

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO**

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE GATOS (*Felis  
catus*) IMUNIZADOS COM A VACINA BIOCAN M®**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
FEVEREIRO – 2010**

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE GATOS (*Felis catus*) IMUNIZADOS COM A VACINA BIOCAN M®**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na Área de concentração de Sanidade animal.**

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Baptista de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Olney Vieira da Motta

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Fevereiro – 2010

**MARCELLA BRAGA DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE GATOS (*Felis catus*) IMUNIZADOS COM A VACINA BIOCAN M®**

**Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, na Área de concentração de Sanidade animal.**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lio Moreira (Doutora, Ciência Animal) – UFES

---

Prof. Dr. Milton Masahiko Kanashiro (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof. Dr. Olney Vieira da Motta (Doutor, Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof. Dr. Cláudio Baptista de Carvalho (Doutor, Medicina Veterinária) - UENF

Orientador

Aos,

Meus pais, Tânia Maria Braga da Silva e José Luis da Silva, que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos, para que, muitas vezes, eu pudesse realizar os meus. Pela longa espera e compreensão durante minhas longas viagens. Obrigada mãe e pai, mais uma vitória NOSSA!

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que desde o início de minha caminhada, esteves comigo;

Aos meus pais, Tânia Maria Braga da Silva e José Luis da Silva, pela paciência e motivação. Por tudo aquilo que fizeram e fazem por mim. Obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da palavra FAMÍLIA...Sem vocês eu nada seria!

Ao meu irmão Marcus Vinícius Braga da Silva e minha cunhada Mônica Rodrigues Santos Braga da Silva, por todos os conselhos e ajuda. Quisera eu encontrar palavras para expressar todo o amor que sinto por vocês;

À minha madrinha, por ser minha segunda mãe. Pelas mensagens amorosas, ligações e orações, mesmo que no final de cada telefonema caísse no choro!

A toda a família, avó, tios, primos e afilhados, pelo gesto de carinho e pela compreensão nos momentos em que estive ausente. Que este sentimento que nos une, perdure por toda a vida;

Ao meu orientador Cláudio Baptista de Carvalho, com sua paciência, dedicação e sabedoria. Incentivando-me, compartilhando e se dedicando;

Ao meu co-orientador Olney Vieira da Motta, pela ajuda na hora em que mais precisei. Obrigada por me acolher;

Ao professor Milton Masahiko Kanashiro por todas as sugestões e correções feitas neste trabalho;

Ao professor Cláudio Andrés Retamal Martinez, pela paciência e boa vontade em uma das etapas deste trabalho;

À doutoranda Luize Neli Nunes Garcia pela ajuda incansável para que este trabalho fosse finalizado. Por ter me recebido com tanto carinho. Obrigada, mil vezes obrigada!

Ao enfermeiro do Hospital veterinário José Evaldo Machado, sempre disposto a me ajudar na coleta de material;

A toda equipe do Laboratório de Micologia da UENF, em especial às técnicas Gina Nunes Teixeira e Maria de Lourdes Amaral, e a mestranda Luciana Mathias, por terem me auxiliado nos exames;

A Solange Silva Samarão, por toda ajuda na análise estatística;

À Méd. Vet. Maria Angélica Viestel, pela amizade de sempre e apoio;

A todos os professores, que dedicaram seu tempo e compartilharam experiência, para que minha formação fosse também um aprendizado de vida;

Aos funcionários do Hospital Veterinário, pela ajuda e convivência;

A toda equipe do Setor de Dermatologia Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em especial à professora Regina Helena Ruckert Ramadinha pela ajuda e colaboração para que este trabalho se tornasse real;

Às amigas Ana Carolina Leal, Carla Moreira Salavessa e Lara Lages da Silveira, pelo gesto de carinho e amizade. Por todas as risadas, que transformavam a nossa ida para Campos um momento de alegria e descontração. Obrigada por terem sido uma família aqui em Campos para mim;

À amiga Paula Moreira Borges, que mesmo de longe, se fez presente nesta etapa. Obrigada pelas palavras incentivadoras. Nossa, que falta você faz aqui amiga!

Aos pós-graduandos Daniela Vale, Giseli dos Santos, Mônica Luz e Renato Moran pela ajuda técnica;

À Dona Estela de Almeida, por toda dedicação e oração. Não tenho palavras para retribuir o seu carinho. Obrigada por todos os “presentinhos” e “lanchinhos”... Você tem um lugar muito especial em meu coração;

A Sônia Almeida, por ter deixado seus gatinhos participarem deste trabalho. Obrigada por tudo!

Aos animais. Todos eles. Mas em especial aos cães Paty (*in memorian*), Pierre e Clarinha. A cada bagunça feita em minha chegada à cidade do Rio de Janeiro. Sou eternamente grata por todos os latidos e lambidas, vocês fizeram com que qualquer tristeza que porventura ocorresse fosse rapidamente esquecida;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, por ter me proporcionado condições para a finalização de todo este percurso;

A FAPERJ pela bolsa durante todo o curso e pelo apoio financeiro ao trabalho;

E a todos aqueles que de alguma forma colaboraram e apoiaram para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

**SILVA, Marcella Braga. Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE HUMORAL DE GATOS (*Felis catus*) IMUNIZADOS COM A VACINA BIOCAN M®. Professor orientador: Cláudio Baptista de Carvalho e Co-orientador: Olney Vieira da Motta.**

A dermatofitose é uma doença zoonótica relativamente comum em diversos países, ocorrendo de forma endêmica em animais de companhia e de produção. Os fungos pertencentes aos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* são os mais comuns, sendo o *Microsporum canis* a espécie que mais acomete os gatos. Na maioria das vezes, a doença é transmitida ao homem por dirigir contato com o animal de companhia infectado ou via “fômites” do animal. Portanto, a realização de uma pesquisa com a finalidade de contribuir para o esclarecimento e funcionalidade da profilaxia da dermatofitose, a fim de se evitar a disseminação de tal enfermidade entre animais e o homem, se faz muito importante. Este trabalho descreve a avaliação de eficácia imunológica da vacina Biocan M® em gatos domésticos (*Felis catus*) e teve como principal objetivo a titulação de anticorpos IgG anti-dermatófitos mensurados pelo método imunoenzimático – ELISA. Os resultados foram divididos em três etapas: Fase pré-imune, onde os animais se mostraram bem diferentes quando comparados com o controle positivo (C+) e não houve diferença quando comparados com o controle negativo (C-), explicando assim a titulação baixa dos animais nesta fase. Na fase pós-imune 1ª dose, os animais se comportaram de maneira semelhante quando comparados ao controle positivo (C+), evidenciando o aumento na titulação de anticorpos após receberem a vacina e significativo quando comparados ao controle negativo (C-). Já na fase pós-imune 2ª dose, os animais se comportaram também de maneira semelhante ao controle positivo (C+) e diferentes quando comparados com o controle negativo (C-). Apesar da indução do aumento dos títulos de anticorpos, não se pode afirmar que os gatos vacinados estavam protegidos da doença, visto que os animais não foram desafiados com cepas de *Microsporum canis* ou gatos com a dermatofitose ativa. É importante a continuação dos estudos desta vacina, principalmente utilizando o desafio experimental após a imunização dos animais, visto que aumento na titulação de anticorpos, não confere a proteção ao animal.

**Palavras-chave:** Dermatofitose, vacinação, *Microsporum canis*, vacina Biocan M®, gatos.

## ABSTRACT

**SILVA, Marcella Braga. Universidade Estadual do Norte Fluminense - Darci Ribeiro. February 2010. EVALUATION OF THE HUMORAL IMMUNE RESPONSE OF CATS (*Felis catus*) IMMUNIZED WITH BIOCAN M®. Advisers: Claudio Baptista de Carvalho and Olney Vieira da Motta.**

Dermatophytosis is a zoonotic disease relatively common in several countries, being endemic in pets and production animals. Fungi belonging to the genera *Trichophyton* and *Microsporum* are the most common, and *Microsporum canis* the kind that affects cats. In most cases, the disease is transmitted to humans by direct contact with infected pet or via fomites of the animal. Therefore, conducting a survey in order to contribute to the clarification feature and prophylaxis of dermatophytosis, in order to prevent the spread of this disease between animals and man becomes very important. This paper describes the evaluation of effectiveness of the vaccine immune Biocan M ® in domestic cats (*Felis catus*) and had the main purpose of the IgG antibodies anti-dermatophytes measured by enzyme immunoassay method - ELISA. The results were divided into three stages: Pre-immune, where the animals were quite different when compared with the positive control (C +) and no difference compared with negative control (C-), thus explaining the low titre of animals in this phase. In the post-immune 1st dose, the animals behaved similarly when compared to positive control (C +), showing an increase in antibody titers after receiving the vaccine and significant when compared with negative control (C-). Already in the post-immune 2nd dose, the animals also behaved similarly to positive control (C +) and different when compared with the negative control (C-). Despite the induction of higher titers, can not be said that the vaccinated cats were protected from disease, because animals were not challenged with strains of *Microsporum canis* or cats with dermatophytosis active. It is important the continuation of the study of this vaccine, especially using experimental challenge after immunization of animals, as increased antibody titration, it provides protection to the animal.

**Key-words:** Dermatophytosis, vaccination, *Microsporum canis*, vaccine Biocan M ®, cats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Exame micológico direto. Pêlo endotrix infectado por hifas de fungo dermatófito.....	27
<b>Figura 2.</b> Exame micológico direto. Pêlo ectotrix infectado por hifas de fungo dermatófito.....	27
<b>Figura 3.</b> Micromorfologia da colônia de <i>M. canis</i> .....	29
<b>Figura 4.</b> Micromorfologia de <i>T. mentagrophytes</i> .....	30
<b>Figura 5.</b> Micromorfologia de <i>M. gypseum</i> .....	30
<b>Figura 6.</b> Coleta de sangue do animal através da veia jugular.....	38
<b>Figura 7.</b> Extração de proteína de colônia de <i>Microsporum canis</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> Padrão eletroforético das proteínas extraídas de <i>Microsporum canis</i> por PBS.....	42
<b>Figura 9.</b> Placas de Elisa da titulação entre o controle positivo (C+), controle negativo (C-) e a fase pré-imune.....	43
<b>Figura 10.</b> Placas de Elisa da titulação entre o controle positivo (C+), controle negativo (C-) e a fase pós-imune 1ª dose.....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1.</b> Apresentação da titulação dos soros de animais da fase pré-imune.....	44
<b>Gráfico 2.</b> Apresentação da titulação dos soros de animais da fase pós-imune 1ª dose.....	45
<b>Gráfico 3.</b> Apresentação da titulação dos soros de animais da fase pós-imune 2ª dose.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>M. canis</i></b>	<i>Microsporium canis</i>
<b><i>M. gypseum</i></b>	<i>Microsporium gypseum</i>
<b><i>T. mentagrophytes</i></b>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>KOH</b>	Hidróxido de Potássio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	Hidróxido de Cálcio
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>ELISA</b>	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ensaio imunoenzimático)
<b>DTH</b>	Hipersensibilidade do tipo tardia
<b>SDS</b>	lauril sulfato de sódio
<b>SDS-PAGE</b>	eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS
<b>OPD</b>	<i>o-Phenylenediamine</i> (o-Fenilenodiamina)
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>15</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>4. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1. Classificação dos fungos.....</b>	<b>17</b>
<b>4.2. Etiologia.....</b>	<b>19</b>
4.2.1. <i>Microsporum canis</i> .....	19
4.2.2. <i>Microsporum gypseum</i> .....	20
4.2.3. <i>Trichophyton mentagrophytes</i> .....	20
<b>4.3. Patogenia.....</b>	<b>21</b>
<b>4.4. Sinais Clínicos.....</b>	<b>22</b>
4.4.1. Lesão clássica (“ringworm”).....	22
4.4.2. Hipotricose.....	23
4.4.3. Foliculite e Furunculose dermatofítica.....	23
4.4.4. Quérion dermatofítico.....	23
4.4.5. Onicomicose e/ou Paroníquia.....	24
4.4.6. Pseudomicetoma dermatofítico.....	24
<b>4.5. Diagnóstico.....</b>	<b>24</b>
4.5.1. Histórico.....	25
4.5.2. Exame da Lâmpada de Wood.....	25
4.5.3. Exame Micológico Direto.....	26
4.5.4. Cultura Micológica.....	28
<b>4.6. Imunologia da Dermatofitose.....</b>	<b>31</b>
4.6.1. Resposta Imune Inata.....	31
4.6.2. Resposta Imune Adaptativa.....	32
4.6.2.1. Imunidade Humoral.....	32
4.6.2.2. Resposta Imune mediada por células.....	32
<b>4.7. Vacinação contra a Dermatofitose.....</b>	<b>33</b>
4.7.1. Vacinação contra dermatófitos em bovinos.....	33
4.7.2. Vacinação contra dermatofitose em animais de companhia.....	34
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1. Animais e local.....</b>	<b>36</b>

<b>5.2. FASE PRÉ-IMUNE.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.1. História Clínica.....</b>	<b>36</b>
<b>5.2.2. Cultura Micológica.....</b>	<b>37</b>
<b>5.2.3. Sorologia dos Animais.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3. Vacinação dos Animais.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4. FASE PÓS-IMUNE.....</b>	<b>38</b>
<b>5.4.1. Primeira Dose Vacinal (Dia 0).....</b>	<b>38</b>
<b>5.4.2. Coleta de Soro (Dia 14).....</b>	<b>38</b>
<b>5.4.3. Segunda Dose Vacinal (Dia 14).....</b>	<b>38</b>
<b>5.4.4. Coleta de Soro (Dia 30).....</b>	<b>39</b>
<b>5.5. Produção do antígeno.....</b>	<b>39</b>
<b>5.5.1. SDS-PAGE.....</b>	<b>40</b>
<b>5.6. Anticorpo secundário.....</b>	<b>41</b>
<b>5.7. Ensaio Imunoenzimático – ELISA.....</b>	<b>41</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>6.1. Produção do antígeno.....</b>	<b>42</b>
<b>6.2. Testes Imunológicos.....</b>	<b>43</b>
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>49</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a população de animais de companhia, na maioria dos países vem crescendo muito. Como o convívio entre os animais de estimação e proprietários não possui regras, sendo o primeiro considerado como membro da família, e o conhecimento e esclarecimento das zoonoses são imprescindíveis para manutenção adequada da sanidade.

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a população de cães e gatos no Brasil gira em torno de 20 e 10 milhões respectivamente, sendo que este número cresce a cada ano. Este dado é de extrema importância em saúde pública. Dentre as mais de 100 mil espécies fúngicas, cerca de 100 são capazes de causar infecções em humanos e nos animais (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As micoses representam um problema crescente na medicina humana (LACAZ *et al*, 2002) e, são cada vez mais frequentes os relatos em Medicina Veterinária. No entanto, as infecções fúngicas ainda são confundidas com outras enfermidades que cursam com sinais clínicos semelhantes. Dentre as principais micoses diagnosticadas em pequenos animais destacam-se a Malasseziose, Candidíase, Criptococose, Aspergilose, Esporotricose e Dermatofitose, estas duas últimas consideradas importantes zoonoses (SCOTT *et al*, 1996).

Os fungos são microrganismos que estão distribuídos na natureza em todos os habitats (como o ar, o solo e a água), além da microbiota existente em humanos e animais (TRABULSI *et al*, 1999). As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos, capazes de colonizar e causar lesões no extrato córneo de animais e do homem. Esses fungos podem ser classificados em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos de acordo com a sua evolução adaptativa (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Quando o dermatófito entra em contato com a pele, uma série de eventos pode acontecer: 1) o fungo pode ser retirado mecanicamente; 2) pode não ter habilidade para estabelecer residência pela competição com a flora normal; 3) pode estabelecer residência na pele, mas não produzir lesões (estado de carreador assintomático); e 4) pode estabelecer residência e causar a doença.

A apresentação clínica da dermatofitose é muito variada, mas a lesão clássica descrita na literatura é caracterizada por alopecia circular, irregular ou difusa e de expansão centrífuga. As lesões acometem mais comumente a face, as orelhas, as patas e a cauda,

podem evoluir para uma cura espontânea ou para lesão generalizada crônica que afeta todo o corpo do animal. Em geral, o prurido é mínimo ou ausente (MACIEL; VIANA, 2005).

Os dermatófitos ocorrem com relativa frequência na clínica de pequenos animais, e a dermatofitose é a enfermidade mais comum causada por fungos em cães e gatos no hemisfério ocidental (ROCHETE *et al*, 2003).

O *Microsporum canis* (*M. canis*) é o principal agente da dermatofitose e o de maior prevalência em cães e gatos. Esse dermatófito é responsável por aproximadamente 90-98% das infecções dermatofíticas em gatos e 50-70% das infecções em cães (MACIEL; VIANA, 2005).

Com isso, as formas de diagnóstico, tratamento e profilaxia do *M. canis* vêm sendo cada vez mais estudadas, tendo em vista a necessidade de caracterizar a biodiversidade fúngica da região Norte Fluminense frente às novas ferramentas que auxiliam no desenvolvimento destas técnicas.

A vacina Biocan M® vem sendo comercializada pelo laboratório Tecnopec, como a solução definitiva contra a dermatofitose em cães e gatos. Entretanto, esta vacina ainda não é relacionada pela literatura como uma forma definitiva e segura de profilaxia, sendo necessário um estudo para a sua utilização.

Baseado no exposto torna-se evidente o importante papel de estudos que visem à avaliação da resposta imune humoral de gatos (*Felis catus*) imunizados com a vacina Biocan M®, através da titulação de anticorpos IgG por Elisa, seguindo o protocolo de vacinação do fabricante.

## 2. JUSTIFICATIVA

Os problemas dermatológicos em cães e gatos são reconhecidos como um dos principais motivos de visitas às clínicas veterinárias. Acredita-se que, hoje, entre 20% e 75% dos atendimentos veterinários realizados em clínicas e hospitais estejam relacionados com problemas dermatológicos (SCOTT *et al*, 1996). Isso se deve principalmente ao fato de que alterações de pele chamam a atenção dos proprietários e causam repulsas, fazendo com que se procure auxílio veterinário (CONCEIÇÃO *et al*, 2005).

As dermatofitoses são um exemplo de enfermidade infecciosa com elevada prevalência na América Latina. No que tange à saúde humana, os relatos fragmentados e dados epidemiológicos indicam que estas micoses estão entre as zoonoses mais comuns do mundo (MURRAY *et al*, 2004).

Justifica-se, portanto, a realização de pesquisa com a finalidade de contribuir para o esclarecimento e funcionalidade da profilaxia da dermatofitose, a fim de se evitar a disseminação de tal enfermidade entre animais e o homem, haja vista que se trata de uma antropozoonose.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Gerais

Avaliação da resposta imune humoral em gatos (*Felis catus*) vacinados com a vacina Biocan M® anti-dermatófitos.

#### 3.2. Específicos

Padronização do ensaio imunoenzimático – ELISA para titulação de anticorpos para *M. canis*.

Titulação de IgG por ensaio imunoenzimático – ELISA nas 3 fases:

- Pré-imune
- Pós-imune (1ª dose)
- Pós-imune (2ª dose)

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Classificação dos fungos

O reino dos fungos (Fungi) é reconhecido como um dos cinco reinos dos seres vivos. Os outros quatro reinos são *Monera* (bactérias e algas azul-esverdeadas), *Protista* (protozoários), *Plantae* (plantas) e *Animalia* (animais). Os fungos são microrganismos aclorofílicos e eucarióticos que podem crescer na forma de levedura, bolor ou em ambas as formas, simultaneamente (RAVEN *et al*, 2001).

Os cães albergam muitos bolores e leveduras em suas pelagens e pele. A maioria isolada destes saprófitas provavelmente representa contaminação transitória por fungos do ar ou do solo (SCOTT *et al*, 2001).

Os fungos são onipresentes no ambiente. Dos milhares de diferentes espécies de fungos, apenas alguns têm a capacidade de provocar doença nos animais. Os fungos, em sua grande maioria, são ou microrganismos do solo ou patógenos vegetais. Uma micose é uma doença causada por um fungo. Uma dermatofitose é uma infecção dos tecidos ceratinizados, unha, pêlo e estrato córneo, causada pelos gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* ou *Epidermophyton* (SCOTT *et al*, 1996). Entretanto, os gêneros que freqüentemente infectam animais são o *Microsporium* e o *Trichophyton*, enquanto o *Epidermophyton* determina afecções principalmente em humanos (CARLOTTI; PIN, 2002).

A maioria das espécies fúngicas apresenta-se na natureza na forma filamentosa. As hifas são estruturas tubulares ramificadas e pluricelulares. Apesar de freqüentemente apresentarem na sua constituição os septos, estes podem não ser vistos como estruturas de separação entre as células, uma vez que apresentam um grande número de poros que permitem a passagem de estruturas celulares de uma célula para outra (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As infecções causadas por fungos parecem ser acidentais, ou seja, sua grande maioria não é contagiosa, mas, adquirida por exposição do indivíduo a uma fonte natural de ocorrência do fungo. Existem na natureza mais de 250 mil espécies fúngicas conhecidas atualmente. Dentre estas, apenas aproximadamente trezentas foram identificadas, pelo menos uma vez, em processo patológico em seres humanos ou animais (LOPES *et al*, 2004).

As micoses podem ser classificadas clinicamente em sistêmicas, subcutâneas e superficiais, de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o sítio de instalação do agente infeccioso no hospedeiro (TORTORA *et al*, 2000).

As micoses superficiais podem ser classificadas em micoses superficiais estritas e dermatofitoses. As micoses superficiais estritas possuem a característica de acometerem a camada mais superficial do estrato córneo de humanos e animais, não induzindo nenhuma resposta inflamatória no hospedeiro (SIDRIM; ROCHA, 2004).

As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos denominados de dermatófitos. Esses seres pertencem ao grupo dos fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos, capazes de colonizar e causar lesões no estrato córneo do homem e animais. As dermatofitoses são caracterizadas por lesões circulares discretas, com áreas de alopecia, bordos eritematosos e vesiculares, que circunscrevem uma parte central descamativa. Por serem ricas em queratina, as regiões da pele, pêlos e unhas são freqüentemente acometidas por dermatófitos (MENDLEAU; HNILICA, 2003; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Os dermatófitos podem ser classificados do ponto de vista ecológico, de acordo com seu habitat natural, em geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (SCOTT *et al*, 1996; MACIEL; VIANA, 2005). Os geofílicos (*Microsporum gypseum*, *Microsporum cookei* e *Trichophyton terrestre*) habitam o solo rico em matéria orgânica, onde vivem como saprófitas e infectam tanto humanos quanto animais (SPIEWAK; SZOSTAK, 2000; GALLO *et a*, 2005). Os zoofílicos (*Microsporum canis*, *Microsporum distortum*, *Microsporum persicolor* e *Trichophyton mentagrophytes*) são adaptados à pele e aos pêlos dos cães e infectam tanto animais quanto humanos. Os antropofílicos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum audouinii*, *Trichophyton megninii*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton tonsurans*) são adaptados à pele e aos anexos dos seres humanos, não sobrevivem no solo, infectam os humanos e raramente os animais. O conhecimento do habitat natural do fungo pode auxiliar o diagnóstico e o tratamento (MACIEL; VIANA, 2005).

## 4.2. Etiologia

Durante o período de novembro de 2000 a dezembro de 2001, foram examinados 189 cães e 38 gatos com sintomatologia sugestiva de dermatofitose, e coletados material para exame de cultura micológica pelo Centro especializado em Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará. Os dermatófitos foram isolados de 27 dos 189 cães (14,3%) e 14 dos 38 gatos (36,8%), sendo o *M. canis* a espécie mais comumente isolada, 92,6% em cães e 100% em gatos (BRILHANTE *et al*, 2003).

Vários estudos citam que a frequência de isolamento de dermatófitos é cerca de 20% mais elevada em gatos que em cães (CABAÑES *et al*, 1997; BERNARDO *et al*, 2005; COELHO *et al*, 2008).

Diversos autores (CERUNDOLO, 2004; KHOSRAVI; MAHMOUND, 2004; MORIELLO, 2006) relataram que *M. canis*, seguidos de *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* foram as espécies de fungos mais comumente isoladas de gatos com dermatofitose em todo mundo (BALDA, 2001; MANCIANTI *et al*, 2002; MANCIANTI *et al*, 2003; OLIVARES, 2003).

### 4.2.1. *Microsporum canis*

O *M. canis*, dentre os dermatófitos, é o responsável pela maioria de casos de micoses em animais de estimação e o mais frequente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (BRILHANTE *et al*, 2003). É um fungo filamentoso, dermatófito zoofílico, cosmopolita transmitido por diversos animais domésticos, tendo como principal reservatório felinos jovens, que podem apresentar-se clinicamente afetados e, em contraste, os adultos portadores podem não apresentar lesões (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Chermette *et al*, (2008), demonstraram que o *M. canis* está frequente em mais de 90% dos casos isolados de dermatofitose em gatos.

A transmissão do *M. canis* é feita pelo contato com pêlos e descamações de pele contaminada ou elementos de fungo no animal, no ambiente. Objetos associados ao tratamento, transporte e moradia dos animais, como pentes, escovas, artefatos de tosa, camas,

gaiolas transportadoras e outros, são prováveis fontes de infecção do *M. canis* (SCOTT *et al*, 1996).

#### **4.2.2. *Microsporium gypseum***

As infecções por *M. gypseum* ocorrem ocasionalmente em cães e raramente em gatos, já que os primeiros são usualmente mais expostos a dermatófitos geofílicos pelo hábito de cavarem o solo (MORIELLO *et al*, 2004).

Este microrganismo é um dermatófito geofílico, que normalmente habita o solo e em determinadas situações infecta tanto o homem quanto os animais. As lesões individuais tendem a mostrar-se bem circunscritas, intensamente crostosas e associadas com um espessamento distinto de pele. Frequentemente as lesões são isoladas, embora várias lesões possam ser encontradas em qualquer dado paciente. Os locais de predileção típicos são as orelhas, cabeça e face, e as extremidades (WILKINSON *et al*, 1996).

#### **4.2.3. *Trichophyton mentagrophytes***

Infecções por *T. mentagrophytes* ocorrem regularmente em cães e ocasionalmente em gatos, sendo comuns em roedores, como coelho, cobaias, ratos, camundongos e animais selvagens, causando cerca de 20% da doença em cães (ROCHETTE *et al*, 2003).

A infecção tende a disseminar-se e pode cobrir grandes áreas da pele e a partir de um pequeno foco, ela pode, com o tempo, cobrir todo o animal. A cabeça e extremidades distais aparentemente são locais de predileção (WILKINSON *et al*, 1996).

### 4.3. Patogenia

A estrutura física e química da pele representa a maior barreira de defesa do hospedeiro contra fungos patogênicos. A pele, em geral, é uma superfície inóspita para o crescimento fúngico em virtude da exposição dos raios Ultravioleta, de constante renovação das células epiteliais, pela queratinização, bem como, pela competição da própria microbiota normal contra os demais microrganismos invasores (MORIELLO, 2004).

Difícilmente os cães e gatos são acometidos por diferentes espécies de dermatófitos. A transmissão ocorre por contato direto com elementos micóticos ou arthrosporos (esporo assexuado que é formado pela fragmentação das hifas) presentes em animais, meio ambiente ou sobre fômites contaminados (SCOTT *et al*, 1996).

Um dos fatores que poderia ser considerado favorável para os fungos dermatofíticos é que, estes, diferentes de outros fungos, se nutrem da queratina que é o principal constituinte do estrato córneo de homens e animais (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Viani *et al* (2001), em estudos da atividade enzimática em cepas de *M. canis*, analisaram queratinases, lipases, elastases e DNAses, demonstraram que a enzima queratinase está correlacionada diretamente com o desenvolvimento dos sintomas das lesões dermatofíticas, não sendo observada tal situação com as demais enzimas.

Os arthrosporos se aderem às células do estrato córneo e germinam produzindo hifas. A secreção de queratinases auxilia a invasão das mesmas na pele. Em seguida, ocorre a infecção do pêlo que se encontra na fase de anágeno, acometendo o interior do pêlo (invasão endotrix) sem infectar sua matriz mitótica ativa. A invasão termina quando o pêlo entra na fase de telógeno. Depois da invasão das hifas pelo corpo do pêlo, formam-se massas de arthrosporos esféricos infectantes na superfície do mesmo (invasão ectotrix). Esta infecção provoca uma resposta inflamatória que, em circunstâncias normais, pode levar à resolução da enfermidade dentro de um a três meses. A infecção crônica ocorre quando o hospedeiro não é capaz de gerar uma resposta imune satisfatória. O dermatófito acomete o tecido queratinizado, penetra a pele, pêlos e unhas causando danos mecânicos que resultam em descamação da superfície epitelial e quebra do pêlo; seus metabólitos se difundem pelas células da epiderme causando reação inflamatória e de hipersensibilidade, responsáveis pelo desenvolvimento das lesões (SCOTT *et al*, 1996; NESBITT *et al*, 2001).

Animais de todas as idades, sexo ou raça são susceptíveis a infecções por dermatófitos, embora a doença ocorra mais comumente em animais jovens, velhos e imunodeprimidos (MORIELLO, 2004).

Outros fatores que desempenham papel importante no início e manutenção da doença são: 1. virulência da cepa; 2. manejo deficiente; 3. alta densidade animal; 4. excesso de banhos; 5. cuidados devido à redução do sebo; 6. o crescimento e reposição do pêlo e 7. o estado fisiológico do hospedeiro (OLIVARES, 2003). A imunossupressão causada pelo câncer, hiperadrenocorticismo, leishmaniose, erliquiose, má nutrição e terapia por glicocorticóides leva a um aumento na incidência da doença. O estresse da prenhez e lactação também pode aumentar a susceptibilidade à infecção (CERUNDOLO, 2004).

#### **4.4. Sinais Clínicos**

Os sinais clínicos de dermatofitose em gatos são variáveis e não são específicos para um dermatófito em particular (SCOTT *et al*, 1996).

A dermatofitose em cães e em gatos é uma doença folicular e os sinais clínicos são essencialmente um reflexo da foliculite do pêlo e posterior inflamação, sendo o prurido variável em intensidade, sendo muitas vezes indistinguível quando comparada com quadros de Demodicose ou ainda com a piodermite bacteriana (MORIELLO, 2004).

##### **4.4.1. Lesão clássica (“ringworm”)**

Clinicamente em gatos, a doença apresenta áreas irregulares ou anulares de alopecia de um a quatro centímetros de diâmetro (“ringworm”) com ou sem caspa, de aparência pulverulenta no centro da lesão, pêlos tonsurados e desgastados, hiperqueratose folicular, foliculite, comedões, seborréia, eritema, crostas e pápulas foliculares, enquanto as extremidades formam um anel eritematoso (OLIVARES, 2003). A coalescência das lesões individuais produz uma configuração policíclica irregular, mas com os contornos dos anéis originais ainda visíveis (SCOTT *et al*, 1996).

#### **4.4.2. Hipotricose**

Nas áreas da lesão há quebra na base do pêlo, com perda parcial e áreas focais ou difusas de alopecia (SCOTT *et al*, 1996), o que cria uma rarefação pilosa (OLIVARES, 2003).

#### **4.4.3. Foliculite e furunculose dermatofítica**

A foliculite e a furunculose iniciam como uma infecção superficial ou folicular de origem bacteriana, fúngica ou parasitária. A infecção de um ou de alguns folículos contíguos por dermatófitos induz o aparecimento de lesões papulares discretas de tamanho variado. A inflamação, a obstrução ou a degeneração foliculares ou a combinação destas predispõem à infecção bacteriana secundária do folículo, e a dermatofitose e a Demodicose são as causas primárias mais comuns da inflamação (SCOTT *et al*, 1996).

#### **4.4.4. Quérion dermatofítico**

A hipersensibilidade aos excrementos ou aos elementos fúngicos, caracterizada por infiltração inflamatória mononuclear e piogranulomatosa, promove o quérion dermatofítico, que se apresenta clinicamente como placas ou nódulos eritematosos, úmidos, circunscritos, com seios drenantes e exsudação purulenta (SCOTT *et al*, 1996; MACIEL; VIANA, 2005).

#### **4.4.5. Onicomicose e/ou Paroníquia**

Ao invadir a queratina ungueal, os dermatófitos podem torná-la frágil, facilmente quebradiça ou pulverulenta. A onicomicose pode causar fragilidade e deformidade crônica da unha (MORIELLO, 2006).

#### **4.4.6. Pseudomicetoma dermatofítico**

O pseudomicetoma dermatofítico é uma infecção profunda da derme e do tecido subcutâneo, na qual reações inflamatórias granulomatosas cercam as hifas do dermatófitos, estando raramente presente em gatos (ABRAMO *et al*, 2001).

Tostes *et al* (2003), relataram em seu trabalho dois casos de pseudomicetoma dermatofítico felino, nos quais o fungo isolado foi *M. canis*. As lesões caracterizavam-se por nódulos variando de 1,0 a 1,5cm de diâmetro, friáveis e com exsudação purulenta em um dos casos.

### **4.5. Diagnóstico**

O diagnóstico feito com base apenas nos sinais clínicos pode ser falso, o que leva à superestimação da incidência das dermatofitoses. Além disso, a falta do diagnóstico laboratorial dificulta o conhecimento da população fúngica que é a mais incidente, visto que, relatos da literatura especializada demonstram que esta pode variar de acordo com o local (KOSRAVI; MAHMOUDI, 2004).

Muitas vezes a dermatofitose é subdiagnosticada devido à variabilidade de apresentações clínicas, mas em contrapartida, pode ser superdiagnosticada quando o clínico confia apenas no aspecto das lesões, sem evidências laboratoriais. O diagnóstico de dermatofitose é normalmente baseado nos dados de identificação, histórico, exame clínico e exames complementares, tais como, exame pela lâmpada de Wood, exame

micológico direto, cultura micológica e, por fim, o exame histopatológico, embora pouco utilizado na rotina diagnóstica das dermatofitoses caninas (SCOTT *et al*, 1996).

#### **4.5.1. Histórico**

O histórico tem valor limitado, a menos que a ocorrência de exposição seja conhecida. É importante determinar se há animais e humanos contactantes infectados e o ambiente em que o animal vive para auxílio no controle da doença (SCOTT *et al*, 1996).

#### **4.5.2. Exame da Lâmpada de Wood**

O exame da lâmpada de Wood é um valioso teste de triagem, que auxilia na escolha de pêlos fluorescentes para cultura micológica e exame microscópico direto, propiciando maior êxito no isolamento. A lâmpada de Wood produz uma luz ultravioleta com comprimento de onda de 330 a 365 nm passada através de um filtro de cobalto ou níquel. Ela deve ser ligada e preaquecida por cinco a dez minutos antes de sua utilização, porque a estabilidade da intensidade e do comprimento de onda emitida depende da temperatura (BALDA, 2001; MORIELLO, 2004). Os pêlos devem ser expostos à lâmpada de Wood durante três a cinco minutos. As hastes individuais dos pêlos devem fluorescer, o que não acontece em caspas, crostas e culturas de dermatófitos (SCOTT *et al*, 1996). A fluorescência da pele e do pêlo é resultado de um metabólito do triptofano produzido por alguns dermatófitos. Entre os dermatófitos zoofílicos somente o *M. canis* produz essa reação, que, segundo a literatura, ocorre em 50 a 70% dos casos (MACIEL; VIANA, 2005).

Esse exame é uma ferramenta útil na clínica de animais de companhia, entretanto apresenta limitações e baixa sensibilidade, pois nem todas as linhagens de *M. canis* mostram fluorescência e algumas preparações tópicas, como o iodo possa inibi-la e outras, como a tetraciclina, o sabão e o petróleo – que podem provocar fluorescência não-específica, podem originar resultados falso-positivos (SCOTT *et al*, 1996).

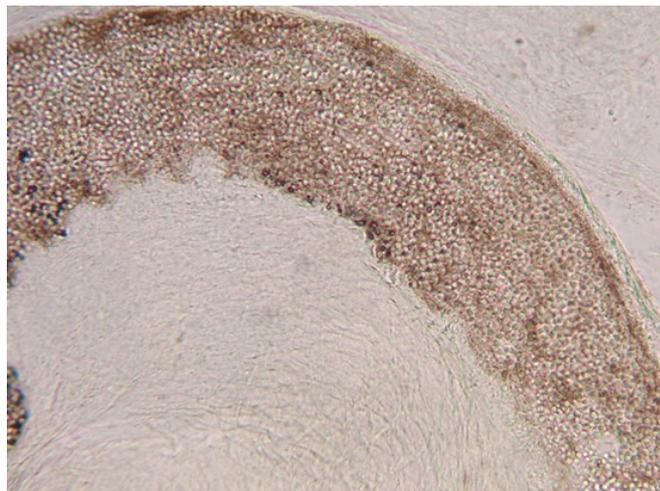
Adicionalmente, algumas bactérias presentes no pêlo podem causar fluorescência quando expostas à luz ultravioleta, entretanto a coloração não é a mesma apresentada por pêlos infectados com dermatófitos (SCOTT *et al*, 1996).

Assim ao usar este método, deve-se estar ciente que uma fluorescência verde-brilhante é aceita como uma indicação de dermatofitose, mas a sua ausência não a descarta, sendo este um teste de auxílio e não um teste diagnóstico (OLIVARES, 2003).

#### **4.5.3. Exame Micológico Direto**

O exame microscópico direto da amostra é um método rápido e fácil para estabelecer se o animal tem uma infecção fúngica, porém só é útil quando a coleta da amostra for realizada corretamente (TRABULSI *et al*, 1999). As amostras examinadas ao microscópio óptico constituem-se de raspados de pele das bordas das lesões e da epiderme queratinizada, bem como de pêlos de outros locais que devem ser arrancados com a porção intrafolicular e colocados em uma lâmina de vidro, para verificar a presença de hifas e artroconídios (SCOTT *et al.*, 2001).

Para visualizar as formas parasitárias é necessário limpar e clarear a amostra com soluções alcalinas fortes como KOH, NaOH ou Ca(OH)<sub>2</sub>. Comumente, a solução de KOH é utilizada na concentração de 10-30%, este procedimento é denominado clarificação. Então uma lamínula é colocada sobre o material e visualizado em microscópio óptico em objetiva de 40X para verificar a presença de hifas e artroconídeos na forma de endotrix (Figura 1) ou ectotrix (Figura 2) (OLIVARES, 2003).



**Figura 1.** Exame micológico direto. Pêlo endotrix infectado por hifas de fungo dermatófito (MACIEL; VIANA, 2005).



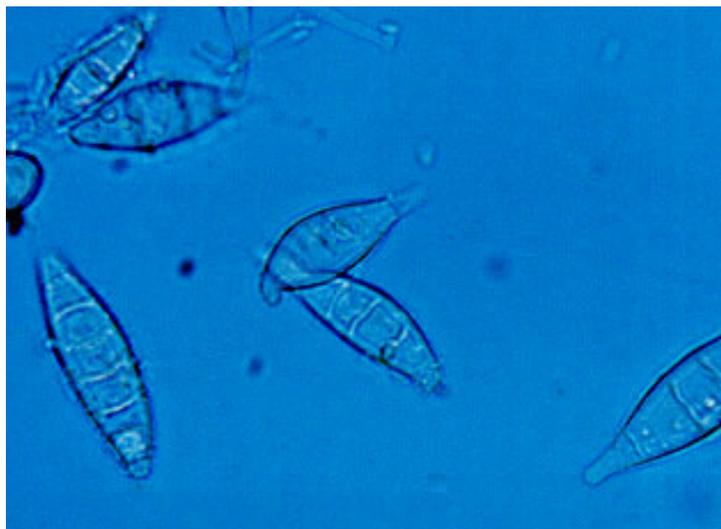
**Figura 2.** Exame micológico direto. Pêlo ectotrix infectado por hifas de fungo dermatófito (MACIEL; VIANA, 2005).

#### 4.5.4. Cultura Micológica

A cultura fúngica é o teste diagnóstico mais confiável e o meio de identificação específico do dermatófito (SCOTT *et al.*, 1996). Comumente é utilizado o meio ágar sabouraud-dextrose (4% glicose, 1% peptona e 2% Ágar), pH 5,6 adicionado de agentes bactericidas como penicilina ou tetraciclina (100mg/mL), gentamicina (100mg/mL), estreptomicina ou cloranfenicol (50mg/mL) e ciclohexamina (500mg/mL), substância redutora da velocidade de crescimento de fungos de rápido crescimento. Os dermatófitos reportados em gatos geralmente crescem em aproximadamente quatro a sete dias, à temperatura de 25-28 °C (OLIVARES, 2003), mas a cultura negativa deve ser observada por até 21 dias antes que o diagnóstico negativo seja confirmado (SCOTT *et al.*, 1996).

O ágar sabouraud-dextrose é o meio comumente mais utilizado, porém existem outros meios, menos freqüentemente utilizados, mas que também podem ser usados na identificação de fungos dermatofíticos, como o meio de teste para dermatófitos (DTM - *Dermatophyte Test Medium*) (BALDA, 2001).

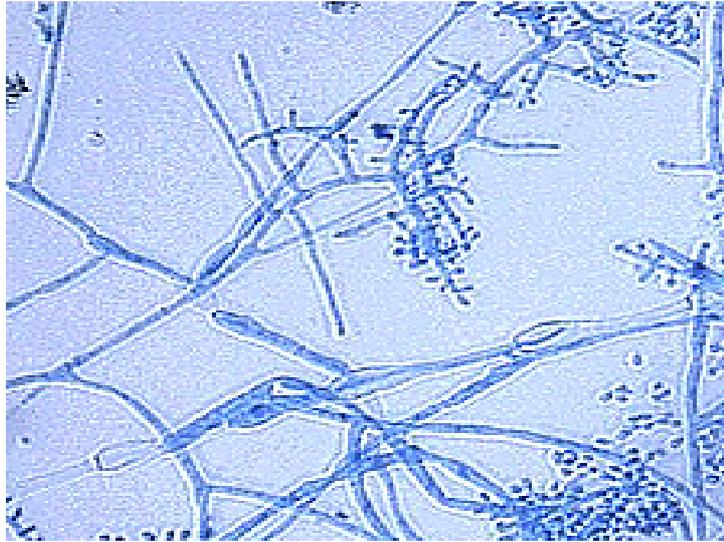
Após o isolamento do dermatófito, é necessário identificar o gênero e a espécie infectante por meio da visualização dos esporos e do crescimento micelial. As colônias de *M. canis* são brancas e algodonosas, tornando-se pulverulentas e com a área central deprimida. O pigmento abaixo da superfície da colônia é amarelo-alaranjado. Estes achados devem ser considerados sempre em conjunto, visto que a colônia fúngica pode sugerir a espécie fúngica em questão, mas são os achados micromorfológicos que irão garantir a caracterização e o diagnóstico preciso. O estudo micromorfológico é feito a partir do isolamento primário, sendo uma pequena alíquota da colônia retirada do ágar e montada entre lâmina e lamínula com corante lactofenol azul-algodão. A montagem é observada em microscopia óptica em objetiva de 40X (SIDRIM; ROCHA, 2004). Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios em formato fusiforme, com parede celular espessa, apresentando de 6 a 15 células e apêndice de fixação (Figura 3).



**Figura 3:** Micromorfologia da colônia de *M. canis*  
(**Fonte:** [www.anaisdedermatologia.org.br/public/figuras](http://www.anaisdedermatologia.org.br/public/figuras))

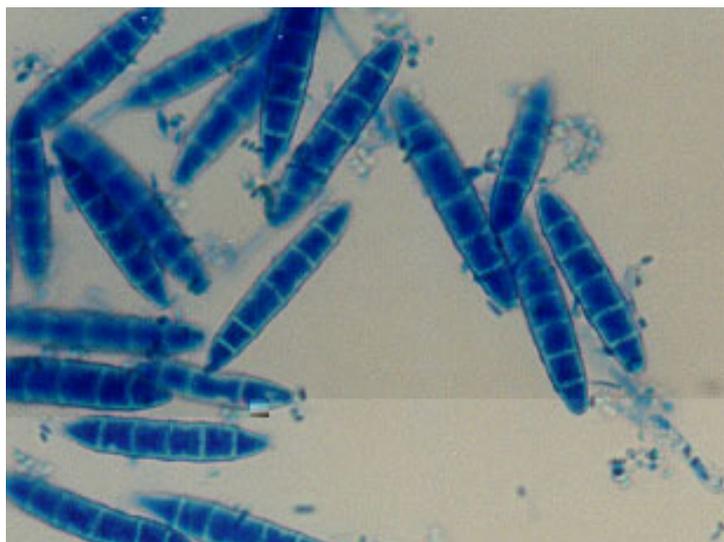
O *T. mentagrophytes* apresenta uma textura furfurácea ou pulverulenta em ágar Sabouraud, sem relevo acentuado, formando às vezes círculos concêntricos, de coloração variando de branco-amarelado a castanho-avermelhado. O reverso geralmente apresenta pigmento castanho podendo tender para o vinho. As características de diferenciação nem sempre são evidentes e todas as espécies apresentam elevada tendência ao pleomorfismo (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Apresenta um crescimento rápido com maturação por volta de seis a onze dias da semeadura primária. Microscopicamente, nota-se uma exuberância de estruturas de frutificação, sendo observada geralmente grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, o que lhe confere aspecto de cacho. Quando presentes, os macroconídios mostram o aspecto semelhante a um charuto, com um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas e septadas (Figura 4). Observa-se, com muita frequência, grande quantidade de hifas em espiral, órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (SIDRIM; ROCHA, 2004).



**Figura 4.** Micromorfologia de *T. mentagrophytes*  
(*Fonte:* [www.pgodoy.com/imicsuperfi.htm](http://www.pgodoy.com/imicsuperfi.htm))

As colônias de *M. gypseum* apresentam textura de achatada a granular e coloração variando de marrom-amarelada a marrom-clara com a pigmentação abaixo da superfície variando de marrom-avermelhada a laranja ou bege. Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios em formato fusiforme (Figura 5).



**Figura 5:** Micromorfologia de *M. gypseum*  
(*Fonte:* [www.anaisdedermatologia.org.br/public/figuras](http://www.anaisdedermatologia.org.br/public/figuras))

## 4.6. Imunologia da Dermatofitose

A imunologia da dermatofitose atualmente é mal compreendida. Alguns trabalhos recentes têm focado sobre a imunidade de células T contra dermatófitos, e agora é aceito que uma resposta imune mediada por células é responsável pelo controle da infecção por dermatófitos. Por outro lado, a susceptibilidade a dermatofitose crônica, está associada à atopia e a hipersensibilidade imediata (ALMEIDA, 2008).

Ambos os tipos de imunidade acima citados, estão envolvidos na resposta a uma infecção por dermatófito. Além disso, tem sido demonstrado que antígenos de *Microsporum canis* e de várias espécies de *Trichophyton*, provocam tanto a resposta imune humoral quanto a mediada por células. A dermatofitose é uma doença que ilustra a dicotomia do sistema imunológico ao resultado da infecção.

A resposta imune contra fungos varia com mecanismos de proteção que já estavam presentes no início da evolução de organismos multicelulares (imunidade inata) e de mecanismos que são induzidos durante a infecção e a doença (imunidade adaptativa) (ROMANI, 2004).

### 4.6.1. Resposta imune inata

A imunidade inata é fundamental para o desenvolvimento de células, adaptação de respostas imunomediadas no controle das infecções micóticas ou para a progressão da doença. Participa em conferir às células fagocitárias a sua capacidade de inibir o crescimento fúngico, bem como no desencadeamento de uma reação inflamatória aguda ou na apresentação de antígenos fúngicos para as células T (ROMANI, 2000).

Vários autores demonstraram a liberação de interleucina-8 (IL-8) por queratinócitos na presença de antígenos de dermatófitos, tais como a tricofitina, sugerindo que essas células possam contribuir à indução de uma resposta aguda durante a infecção por dermatófitos (SHIRAKI *et al*, 2006). A produção de IL-8 por queratinócitos, induz o acúmulo de neutrófilos no estrato córneo. Assim, parece que os queratinócitos não só desempenham um importante papel estrutural na formação de uma barreira física contra dermatófitos, mas pode também desempenhar uma importante função no início de uma reação inflamatória cutânea.

A maioria dos estudos sobre dermatófitos, investiga o papel das células T sobre o resultado da infecção. Poucos têm abordado o papel dos macrófagos e neutrófilos durante a fase inicial da infecção (ALMEIDA, 2008).

#### **4.6.2. Resposta imune adaptativa**

##### **4.6.2.1. Imunidade Humoral**

Vários estudos têm demonstrado que a imunidade humoral a dermatófitos, não é protetora. Entretanto, os anticorpos foram detectados em diversos pacientes e animais (SVEJGAARD, 1986).

As concentrações de anticorpos contra várias espécies de dermatófitos já foram medidas utilizando diferentes métodos, como imunodifusão, ELISA, contraimunoelctroforese e fixação de complemento. Kaaman *et al* (1981), mostraram maior concentração de anticorpos IgG contra antígenos de dermatófito, medido por ELISA, em indivíduos infectados em comparação com a encontrada em controle não infectados.

##### **4.6.2.2. Resposta imune mediada por célula**

A célula imune mais característica da resposta mediada é o (DTH). O DTH é uma forma da imunidade mediada por células, em que o último efeito celular é a ativação de macrófagos. Na reação de (HTT) clássica, a ativação de macrófagos é mediada pelo interferon gama (IFN- $\gamma$ ), produzindo linfócitos T CD4 (Th 1). Estas células T reconhecem e respondem aos antígenos estranhos apresentados sob a forma de um complexo de peptídeos e de (MHC) classe II. Vários trabalhos têm demonstrado que a resolução da dermatofitose é mediada por DTH (CALDERON, 1989).

#### 4.7. Vacinação contra a Dermatofitose

Na Noruega e em alguns outros países, a vacinação em larga escala em animais de produção, tem quase eliminado a doença. Tendo como consequência a quase inexistência da micose causada por *Trichophyton* no homem. Um benefício semelhante poderia ser esperado se uma vacina segura e eficaz, estivesse disponível no mercado para *Microsporum canis* em cães e gatos (DE BOER; LUND, 2008).

Os estudos desenvolvidos por Sarkisov (1987), demonstraram que as vacinas contendo hifas de dermatófitos, não conferem proteção mediante a provocação, enquanto que as vacinas de conídios sim. Hussin e Smith (1983), examinaram a imunogenicidade e proteção das diferentes preparações de vacina *T. mentagrophytes* em um modelo de cobaia. A vacina viva de esporos foi a mais eficaz e os autores sugeriram que os antígenos responsáveis por uma resposta imune protetora são susceptíveis de serem expostos no momento da germinação dos esporos e crescimento de hifas. A vacina de extrato citoplasmático, não tinha qualquer efeito benéfico sobre o curso da infecção. Considerando que a vacina preparada com parede celular de hifas inativadas, produziu um tipo de proteção intermediária contra o antígeno (HUSSIN; SMITH, 1983).

A eficácia da vacina contendo parede celular de *Microsporum canis* foi avaliada, ocasionando em dois gatos vacinados, o desafio direto e o contato com animais infectados. No entanto, todos os animais desenvolveram lesões da micose (DE BOER; MORIELLO, 1994, DE BOER; MORIELLO, 1995). Bezerros e cobaias foram vacinados com os preparados da fração ribossomal de *T. verrucosum* e *M. canis*, respectivamente. Os sinais da micose se desenvolveram após o desafio (ELAD; SEGAL, 1994; ELAD; SEGAL, 1995).

##### 4.7.1. Vacinação contra dermatófitos em bovinos

Nos bovinos, a dermatofitose é mais freqüentemente causada por *T. verrucosum* e *T. mentagrophytes*, ocasionalmente por *T. equinum* e *M. canis* (STENWIG, 1985). Há quatro tipos de vacinas comercializadas para o uso em bovinos contra a doença causada pelo *T. verrucosum*, três são monovalentes contendo células vivas de *T. verrucosum*, e a outra inativada contendo três espécies de dermatófitos, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* e *T.*

*sarkisovii*. O procedimento mais comum para avaliação da eficácia da vacina e de sua segurança, tem sido caracterização da resposta imune envolvendo as espécies animais, além disso, estes parâmetros são estudados em um sistema onde os animais são desafiados com uma cepa virulenta pertencentes à mesma espécie do dermatófito presente na vacina (DE BOER; LUND, 2008).

#### **4.7.2. Vacinação contra dermatofitose em animais de companhia (cães e gatos)**

A eficácia dos programas de vacinação contra a dermatofitose em animais de produção em muitos países, tem estimulado a busca de uma efetiva (e, idealmente, vacina profilática) em animais de companhia. Historicamente, a indústria de produtos biológicos na Europa Oriental foi ativa no desenvolvimento de vacinas para uso em cavalos, incluindo o início da vacina Tricofitose eqüina (MACKENZIE *et al*, 1986).

Aparentemente, para estimular uma imunidade mediada por células e uma longa duração, vacinas inativadas destinadas a animais de companhia, é necessária a adição de um adjuvante. Uma vacina formulada com adjuvante contendo duas cepas inativadas do *T. equinum*, foi estudada em eqüinos. A aparente proteção foi de 75% para o desafio pós-imune (PIER; ZANCANELLA, 1993). Só recentemente foram feitos esforços para resolver a falta de vacinação em gatos. Estudos preliminares em Guiné, em modelo de suínos através de vacinas vivas e inativadas de duas diferentes cepas de *M. canis*, demonstrando melhor proteção seguinte ao desafio, os animais vacinados com a vacina inativada. As vacinas foram preparadas de acordo com um protocolo especial, e estimulou resposta de DTH, no entanto, não houve menção do teor de adjuvante (WAWRZKIEWICZ; ZIOLKOWSKA, 1996). As duas preparações da vacina foram estudadas em gatos domésticos. A preparação composta pela parede celular de *M. canis* inativada, injetada em 8-9 semanas, com intervalos quinzenais, induziu maior título de anticorpos anti-dermatófitos e de imunidade mediada por células (medida pelo teste linfoblastogênese), mas estas respostas imunológicas não eram tão fortes quanto às vistas na infecção natural. O procedimento de vacinação não conferiu resistência à infecção, tanto provocada com o desafio experimental com inoculação de esporos ou através do contato com um gato infectado (DE BOER; MORIELLO, 1995).

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. Animais e local**

Foram utilizados 10 (dez) gatos domésticos, sem raça definida de ambos os sexos, clinicamente saudáveis, fornecidos pelo gatil Sônia Almeida, localizado no município de Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro.

Todo o procedimento laboratorial foi realizado junto ao Setor de Doenças Infectocontagiosas, Seção de Micologia Veterinária do Laboratório de Sanidade Animal do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) e ao Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

Todos os animais foram analisados em condições adequadas e dentro dos padrões exigidos pela Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UENF, submetido sob o número Ø57/2009, com situação de aprovado.

### **5.2. FASE PRÉ-IMUNE**

#### **5.2.1. História Clínica**

Todos os animais foram submetidos a exame clínico-dermatológico antes da vacinação e realizado o preenchimento da ficha clínica/dermatológica própria (Apêndice 1).

Estes animais não tinham acesso à rua, sendo domiciliados desde o nascimento.

#### **5.2.2. Cultura Micológica**

Todos os animais foram submetidos ao exame de cultura micológica por varredura.

As amostras para cultivo fúngico foram retiradas através da varredura do pêlo, utilizando-se uma escova própria para a escovação de felinos domésticos, de material aço inoxidável, medindo 18 cm de comprimento. Sendo a escovação desde o plano cervical até a base da cauda.

Após cada coleta, a assepsia da escova foi realizada com álcool 70% e flambada posteriormente, para o uso em outro animal.

Cada amostra de pêlo foi armazenada em potes estéreis, lacrados, identificados com a numeração do animal e da ficha correspondente, e imediatamente levado ao laboratório de Micologia para a realização de cultura micológica.

O meio seletivo utilizado foi ágar Sabouraud glicose 4% (Acumedia) em placas de Petri adicionados de cloranfenicol e ciclohexamida. A incubação ocorreu em temperatura ambiente por um período de até 21 dias.

### 5.2.3. Sorologia dos animais

Foram coletados 2ml de sangue dos animais, através da veia jugular e obtido o soro por centrifugação (Figura 6). Estes foram alicotados em três tubos de microcentrifugação (Eppendorf), cada um contendo 300µl de soro e os títulos de anticorpos IgG medidos por ensaio imunoenzimático – ELISA.



**Figura 6.** Coleta de sangue de gato, através da veia jugular. Gatil Sônia Almeida, Campos dos Goytacazes, RJ, fevereiro/2009.

### **5.3. Vacinação dos Animais**

A vacina utilizada foi a BIOCAN M®, contendo cepa imunogênica inativada de *Microsporium canis* e hidróxido de alumínio 2% (0,15 ml). Sendo fabricada por ARSA RSL, Roosevelt 1724 (C1428BNF) – Buenos Aires, República Argentina e importada e distribuída no Brasil pelo Laboratório Tecnopec, localizado a Rua Emilio de Souza Docca, 480 – Vila Santa Catarina – São Paulo – SP – CEP: 04379-020, frasco-ampola contendo 1 ml, aplicado através da via subcutânea.

A vacinação dos animais foi realizada em dois momentos, de acordo com o recomendado pelo fabricante. Os animais receberam duas doses de 1ml da vacina, por via subcutânea, intervaladas de 14 dias.

### **5.4. FASE PÓS-IMUNE**

#### **5.4.1. Primeira Dose Vacinal (Dia 0)**

Todos os animais receberam a 1ª dose da vacina (1ml), por via subcutânea.

#### **5.4.2. Coleta de Soro (Dia 14)**

Foi coletado sangue para obtenção de soro em todos os animais, antes da aplicação da vacina, para posterior titulação de anticorpos por método imunoenzimático – ELISA.

#### **5.4.3. Segunda Dose Vacinal (Dia 14)**

Todos os animais receberam a 2ª dose da vacina (1ml), por via subcutânea.

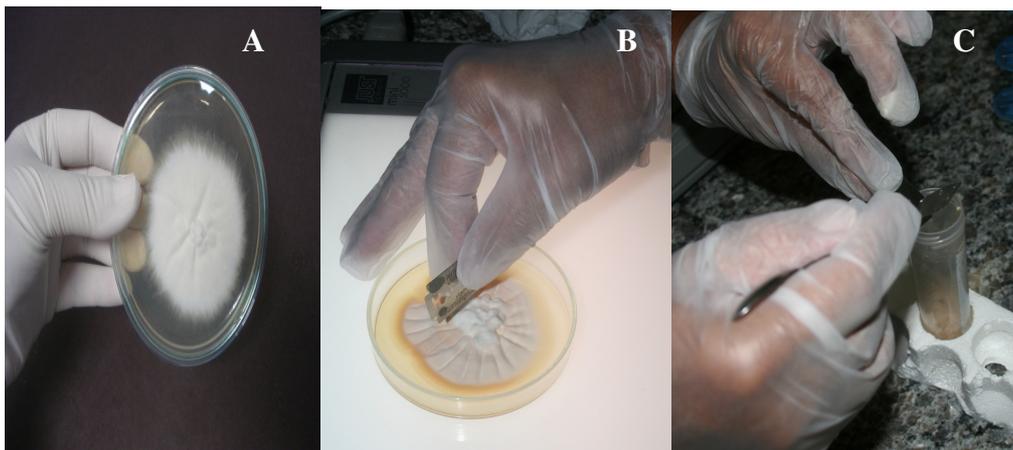
#### **5.4.4. Coleta de Soro (Dia 30)**

Foi coletado sangue para obtenção de soro em todos os animais no 30º dia após 1ª dose vacinal, para titulação de anticorpos pelo método imunoenzimático – ELISA.

#### **5.5. Produção do antígeno**

Nesta etapa seguiu-se a metodologia descrita por PEANO *et al* em 2005 com modificações. Foram utilizados isolados de *Microsporum canis* em ágar Sabouraud, obtido através de cepa clínica do atendimento clínico-dermatológico do Hospital Veterinário da UENF.

Foram utilizadas 5 (cinco) placas de Petri contendo colônias maduras de *Microsporum canis*. As colônias foram levemente escarificadas com lâmina estéril e transferidas para um tubo Falcom de 15ml (Figura 7) e acrescentados de 2ml de tampão PBS (para 1000ml de água destilada, NaCl 8,0g, KCl 0,2g, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,13g , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2g, pH 7,2). O material foi submetido ao ultra-som em cinco séries de três minutos a 80W em pulsos de três minutos e centrifugado a 4500 x G por 10 minutos em temperatura ambiente.



**Figura 7.** Extração de proteína de colônia de *Microsporium canis*. (A) Colônia algodoadosa de *Microsporium canis*, (B) escarificação com gilete estéril e (C) transferência do material escarificado para tubo Falcon e acrescentado tampão PBS. Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, LBCT / UENF / 2009.

### 5.5.1. SDS-PAGE

A etapa para observação do perfil eletroforético das extrações de proteínas totais foi realizada em gel de SDS-PAGE (concentração e de separação, 4 e 12%, respectivamente), segundo LAEMMLI (1970). A amostra do material foi misturada a um tampão de amostra (azul de bromofenol 0,025%, glicerol 10%, Tris 0,06 M pH 6,8, SDS 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%) e seu volume final ajustado com 20  $\mu$  de água destilada. Posteriormente, as amostras foram submetidas à corrida utilizando tampão desnaturante 1X (Tampão de corrida 10X: 250 mM de Tris-base, 1,92M de Glicina e 10% de SDS, acrescentado água para um volume de 1 litro) sob a carga constante de 120V.

Os géis de poliacrilamida foram imersos em corante comassie-blue (Ácido acético 10%, etanol 45%, Azul de Comassie 0,2%) e mantidos sob agitação durante 60 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação os géis foram colocados em solução descorante (ácido acético 7%, etanol 5%) e mantidos sob agitação por 15 minutos. Este processo foi repetido até eliminar o excesso de corante.

### 5.6. Anticorpo secundário

O anticorpo conjugado utilizado para a realização de ensaio imunoenzimático – ELISA, foi o anticorpo secundário policlonal IgG de cabra anti-gato marcado com peroxidase (AbD Serotec), frasco-ampola contendo 1ml.

### **5.7. Ensaio imunoenzimático – ELISA**

A resposta humoral dos animais do grupo pré e pós-imune, foi medida através de ensaio imunoenzimático – ELISA, para medir anticorpos IgG contra antígenos de *Microsporium canis*. Os soros foram analisados em diluições seriadas de 1/8 em base 2 (começando em 1:400) e a leitura realizada em aparelho *Multiskan* com filtro 492.

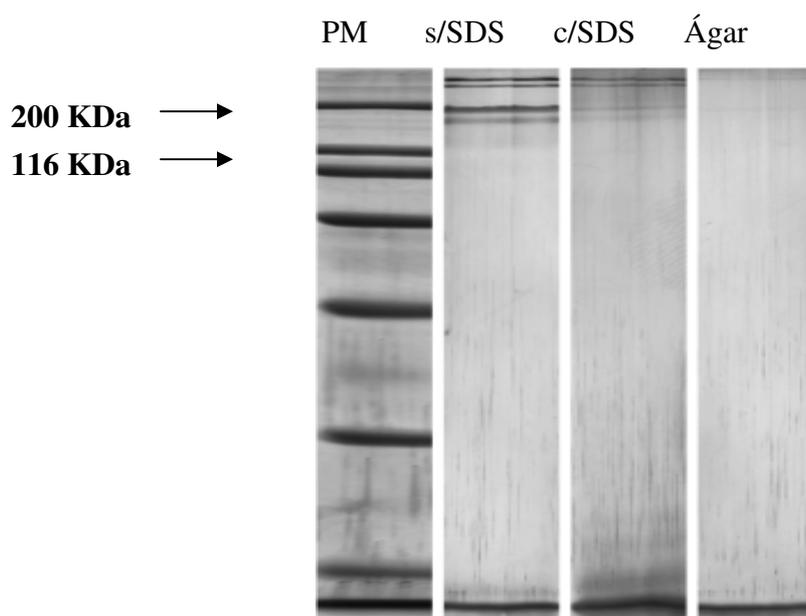
Os antígenos utilizados em ELISA foram diluídos em tampão Carbonato/Bicarbonato 0,05M, pH , na proporção de 2µg/ml. Para a titulação do soro, as placas (Immuno 96 MicroWell™ Placas NUNC) foram sensibilizadas (50µ por poço) com antígeno, durante 1 hora incubada a 37° C. Após uma etapa de lavagem com tampão PBST (100 mL de PBS + 0,05% Tween 20), foi efetuado o bloqueio dos poços com solução PBSG acrescentados de Soro Fetal Bovino (100 mL de PBS + 1% de gelatina + 2% de soro fetal bovino), durante 1 hora em temperatura ambiente. Após mais uma etapa de lavagem com tampão PBST, foi adicionado o soro dos gatos a serem testados, na diluição de 1:400 em PBSTG e 2% de soro fetal bovino, incubado a 37° C durante 1 hora. Após 3 lavagens com PBST, os anticorpos secundários IgG de cabra anti-gato (Serotec) marcado com peroxidase, na diluição 1:2000 em PBSTG + 2% de soro fetal bovino, foram acrescentados à placa, durante 45 minutos e incubados a 37° C. Após 4 lavagens com PBST, o material foi revelado em tampão ácido (solução reveladora) contendo OPD. Finalizando a reação foi utilizada solução de ácido sulfúrico 3N.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Produção do antígeno

Proteínas de *Microsporium canis*, foram utilizadas para sensibilização das placas de ELISA.

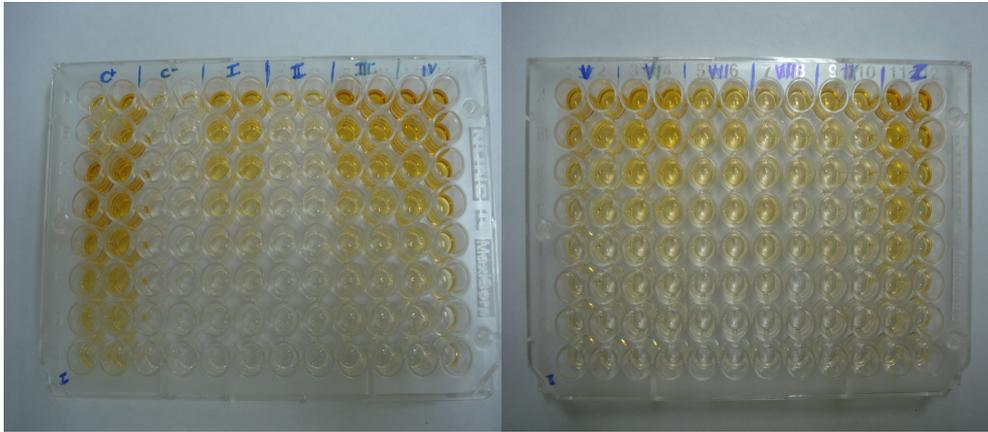
O padrão eletroforético de proteínas em SDS-PAGE, extraídas de colônias de *Microsporium canis* corado com prata, está ilustrado na figura abaixo (Figura 8) . Entre as bandas majoritárias, a linha 1 mostra uma banda de aproximadamente 200 KDa.



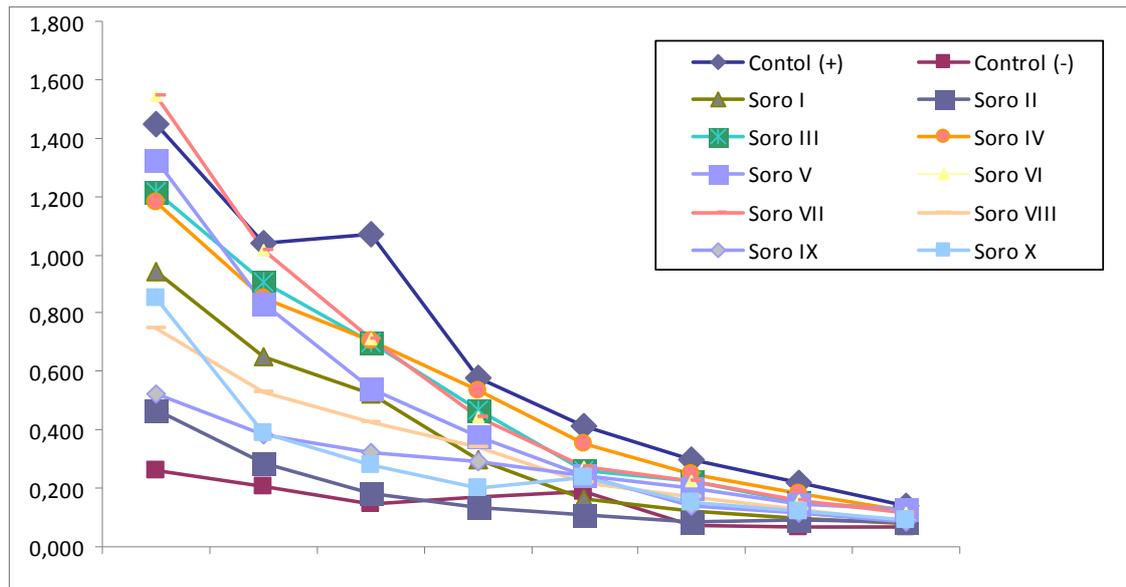
**Figura 8.** Padrão eletroforético das proteínas extraídas de *Microsporium canis* por PBS. Marcador de peso molecular (PM) 200KDa (Protein ladder, Gibco, EUA). LBCT/UENF/2009.

## 6.2. Testes imunológicos

Os títulos de IgG anti-dermatófitos entre o controle positivo (+), controle negativo (-) e o soro pré-imune, são demonstrados na figura 9. Observa-se que houve diferença entre o controle positivo (C+) e os soros pré-ímmes. Os soros titulados da fase pré-ímmes, demonstram que os animais (I a X) apresentaram titulação maior do que o controle negativo (C-) e menor do que o controle positivo (C+) (Gráfico 1).

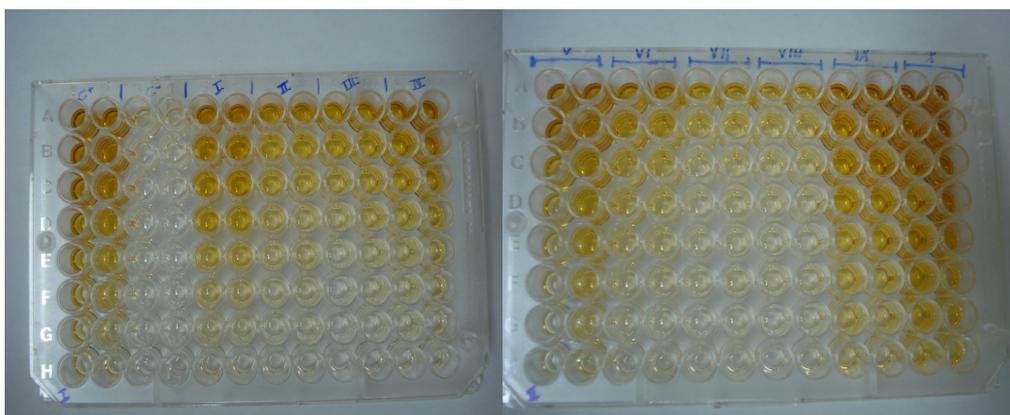


**Figura 9.** Placas de Elisa da titulação entre o controle positivo (C+), controle negativo (C-) e a fase pré-ímmes. Seção de Micologia Veterinária do Hospital Veterinário/UENF, 2009.

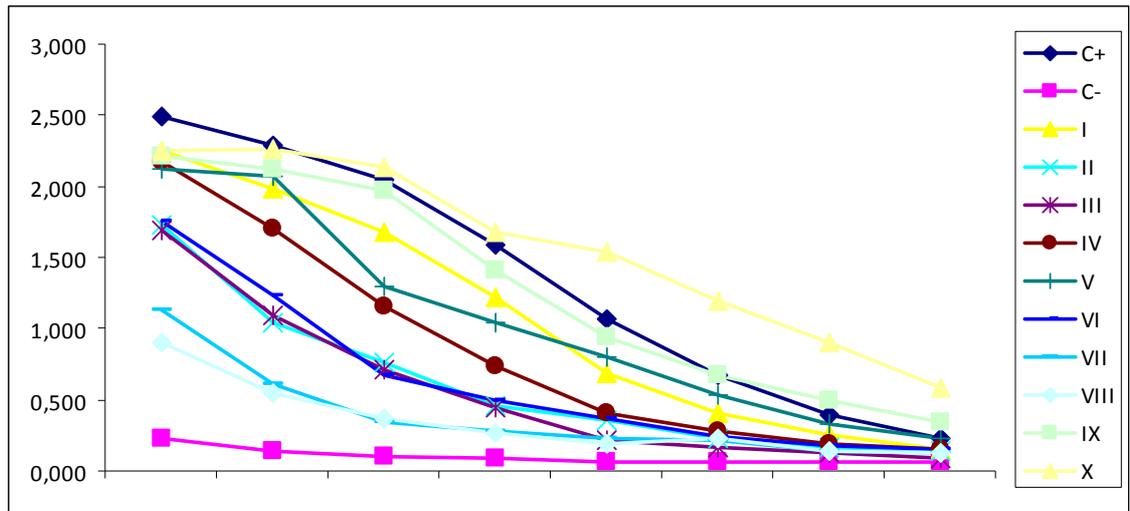


**Gráfico 1.** Apresentação da titulação dos soros de gatos da fase pré-imune. Seção de Micologia Veterinária do Hospital Veterinário/UENF, 2009.

Em relação aos soros do grupo pós-imune 1ª dose (Figura 10), observa-se que não houve diferença entre o controle positivo (C+) e os soros dos animais vacinados com a 1ª dose. Houve diferença entre o controle negativo (C-) e os soros dos animais vacinados com a 1ª dose (Gráfico 2).

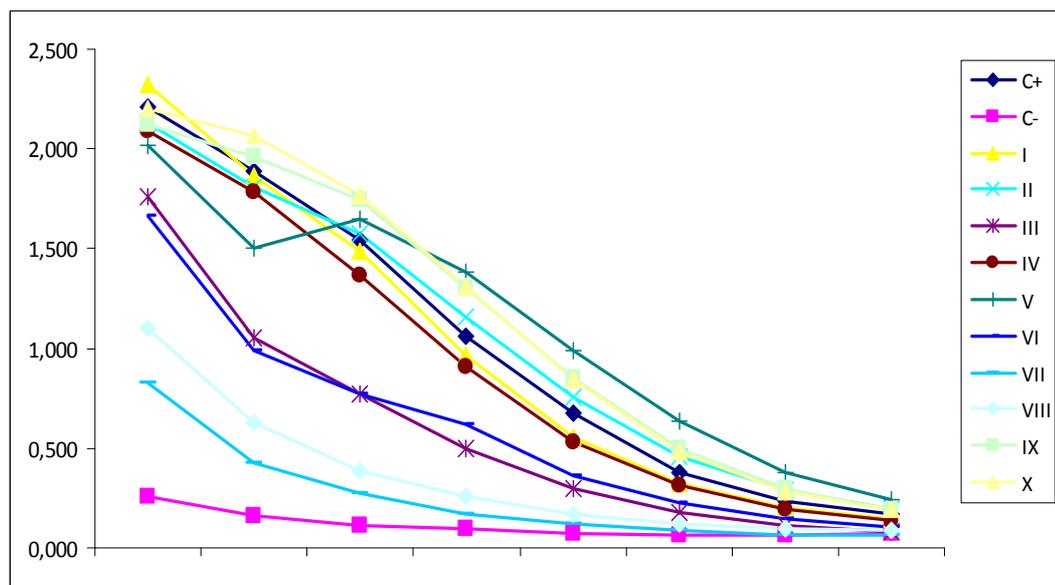


**Figura 10.** Placas de Elisa da titulação entre o controle positivo (C+), controle negativo (C-) e a fase pós-imune 1ª dose. Seção de Micologia Veterinária do hospital Veterinário / UENF, 2009.



**Gráfico 2.** Apresentação da titulação dos soros de gatos da fase pós-imune 1ª dose. Seção de Micologia Veterinária do Hospital Veterinário/UENF, 2009.

Já em relação aos soros de pós-imune 2ª dose, observa-se que não houve diferença entre o controle positivo (C+) e os soros dos animais já vacinados com a 2ª dose da vacina. Houve diferença entre o controle negativo (C-) e os soros dos animais já vacinados com a 2ª dose da vacina (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Apresentação da titulação dos soros de gatos da fase pós-imune 2ª dose. Seção de Micologia Veterinária do Hospital Veterinário/UENF, 2009.

## 7. DISCUSSÃO

Neste estudo a inoculação repetida da vacina contendo *Microsporium canis* inativado e adjuvante em gatos domésticos (*Felis catus*), induziu o aumento da resposta imune humoral no soro dos animais testados corroborando os achados de De Boer e Moriello (1994), PEANO *et al.*, (2005) e VERMOUT *et al.*, (2004).

Apesar da indução do aumento dos títulos de anticorpos, não se pode afirmar que os gatos vacinados estavam protegidos da doença, haja vista que os animais não foram desafiados com cepas de *Microsporium canis* ou gatos com a dermatofitose ativa.

DE BOER e MORIELLO em 1995, relataram o aumento da titulação de anticorpos anti-dermatófitos por ELISA em gatos vacinados contra dermatofitose. Quando os animais foram desafiados com um animal ativo em dermatofitose, os gatos não foram protegidos da infecção pela exposição. Esses resultados fornecem evidências que a indução de altos títulos de anticorpos contra *Microsporium canis*, não é suficiente para fornecer proteção contra infecção.

Conforme PINTER *et al.* (1992), SPARKES *et al.* (1993), ELAD; SEGAL (1995) e ROMANI (2004), demonstraram que a resposta imunológica produzida por um protocolo de vacinação semelhante em gatos, não protegeu os animais de contrair uma infecção dermatofítica quando foram testados pela aplicação tópica de esporos de *Microsporium canis*. Todos os gatos vacinados nestes estudos, desenvolveram lesões, mas as lesões eram menores do que em animais não vacinados, indicando que parcial imunidade foi conferida.

A maioria dos estudos anteriores de vacinação profilática contra dermatofitose, foi realizada em bovinos, cavalos e ratos de laboratório. No entanto, sob o ponto de vista prático, uma vacina deve ser finalmente testada sob condições que irão simular a sua utilização. Assim, após o seu desenvolvimento inicial, vacinas comerciais dermatofíticas para bovinos e cavalos foram testadas por meio de sistemas naturais incorporando a transmissão da infecção para animais não infectados (SEGAL, 1989; SMITH *et al.*, 1992). Os resultados destes estudos não foram previamente notificados para as vacinas contra a dermatofitose felina.

Com isso, como produtos de vacina para dermatofitose em gatos são introduzidos no mercado comercial, é sempre importante que a sua eficácia imunológica e profilática seja estudada, a fim de se obter um verdadeiro método de controle da dermatofitose felina.

## 8. CONCLUSÕES

Os animais apresentaram aumento da titulação de anticorpos, quando comparados entre si, com a fase pré-imune, pós-1<sup>a</sup> dose vacinal e pós-2<sup>a</sup> dose vacinal.

Informações sobre a avaliação de eficácia imunológica da vacina Biocan M® comercializada no Brasil, não constam na literatura disponível até o momento, considerado desta forma inédito no mundo.

É importante a continuação dos estudos desta vacina, principalmente utilizando o desafio experimental após a imunização dos animais, visto que aumento na titulação de anticorpos, não confere a proteção ao animal.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMO, F.; VERCELLI, A.; MANCIANTI, F. Two cases of dermatophytic pseudomycetoma in the dog: an immunohistochemical study. *Veterinary Dermatology*, v. 12, n. 4, p. 203-207, 2001.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2003. 570 p.

ALMEIDA, S. R. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, v. 166, p. 277-283, 2008.

BALDA, A. C. *Estudo Retrospectivo da casuística, comparativo de metodologia diagnóstica e de avaliação de eficácia da griseofulvina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e gatos*. 2001. 146f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

BERNARDO, F.; LANÇA, A.; GUERRA, M.M.; *et al.* Dermatofitos isolados de animais de companhia (cão e gato), em Lisboa, Portugal (2000-2004). *Rev. Port. Cienc. Vet.*, v.100, p.85-88, 2005.

BRILHANTE, R.S.N.; CAVALCANTE, C.S.P.; JUNIOR, F. A.; *et al.* High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, v. 156, n. 4, p. 303–308, 2003.

CABAÑES, F.J.; ABARCA, M.L.; BRAGULAT, M.R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. *Mycopathologia*, v.137, n. 2, p. 107-113, 1997.

CALDERON, R. A. Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 16, n. 2, p. 339-368, 1989.

CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia*. Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2001. 378 p.

CARLOTTI, D. N.; PIN, D. Aspects cliniques et histopathologiques, diagnostic differential et traitements des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Annales de Medecine Veterinaire*, n. 147, p. 85-96, 2002.

CERUNDOLO, R. Generalized *Microsporum canis* dermatophytosis in six Yorkshire terrier dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 15, n. 3, p. 181-187, 2004.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*, v. 166, n. 6, p. 385-405, 2008.

COELHO, A.C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 60, n. 4, p.1017-1020, 2008.

CONCEIÇÃO, L.G. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso no diagnóstico dermatológico – revisão- segunda parte. *Revista Clínica Veterinária*, n. 57, ano X, p. 36-44, 2005.

DEBOER, D. J., MORIELLO, K. A. Humoral and cellular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, v. 31, p. 121-132, 1993.

DEBOER, D. J., MORIELLO, K. A. The immune response to *Microsporum canis* induced by a fungal cell wall vaccine. *Veterinary Dermatology*, v. 5, p. 47-55, 1994.

DEBOER, D. J., MORIELLO, K. A. Investigations of a killed dermatophyte cell wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res. Veterinary Sci.*, v. 59, p.110-113, 1995.

DEBOER, D. J.; LUND, A. Immunoprophylaxis of Dermatophytosis in Animals. *Mycopathologia*, v. 167 ,n. 3, p. 123-129 , 2008.

ELAD, D.; SEGAL, E. Immunogenicity in guinea pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporum canis*. *Vaccine*, v.12, p.134-138, 1994.

ELAD, D.; SEGAL, E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine*, v. 13, p.83-87, 1995.

GALLO, M.G.; LANFRANCHI, P.; POGLAYEN, G.; *et al.* Seasonal 4-year investigation into the role of the alpine marmot (*Marmota marmota*) as a carrier of zoophilic dermatophytes. *Medical Mycology*, v.43, n. 4, p.373-379, 2005.

HUSSIN, Z.; SMITH, J. M. B. Vaccination procedures and the infectivity of dermatophyte lesions. *Mycopathologia*, v. 81, p. 71-76, 1983.

KAAMAN, T.; VON, S. L. V.; VON, S. M.; *et al* .ELISA-determined serological reactivity against purified trichophyton in dermatophytosis. *Acta Dermato-Venereologica*, v. 61, p. 313-317, 1981.

KHOSRAVI, A. R.; MAHMOUND, M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses*, v. 46, n. 5-6, p. 222-225, 2004.

JONES, H.E. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J. Am. Acad. Dermatol*, v. 28, p. 12-18, 1993.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. *Tratado de Micologia Médica*. 9ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

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

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão – primeira parte. *Revista Clínica Veterinária*, n. 56, Ano X, p. 48-56, 2005.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHI, S.; *et al.* Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. *Mycopathologia*, v. 156, n.1, p. 13-18, 2002.

MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CORAZZA, M.; *et al.* Environmental detection of *Microsporum canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, v. 5, n. 6, p. 323-328, 2003.

MACKENZIE, D. W. R.; LOEFFLER, W.; MANTOVANI, A.; *et al* Guidelines for the diagnosis, prevention, and control of dermatophytoses in man and animals. *Geneva: World Health Organization*; 1986.

MENDLEAU, L.; HNILICA, K. A. *Dermatologia de pequenos animais: Atlas colorido e guia terapêutico*. Editora Roca. 2003. 352p.

MIGNON, B.; LOSSON, B. Vaccination against ringworm in cattle. In: Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschueren C, editors. *Veterinary Vaccinology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1997. pp. 490–491.

MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J.; SCHENKER.; *et al.* Efficacy of pre-treatment with lufenuron for the prevention of *Microsporium canis* infection in a feline direct topical challenge model. *Veterinary Dermatology*, v. 15, p. 357-362, 2004.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Veterinary Dermatology*, v. 15, n. 2, p. 99-107, 2006.

MURRAY, P. R., Drew, W. L., Korbay, J. G. S. Superficial, Cutaneous a Subcutaneous Mycoses. *Medical Microbiology*, v. 43, p. 122-131, 2004.

NARA, P. L.; NARA, D.; CHAUDHURI, R.; *et al.* Perspectives on advancing preventative medicine through vaccinology at the comparative veterinary, human and conservation medicine interface – Not missing the opportunities. *Vaccine*, v. 26, p. 6200-6211, 2008.

NESBITT, G. H.; ACKERMAN, L.J. *Dermatología Canina Y Felina Diagnostico y Tratamiento*. Editora Intermedia. Año XXI, 2001.

OLIVARES, C. R. A. Ringworm infection in dogs and cats. In: Recent Advances in Canine infectious diseases. *Medical Mycology*, v. 39, n. 5, p: 463-468, 2003.

PARSLOW, T.G.; STITES, D. P.; TERR, A.I.; *et al.* **Imunologia Médica**. 10<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Guanabara Koogan. 2004. 702p.

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, p. 102-107, 2005.

PIER, A. C.; ZANCANELLA, P. J. Immunization of horses against dermatophytosis caused by *Trichophyton equinum*. **Equine Practice**, v.15, p.23-27, 1993.

PIER, A. C., HODGES, A. B., LAUZE, J. M., RAISBECK, M. Experimental immunity to *Microsporum canis* and cross-reactions with other dermatophytes of veterinary importance. **J. Med. Vet. Mycol.** v. 33, p. 93-97, 1995.

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

RAVEN, P. H; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 6<sup>a</sup> Edição. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2001. 928 p.

ROCHETE, F., ENGELEN, M., VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. **Journal of the Veterinary Pharmacology Therapy**, v. 26, n. 1, p. 31-53, 2003.

ROITT, I. BROSTOFF, J. MALE, D. **Imunologia**. 6<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Manole, 2001. 500p.

ROMANI, L. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 68, n. 2, p. 175-179, 2000.

ROMANI, L. Immunity to fungal infection. *Nature Reviews Immunology*, v. 4, n. 1, p. 11-13, 2004.

SARKISOV, A. K. H. Modern methods for control of animal dermatomycosis. *Advances in Agricultural Sciences*; v. 2, p. 181-197, 1987.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. *Dermatologia de pequenos animais*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1130 p.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. *Small animal dermatology*. 6ª Edição. Philadelphia, 2001. 1528 p.

SEGAL, E. Vaccines for the management of dermatophyte and superficial yeast infections. *Current Topics in Medical Mycology*, v. 3, p. 36-49, 1989.

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; *et al.* Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *Journal of Medical Microbiology*. v. 55, p. 1175-1185, 2006.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Ed. Guanabara Koogan. 2004, 388 p.

SMITH, J. M.; AHO, R.; MATTSSON, R.; PIER, A. C. Progress in veterinary mycology. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 31, p. 307-316, 1992.

SPARKES, A. H., STOKES, C. R., GRUFYDD-JONES, T. J. Humoral immune response in cats with dermatophytosis. *Am. J. Vet. Res.* v. 54, p. 1869-1873, 1993.

SPIEWAK, R.; SZOSTAK, W. Zoophilic and geophilic dermatophytoses among farmers and non-farmers in Eastern Poland. *Agric. Environ. Med.*, v.7, p.125-129, 2000.

STENWIG, H. Isolation of dermatophytes from domestic animals in Norway. *Nord Vet Med*, v.37, p.161-169, 1985.

SVEJGAARD, E. Humoral antibody responses in the immunopathogenesis of dermatophytosis. *Acta Dermato-Venereologica. Supplementum*. v. 121, p. 85-91, 1986.

TECNOPEC. Biocan - M®, Tratamento e Profilaxia contra a dermatofitose. Acesso ao site: [WWW.tecnopec.com.br](http://WWW.tecnopec.com.br), acesso em 23 de março de 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6ª Edição, 2000. 920 p.

TOSTES, A. R.; GIUFFRIDA, R. Pseudomicetoma dermatofítico em felinos. *Ciência Rural*., v.33, n.2, p.363-365, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; *et al.* *Microbiologia*. 3ª Edição. São Paulo: Atheneu, 1999. 586 p.

VERMOUT, S. M.; BROUTA, F. D.; DESCAMPS, F. F.; LOSSON, B. J.; MIGNON, B. R. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v. 40, n.4, p. 75-80, 2004.

VIANI, F.C; DOS SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; *et al.* Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role virulence. *Medical Mycology*, v. 39, p. 463-8, 2001.

WAWRZKIEWICZ, K.; ZIOLKOWSKA, G. Specific immunoprophylaxis in *Microsporium canis* infection in guinea pigs. *Journal Mycol. Med.*, v.6, p.56-62, 1996.

WILKINSON, G. T.; HARVEY, R. G.; *Atlas Colorido de Dermatologia dos pequenos animais*. 2ª Edição. São Paulo: Manole, 1996. 304 p.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Nova Jérsei: Prentice Hall International, 1984.

## Apêndice 1.



**Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – CCTA / LCC**

**Hospital Veterinário – Clínica Médica de Pequenos Animais  
Dermatologia**

Av:Alberto Lamego, 2000 – Parque Califórnia – Campos dos Goytacazes – RJ

Telefone: (22) 2726-2000

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### FICHA CLÍNICA-DERMATOLÓGICA

FICHA Nº \_\_\_\_\_

Número do animal: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Castrado: ( )Sim ( )Não

Espécie: ( )Felina Raça: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Anamnese:

Fez uso de alguma terapia? ( )Sim ( )Não

Medicamento	Dose	Data e tempo de uso	Resultados

Há história de doença de pele anterior? \_\_\_\_\_

Há prurido? ( )Sim ( )Não

( )Leve ( )Moderado ( )Intenso

( )Sazonal ( )Não sazonal

( )Diurno ( )Noturno ( )Diurno/Noturno

Há presença de lesões dermatológicas? ( )Sim ( )Não

Antecede às lesões dermatológicas? ( )Sim ( )Não

Aonde este é mais intenso? \_\_\_\_\_

Animal tem ectoparasitas? ( )Sim ( )Não Qual? \_\_\_\_\_

Já foi tratado? ( )Sim ( )Não Como? \_\_\_\_\_

Alimentação do animal? ( )Ração Nome comercial: \_\_\_\_\_

A limpeza ambiental é feita com: \_\_\_\_\_

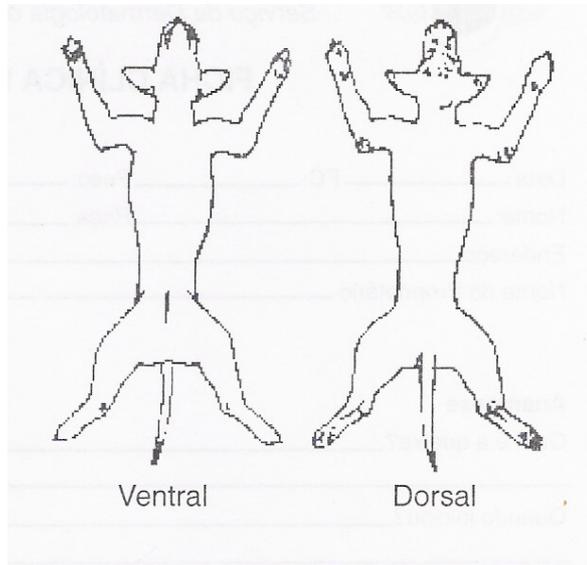
O animal tem contato com o produto usado na limpeza ambiental? ( )Sim ( )Não

Animal é everminado? ( )Sim ( )Não Qual produto foi usado? \_\_\_\_\_

Conjuntamente ao quadro cutâneo há sinais clínicos sistêmicos? ( )Sim ( )Não

Descrever: \_\_\_\_\_

Descrever detalhadamente toda a apresentação clínico-dermatológica do animal.



Pêlo: ( )Brilhante ( )Seco ( )Sem alterações  
 Alopecia: ( )Generalizada ( )Localizada ( ) Não presente  
 Depilação:( )Facilitada ( )Resistente ( )Normal  
 Presença de descamação: ( ) Sim  
 ( ) Não

### Exames Complementares

Pente fino: ( )Positivo ( )Negativo Qual? \_\_\_\_\_

Lâmpada de Wood: ( )Positivo ( )Negativo Áreas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tricograma: ( )Positivo ( )Negativo  
 ( )Endotrix  
 ( )Ectotrix

Áreas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Cultivo Fúngico em meio Ágar Sabouraud: ( )Positivo ( )Negativo  
 Identificação da espécie: \_\_\_\_\_

Cultivo Fúngico em meio de arroz: ( )Positivo ( )Negativo  
 Identificação da espécie: \_\_\_\_\_