático, no que tange a produção de imunoglobulinas anti-*M.canis.*

5) não foi possível correlacionar os resultados obtidos pelo ELISA perante à gravidade do quadro clínico.

6) a técnica de *Western blot* permitiu identificar treze proteínas imunogênicas do *M. canis*. Com pesos moleculares localizados em intervalo de 132 a 25 kDa.

REFERÊNCIAS

ALLEN, H. A. Characterizing zoonotic disease detection in the United States: Who detects zoonotic disease outbreaks & how fast are they detected? characterizing zoonotic disease detection in US. **Journal of Infection and Public Health**, v. 8, p. 194–201, 2015.

ANSORGE, W. Fast and sensitive detection of protein and DNA bands by treatment with potassium permanganate. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 11, p. 13–20, 1985.

BĂGUŢ, E. T.; BALDO, A.; MATHY, A.; CAMBIER, L.; ANTOINE, N.; COZMA, V.; MIGNON, B. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. **Veterinary Microbiology**, v. 160, p. 413–419, 2012.

BALDA, A. C. **Estudo retrospectivo de casuística, comparativo de metodologia diagnóstica e de avaliação de eficácia da griseofulvina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e gatos**. 2001.173f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BALDA, A. C.; LARSSON, C. E.; OTSUKA, M.; GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 133–140, 2004.

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**, v. 55, p. 218–223, 2012.

BALDO, A.; TABART, J.; VERMOUT, S.; MATHY, A.; COLLARD, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted subtilisins of *Microsporum canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 2008, p. 1152–1156, 2008.

BATISTA JÚNIOR, J. A.; NICO, F. Incidência do *Microsporum canis* em cães de Belo Horizonte. **Arquivos da Escola de Veterinária**, v. 19, p. 89–93, 1967.

BOYANOWSKI, K. J.; IHRKE, P. J.; MORIELLO, K. A.; KASS, P. H. Isolation of fungal flora from the hair coats of shelter cats in the Pacific coastal USA. **Veterinary Dermatology,** v. 11, n. 2, p. 143-150, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRILHANTE, R. S. N.; CAVALCANTE, C. S. P.; SOARES-JÚNIOR, F. A.; MONTEIRO, A. J.; BRITO, E. H. S.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, n. 6, p. 499–504, 2004.

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; FETT, T.; LOSSON, B.; GERDAY, C.; MIGNON, B. Purification and characterization of a 43 center dot 5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis.* **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 269–275, 2001.

BROUTA, F.; DESCAMPS, F.; MONOD, M.; VERMOUT, S.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 10, p. 576–583, 2002.

CABAÑES, F. J. Dermatofitosis animales. Recientes avances. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, n. 01, p. 8–12, 2000.

CABAÑES, F. J. Micosis y zoonosis: *Cryptococcus spp*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, n. 2, p. S1-S3, 2008.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis**. Veterinary Dermatology**, v.17, p. 327-331, 2006.

CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; SASANELLI, M.; LIA, R.; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. **Mycoses**, v. 47, n. 11, p. 508–513, 2004.

CARLOTTI, D. N.; GUINOT, P.; MEISSONNIER, E.; GERMAIN, P. A. Eradication of feline dermatophytosis in a shelter: a field study. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 259–266, 2010.

CUTSEM, J. V.; ROCHETTE, F. **Mycoses in domestic animals**. Bélgium: Janssen Research Fundation, 1991. 226 p.

DABRITZ, H.A.; CONRAD, P. A. Cats and *Toxoplasma* : implications for public pealth. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 1, p. 34–52, 2010.

DAHL, M. V. Dermatophytosis and the immune response. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 31, n. 3, p. S34–S41,1994.

DEBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Humoral and cell ular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, n. 2, p. 121–131, 1993.

DEBOER, D. J.; MORIELLO, K. A. Development of an experimental model of *Microsporum canis* infection in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 289–295, 1994.

DUBUGRAS, M. T. B.; LARSSON, C. E.; LEDON, A. P.; GAMBALE, W. Dermatofitoses e leveduroses de cães e gatos. Aspectos diagnósticos. **Brazilian Journalof Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 2, p. 273–287, 1992.

FARIAS, M. De; CONDAS, L. A.; RAMALHO, F.; BIER, D.; MURO, D.; PIMPÃO, C. Avaliação do estado de carreador assintomático de fungos dermatofíticos em felinos (*Felis catus*) destinados à doação em centros de controle de zoonoses e sociedade protetoras de animais. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 2, p. 306–312, 2011.

FOIL, C. S. Dermatophytosis. In: GREENE, C. E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat.** 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 362-370, 1998

FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; PENNISI, M. G.; ADDIE, D.; BELÁK, S.; BOUCRAUT-BARALON, C.; EGBERINK, H.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; LUTZ, H.; MARSILIO, F.; MÖSTL, K.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Dermatophytosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 598–604, 2013.

GARCIA, M. E.; CABALLERO, J.; CRUZADO, M.; ANDRINO, M.; GONZALEZ-CABO, J. F.; BLANCO, J. L. The value of the determination of anti-*Aspergillus* IgG in the serodiagnosis of canine aspergillosis: comparison with galactomannan detection. **Journal of Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 48, n. 10, p. 743–750, 2001.

GÜRTLER, T. G. R.; DINIZ, L. M.; NICCHIO, L. Microepidemia de tinha do couro cabeludo por *Microsporum canis* em creche de Vitória - Espírito Santo (Brasil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 3, p. 267–272, 2005.

HAMES, B. D.; RICKWOOD, D. **Gel electrophoresis of proteins. a practical approach**. 2. ed. New York: Oxford University Press,1990. p. 17.

HAY, R. J.; GL, M.; R, G. D.; BENNETT JE. Dermatoficias y outras micosis superficiales. In: **Enfermedad Infecciosas: principios y prática**. Buenos Aires: Panamericana, 1991. p. 337–349.

HUBE, B.; HAY, R.; BRASCH, J.; VERALDI, S.; SCHALLER, M. Dermatomycoses and inflammation: The adaptive balance between growth, damage, and survival. **Journal of Medical Mycology**, v. 25, n. 1, p. 44–58, 2015.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970.

LARSSON, C. E. Dermatopatias de cães e gatos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 261-270, 1995 .

LARSSON, C. E.; LUCAS, R.; LEAL, P. M.; GERMANO. Dermatofitoses de cães e gatos em São Paulo: estudo da possível influência sazonal. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**, v. 72, n. 2, p. 139–142, 1997.

LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. São Paulo: Editora Interbook, 2015. 888 p.

LONDERO, A. T. Estudo das tinhas em Santa Catarina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 5, n. 5, p. 118 – 119, 1963.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360 p.

MANCIANTI, F.; GIANNELLI, C.; BENDINELLI, M.; POLI, a. Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cat. **Journal of Medical Veterinary Mycology**, v. 30, n. 3, p. 259–267, 1992.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHI, S.; CORAZZA, M.; TACCINI, F. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. **Mycopathologia**, v. 156, n. 1, p. 8–13, 2002.

MARIAT, F.; ADAM-CAMPOS, C. La technique du carré de tapis, méthode simple de prélèvement dans les mycoses superficielles. **Mycopathologia**, v. 113, n. 2, p. 666–669, 1967.

MATHY, A.; BALDO, A.; SCHOOFS, L.; CAMBIER, L.; DEFAWEUX, V.; TABART, J.; MARÉCHAL, F.; SYMOENS, F.; MIGNON, B. Fungalysin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Veterinary Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 179–182, 2010.

MERCHANT, S. R. Zoonotic diseases with cutaneous manifestations. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, v. 12, p. 371–378, 1990.

MIGNON, B. R.; COIGNOUL, F.; LECLIPTFUX, T.; FOCANT, C.; LOSSON, B. J. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. **Medical Mycology**, v. 37, n. 1, p. 1–9, 1999a.

MIGNON, B. R.; LECLIPTEUX, T.; FOCANT, C.; NIKKELS, A. J.; PIÉRARD, G. E.; LOSSON, B. J. Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in experimentally infected guinea pigs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 2, p. 123–129, 1999b.

MILLER JR., W. .; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. . **Muller & Kirk's small animal dermatology**. 7. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2013.

MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J.; VOLK, L. M.; SPARKES, A.; ROBINSON, A. Development of an in vitro, isolated, infected spore testing model for disinfectant testing of *Microsporum canis* isolates. **Veterinary dermatology**, v. 15, n. 3, p. 175–180, 2004.

MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J. Fungal flora of the coat of pet cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 4, p. 602–606, 1991.

MORIELLO, K. A.; COYNER, K.; TRIMMER, A.; NEWBURY, S.; KUNDER, D. Treatment of shelter cats with oral terbinafine and concurrent lime sulphur rinses. **Veterinary dermatology**, v. 24, n. 6, p. 618–620, 2013.

MURPHY, F. A. Emerging zoonoses: The challenge for public health and biodefense. **Preventive Veterinary Medicine**, v.4, n.3, p. 429-435, 2008.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; SANNA, V.; PERRUCCI, S.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine Malassezia dermatitis. **Journal de Mycologie Medicale**, p. 1–7, 2014.

NEWBURY, S.; MORIELLO, K. A. Feline dermatophytosis: Steps for investigation of a suspected shelter outbreak. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 5, p. 407–418, 2014.

NITTA, C. Y.; LARSSON, C. E. Caracterização do estado de portador assintomático de dermatófitos em felinos da raça Persa criados em domicílios ou em criatórios particulares na cidade de São Paulo, v. 2, n. 14, p. 128, 2015. Trabalho apresentado a 1. Congresso Brasileiro de Dermatologia Veterinária da SBDV, Campos do Jordão, 2015. Resumo n. 15.

PEANO, A.; MIN, A. M.; BECCATI, M.; MENZANO, A.; PASQUETTI, M.; GALLO, M. G. Use of western blot to study *Microsporum canis* antigenic proteins in canine dermatophytosis. **Mycoses**, v. 54, n. 3, p. 223–232, 2011.

PEANO, A.; RAMBOZZI, L.; GALLO, M. G. Development of an enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for the serodiagnosis of canine dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. **Veterinary Dermatology**, v. 16, n. 2, p. 102–107, 2005.

PERUSKI, A. H.; PERUSKI, L. F. Immunological methods for detection and identification of infectious disease and biological warfare agents. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 4, p. 506–513, 2003.

PINHEIRO, A. D. Q.; MOREIRA, J.L.; SIDRIM,J.J. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 30, n. 4, p. 287–294, 1997.

PINTER, L.; NOBLE, W. C.; ELLIS, J.; CICLITIRA, P. J. The value of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the sero-diagnosis of canine dermatophytosis due to *Microsporum canis*. **Veterinary dermatology**, v. 3, n. 2, p. 65–70, 1992.

REBELL, G.; TAPLIN, D. **Dermatophytes, their recognition and identification**. 2. ed. Coral Glabes: University of Miami Press,1970. 30 p.

REICHMANN, M. L. A. B. **Orientação para projetos de Centro de Controle de Zoonoses.** São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. 14 p.

RIBEIRO, E. A. **Frequência de fungos dermatófitos em gatos (felis catus) infectados e não infectados pelo vírus da frequência de fungos dermatófitos em gatos (felis catus) infectados e não infectados.** 2005.79f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Clínica Veterinária) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) campus Botucatu, Botucatu, 2005.

ROBERTSON, I. D. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 12–13, 2000.

RUIZ, L. R. B.; ZAITZ, C. Dermatophytes and dermatophytosis in the city of São Paulo from August 1996 to July 1998. **Anais brasileiros de dermatologia,** v. 76, n. 7, p. 391–401, 2001.

SAENZ, F. J. Identificación de hongos dermatofitos. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 1, n. 11, p. 201, 2001.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Muller & Kirk's small animal dermatology**. 6. ed., Miami: Elsevier, 2001. 979 p.

SEEBACHER, C.; BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. **Mycopathologia**, v. 166, n. 6, p. 335–352, 2008.

SIDRIM, J.; ROCHA, M. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. 3 ed., Rio de Janeiro: Guanaba Koogan, 2004.

SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSIÉRAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 158–61, 2000.

SIMPANYA, M. F.; BAXTER, M. Isolation of fungi from the pelage of cats and dogs using the hairbrush technique. **Mycopathologia**, v. 134, n. 3, p. 129–33, 1996.

SPARKES, a H.; GRUFFYDD-JONES, T. J.; STOKES, C. R. Acquired immunity in experimental feline *Microsporum canis* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 61, n. 2, p. 165–8, 1996.

SPARKES, a H.; STOKES, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J. SDS-PAGE separation of dermatophyte antigens, and western immunoblotting in feline dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 128, n. 2, p. 91–8, 1994.

SPARKES, A.; GRUFFYDD-JONES, T.; SHAW, S.; WRIGHT, A.; STOKES, C. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. **The Veterinary Record**, v. 133, n. 3, p. 57–61, 1993.

SPARKES, A. H.; STOKES, C. R.; GRUFFYDD-JONES, T. J. Experimental *Microsporum canis* infection in cats : correlation between immunological and clinical observations. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, n. January, p. 177–184, 1995.

SYMOENS, F.; FAUVEL, E.; NOLARD, N. Evolution de la contamination de l'air et des surfaces par *Microsporum canis* dans une habitation. **Bulletin Française Micologie Medicale**, v. 18, n. 2, p. 293–298, 1989.

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

VERMOUT, S.; TABART, J.; BALDO, A.; MATHY, A.; LOSSON, B.; MIGNON, B. Pathogenesis of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 267–75, 2008.

VIANI, F. C.; CAZARES VIANI, P. R.; GUTIERREZ RIVERA, I. N.; GONÇALVES DA SILVA, E.; RODRIGUES PAULA, C.; GAMBALE, W. Extracellular proteolytic activity and molecular analysis of *Microsporum canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 19–23, 2007.

VIANI, F. C.; DOS SANTOS, J. I.; PAULA, C. R.; LARSON, C. E.; GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporum canis* and their role in its virulence. **Medical Mycology**, v. 39, n. 5, p. 463–468, 2001.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 240, 1995.

YAMAMURA, A. A. M.; PEREIRA, E. P.; SHIMADA, M. K.; FUGIWARA, C. Y.; DANHONE, A. S.; CHAMI, D. Ocorrência de dermatofitose em cães e gatos atendidos pelo hospital veterinário da Universidade Estadual de Londrina-Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 18, n. 1, p. 41–44, 1997.