

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVO E DETECÇÃO MOLECULAR PARA
DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS DIRETAMENTE DO PELAME DE
CÃES E DE GATOS**

NATÁLIA TOMAZI FRANCESCHI

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVO E DETECÇÃO MOLECULAR PARA
DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS DIRETAMENTE DO PELAME DE
CÃES E DE GATOS**

Autora: Natália Tomazi Franceschi

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Microbiologia, especialidade Micologia.

Orientador: Prof. Dr. Laerte Ferreira

Coorientadora: Dra. Andréia Spanamberg

PORTO ALEGRE

2020

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

CIP - Catalogação na Publicação

Franceschi, Natália Tomazi

Comparação entre cultivo e detecção molecular para diagnóstico de dermatófitos diretamente do pelame de cães e de gatos / Natália Tomazi Franceschi. -- 2020. 42 f.

Orientador: Laerte Ferreiro.

Coorientadora: Andréia Spanamberg.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Micologia veterinária. 2. Dermatofitose. 3. Diagnóstico molecular. 4. Cães e gatos. I. Ferreiro, Laerte, orient. II. Spanamberg, Andréia, coorient. III. Título.

Natália Tomazi Franceschi

COMPARAÇÃO ENTRE CULTIVO E DETECÇÃO MOLECULAR PARA
DIAGNÓSTICO DE DERMATÓFITOS DIRETAMENTE DO PELAME DE CÃES E
DE GATOS

Aprovada em 18 MAR 2020

APROVADA POR:

Prof. Dr. Laerte Ferreiro (UFRGS)
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Andréia Spanamberg (UFRGS)
Coorientadora

Prof. Dr. Régis Adriel Zanette (UFRGS)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Janio Morais Santurio (UFSM)
Membro da Comissão

Dr. Sandro Antônio Pereira (Fiocruz)
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho não seria possível sem o apoio de várias pessoas, as quais não poderia deixar de agradecer:

Meus pais, Enio e Marlova, pelo amor incondicional.

Meu marido, Flávio, pelo incansável incentivo.

Minha irmã, Alessandra, por tornar tudo mais leve.

Meu orientador, Laerte, e minha coorientadora, Andréia, pelo apoio recebido desde a iniciação científica.

Professora Ana Paula Ravazzolo, por contribuir com seus conhecimentos.

Agradeço, também, a todos os animais que tive o prazer de ser tutora, porque eles são o motivo desse caminho trilhado.

RESUMO

Os dermatófitos são responsáveis pela doença fúngica mais frequente na clínica médica veterinária de pequenos animais: a dermatofitose. Trata-se de uma zoonose de distribuição mundial, caracterizada pela infecção de estruturas queratinizadas, como pele, cabelos, pelame, unhas e garras. O cultivo micológico é o padrão de referência para o diagnóstico dessa micose, no entanto requer aproximadamente 15 dias para um resultado definitivo. Métodos de diagnóstico moleculares baseados em PCR possuem elevada sensibilidade e especificidade, além de proporcionarem resultados entre um a três dias. O objetivo deste estudo foi realizar a detecção molecular de dermatófitos diretamente de amostras de pelame de cães e de gatos com suspeita de dermatofitose e comparar os resultados obtidos com o método padrão de referência. Foram coletadas 219 amostras de pelame, as quais foram submetidas ao cultivo micológico e à extração de DNA para realização de análise por qPCR. A comparação entre testes mostrou concordância de resultados em 70% das amostras: a qPCR identificou corretamente amostras positivas em cultivo em 34% dos casos, enquanto identificou corretamente amostras negativas em cultivo em 95% dos casos. Além disso, a qPCR foi capaz de detectar dermatófitos em sete amostras negativas em cultivo. A qPCR detectou maior proporção de dermatófitos em amostras de gatos (20%) do que em amostras de cães (13%). Diferentes métodos prévios à extração de DNA (tratamento por congelamento *versus* sem tratamento) e uso de amostras com diferentes períodos entre coleta e extração de DNA (menor ou igual a um ano *versus* maior que um ano) foram comparados, observando-se que o uso de amostras frescas associado ao tratamento por congelamento prévio à extração de DNA proporcionou 64% de positividade na qPCR das amostras positivas em cultivo. Ainda, amostras de alta pureza e concentração de DNA apresentaram 82% de positividade na qPCR das amostras positivas em cultivo. A qPCR pode ser utilizada como um teste de triagem inicial prévio ao cultivo micológico. Ainda assim, a técnica molecular desenvolvida deve ser adaptada com a adição de novos métodos juntos à extração a fim de aumentar sua eficácia, podendo se tornar o método de escolha para a detecção de dermatófitos em amostras clínicas no futuro.

Palavras-chave: qPCR. PCR em tempo real. Dermatofitose. *Microsporum* spp. *Trichophyton mentagrophytes*.

ABSTRACT

Dermatophytes are responsible for the most common fungal disease in small animal veterinary practice: dermatophytosis. It is a worldwide zoonosis characterized by infection of keratinized structures such as skin, hair, fur, nails and claws. Mycological culture is the reference standard for diagnosis of this ringworm, however it requires at least 15 days for a definitive result. PCR-based diagnostic methods are high sensitivity and specificity and provide results within one to three days. The aim of this study was to perform molecular detection of dermatophytes directly from dog and cat fur samples with suspected dermatophytosis and to compare results with reference standard method. A total of 219 fur samples were collected and submitted to mycological culture and DNA extraction for qPCR analysis. Comparison between tests showed results agreement in 70% of samples: qPCR correctly identified positive samples in culture in 34% of cases; while correctly identified negative culture samples in 95% of cases. In addition, qPCR was able to detect dermatophytes in seven negative culture samples. qPCR detected a higher proportion of dermatophytes in cat (20%) than in dog (13%) samples. Different methods prior to DNA extraction (freezing treatment versus untreated) and use of samples with different periods between DNA collection and extraction (less than or equal to one year versus more than one year) were compared: use of fresh samples associated with freezing treatment prior to DNA extraction yielded 64% positivity in qPCR of positive samples in culture. Also, high purity and high amount of DNA samples yielded 82% positivity in qPCR of positive samples in culture. qPCR can be used as initial screening test prior to mycological culture. Nevertheless, this molecular technique developed must be adapted with addition of new methods together with extraction in order to increase its effectiveness and could become the method of choice for dermatophytes detection in clinical samples in future.

Keywords: qPCR. Real time PCR. Dermatophytosis. Microsporum spp. Trichophyton mentagrophytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 - Proporção dos resultados da qPCR conforme resultado do cultivo fúngico de cães e de gatos.....	27
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Ocorrência de dermatófitos em cães e em gatos com suspeita de dermatofitose em diferentes países e períodos (1956 - 2009) de acordo com a literatura.....	14
Tabela 2 -	Metodologia dos estudos baseados na identificação molecular de dermatófitos diretamente de amostras clínicas de animais (entre o período de 2000 a 2018).....	20
Tabela 3 -	Resultados da qPCR para detecção de dermatófitos em relação ao cultivo fúngico em 219 amostras de pelame de cães e de gatos.....	26
Tabela 4 -	Resultados da qPCR obtidos por realização de diferentes métodos prévios à extração de DNA em relação ao tempo entre coleta e extração de DNA em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo.....	28
Tabela 5 -	Resultados da qPCR de acordo com diferentes combinações de quantidade e qualidade de DNA em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo.....	28
Tabela 6 -	Resultado da qPCR em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo de acordo com a espécie de dermatófito isolada....	29

LISTA DE SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FaVet	Faculdade de Veterinária
HCV	Hospital de Clínicas Veterinárias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1	Dermatofitose.....	12
2.1.1	Agentes etiológicos.....	12
2.1.2	Habitat e epidemiologia.....	12
2.1.3	Patogênese.....	15
2.1.4	Sinais clínicos.....	15
2.1.5	Métodos de diagnóstico micológico convencionais.....	16
2.1.5.1	Teste com lâmpada de <i>Wood</i>	16
2.1.5.2	Exame microscópico direto do pelame.....	17
2.1.5.3	Cultivo micológico.....	17
2.1.6	Diagnóstico molecular.....	18
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	Objetivo geral.....	21
3.2	Objetivos específicos.....	21
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1	População de estudo.....	22
4.2	Número amostral mínimo.....	22
4.3	Coleta de amostras.....	22
4.4	Critérios de inclusão e de exclusão de amostras.....	22
4.5	Obtenção de dados.....	23
4.6	Cultivo micológico.....	23
4.7	Diagnóstico molecular.....	24
4.7.1	Extração de DNA.....	24
4.7.2	Avaliação de quantidade e de qualidade de DNA.....	24
4.7.3	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	24
4.8	Análise de dados.....	25
5	RESULTADOS.....	26
6	DISCUSSÃO.....	30
7	CONCLUSÕES.....	35
	REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A urbanização e a verticalização das cidades nas últimas décadas fizeram com que os animais de estimação passassem a habitar o interior dos domicílios, fato que estreitou ainda mais os laços entre humanos e animais e contribuiu para a humanização dos *pets* (IBGE, 2007). Em paralelo, o maior acesso à informação auxilia para que os tutores estejam mais atentos e cuidadosos com a saúde dos cães e dos gatos, buscando com mais frequência atendimento veterinário para o estabelecimento de diagnósticos corretos e tratamentos apropriados para seus animais (ROMANO; VALENTI; BARBARA, 1997; BORMAN *et al.*, 2007).

A dermatofitose tornou-se uma das doenças infecciosas transmissíveis de maior ocorrência em todo o mundo. Embora seu curso seja geralmente autolimitante, pode causar considerável dano à pele, ao cabelo/pelame e às unhas/garras se não for detectada e tratada. A infecção por dermatófitos nem sempre pode ser facilmente diagnosticada com base apenas nas manifestações clínicas, pois há várias outras condições que podem mimetizá-la (KIZNY GORDON *et al.*, 2016).

Os métodos de diagnóstico laboratoriais convencionais para dermatófitos incluem exame direto e cultivo do pelame, no entanto ambos os métodos possuem limitações. O exame direto é complicado pelo alto número de resultados incorretos. Já o isolamento por cultivo, considerado o teste padrão de referência, é limitado pelo atraso nos resultados, levando semanas para um crescimento adequado, o que adia o tratamento e pode resultar em crescimento excessivo de fungos contaminantes (KIZNY GORDON *et al.*, 2016), normalmente presentes no pelame de animais, que crescem mais rapidamente em cultivo (MORIELLO; DEBOER, 1991; CABAÑES *et al.*, 1996).

Métodos de identificação molecular baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) vêm crescendo no campo da micologia por possuírem elevada sensibilidade e especificidade, além de menor tempo de processamento quando comparados ao cultivo fúngico. Em medicina humana, diversas técnicas moleculares de identificação de dermatófitos em amostras clínicas vêm sendo desenvolvidas (ARABATZIS *et al.*, 2007; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA; SAUNTE; ARENDRUP, 2007; GARG *et al.*, 2007; BEIFUSS *et al.*, 2011; BRASCH; BECK-JENDROSCHEK; GLÄSER, 2011; KIM *et al.*, 2011; DHIB *et al.*, 2012; BERGMAN *et al.*, 2013; ELAVARASHI; KINDO; KALYANI, 2013; MEHLIG *et al.*, 2014; SPILIOPOULOU *et al.*, 2015; KIZNY GORDON *et al.*, 2016; SHERMAN *et al.*, 2018). Nos laboratórios de micologia

veterinária, sem dúvida, os dermatófitos seguem compondo a maior parte da casuística recebida, entretanto é menor a quantidade de estudos baseados na identificação molecular de dermatófitos diretamente de amostras clínicas de animais (CAFARCHIA *et al.*, 2013; JACOBSON; MCINTYRE; MYKUSZ, 2018; LEAL *et al.*, 2018; MORIELLO; LEUTENEGGER, 2018).

Desse modo, a busca por diagnósticos precisos e rápidos se faz necessária, sendo indispensável que os laboratórios se adequem a novas tecnologias que possam aprimorar os métodos de diagnóstico. O desenvolvimento de técnicas de isolamento de ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de cabelos, de pele e de unhas, aumentará enormemente a eficiência na identificação laboratorial dos dermatófitos (JENSEN; ARENDRUP, 2012).

O objetivo deste trabalho foi realizar a detecção molecular de dermatófitos diretamente de amostras de pelame de cães e de gatos com suspeita de dermatofitose e comparar os resultados com o método padrão de referência.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Dermatofitose

A dermatofitose é uma micose cutânea superficial causada por um grupo de fungos filamentosos septados, genericamente denominados de dermatófitos, capazes de invadir estruturas queratinizadas, como o estrato córneo da pele, o pelame, os cabelos, as unhas e as garras (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

2.1.1 Agentes etiológicos

Os agentes etiológicos da dermatofitose têm sido divididos convencionalmente em três gêneros anamórficos (imperfeitos ou assexuados), baseados na morfologia da colônia e dos macroconídios: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (QUINN *et al.*, 2011). As espécies anamórficas, quando capazes de se reproduzirem sexualmente, são classificadas dentro do gênero pleomórfico *Arthroderma* (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008).

Atualmente, um novo conceito taxonômico, baseado em análises moleculares, vem sendo apresentado por De Hoog *et al.* (2017), que propõem aumentar o número de gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Arthroderma*, *Nannizzia*, *Lophophyton*, *Ctenomyces*, *Paraphyton* e *Guarromyces*.

Ainda propõem que a dupla nomenclatura (sexual/assexual) seja abolida, e que os gêneros *Arthroderma* e *Nannizzia*, que denotam os estados sexuais dos dermatófitos, agora sejam considerados gêneros regulares, com cada espécie possuindo apenas um nome válido. Entre as espécies de dermatófitos com importância médica para cães e gatos, *Microsporum gypseum* tem nova taxonomia proposta como *Nannizzia gypsea* (HAWKSWORTH *et al.*, 2011; DE HOOG *et al.*, 2017).

No presente estudo foi utilizada a nomenclatura *M. gypseum*.

2.1.2 Habitat e epidemiologia

Os dermatófitos podem ser classificados de acordo com seu habitat e seus hospedeiros preferenciais. Dermatófitos antropofílicos estão primariamente associados a infecções em humanos e raramente infectam animais. Os zoofílicos tendem a parasitar

diversas espécies animais e ocasionalmente infectam humanos. Os geofílicos são aqueles que habitam o solo como sapróbios em associação a material queratinoso em decomposição, como pelame, penas, cascos e chifres, após se dissociarem dos animais vivos, mas podem causar infecção em humanos e animais. Os dermatófitos zoofílicos e antropofílicos são incapazes de se replicar no solo (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; QUINN *et al.*, 2011).

Existem mais de 30 espécies de dermatófitos descritas na literatura (MORIELLO *et al.*, 2017). Entre as espécies de maior ocorrência em cães e gatos estão *Microsporium canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. *Microsporium canis* e *T. mentagrophytes* são espécies zoofílicas, com *M. canis* tendendo a infectar cães e gatos e *T. mentagrophytes* diversas espécies animais. *Microsporium gypseum* é um dermatófito geofílico potencialmente infeccioso (QUINN *et al.*, 2011). O isolamento de dermatófitos antropofílicos de animais é raro, acometendo principalmente animais imunodeprimidos em contato com humanos infectados (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008).

A prevalência das dermatofitoses é variável nas diversas regiões do mundo, e até mesmo dentro de um país, devido a vários fatores, como clima, condições socioeconômicas e higiênicas, urbanização, sistema imunológico do hospedeiro, características dos fungos e ações terapêuticas. Na Tabela 1 encontram-se diversos estudos e suas respectivas ocorrências de isolamento de dermatófitos em cães e em gatos com suspeita de dermatofitose de acordo com o país e o período de realização. *Microsporium canis* é a espécie isolada com mais frequência de cães e gatos nesses estudos, compondo aproximadamente 78% do total de isolamentos. A segunda espécie mais isolada é *M. gypseum*, com 12,4% dos isolamentos, seguida por *T. mentagrophytes*, com 9,3% (LEWIS; FOIL; HOSGOOD, 1991; SPARKES *et al.*, 1993; MARCHISIO *et al.*, 1995; SCHMIDT, 1996; CABAÑES; ABARCA; BRAGULAT, 1997; PINTER *et al.*, 1999; PAIXÃO *et al.*, 2001; MANCIANTI *et al.*, 2002; BRILHANTE *et al.*, 2003; KHOSRAVI; MAHMOUDI, 2003; COPETTI *et al.*, 2006; COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES, 2008; APPELT, 2010; SEKER; DOGAN, 2011).

Tabela 1 - Ocorrência de dermatófitos em cães e em gatos com suspeita de dermatofitose em diferentes países e períodos (1956 - 2009) de acordo com a literatura.

País	Período	Cães		Gatos		Referência
		Amostras (n)	Positivas (%)	Amostras (n)	Positivas (%)	
EUA	1981-90	1824	3,8	408	14,9	LEWIS; FOIL; HOSGOOD (1991)
Reino Unido	1956-91	4942	9,6	3407	26,2	SPARKES <i>et al.</i> (1993)
Itália	1990's	98	29,6	105	50,5	MARCHISIO <i>et al.</i> (1995)
Alemanha	1993-95	95	3,2	78	11,5	SCHMIDT (1996)
Espanha	1986-95	105	14,3	56	33,9	CABAÑES; ABARCA; BRAGULAT (1997)
Croácia	1990-98	3353	15,4	1838	40,7	PINTER <i>et al.</i> (1999)
Irã	1994-98	97	8,2	186	54,8	KHOSRAVI; MAHMOUDI (2003)
Itália	1986-2000	3028	18,7	7650	24,7	MANCIANTI <i>et al.</i> (2002)
Brasil	2000's	74	17,6	18	44,4	PAIXÃO <i>et al.</i> (2001)
Brasil	2000's	189	14,3	38	36,8	BRILHANTE <i>et al.</i> (2003)
Brasil	1998-2003	1089	9,8	151	27,2	COPETTI <i>et al.</i> (2006)
Portugal	2000-06	179	8,4	47	21,3	COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES (2008)
Turquia	2006-08	198	18,7	164	20,1	SEKER; DOGAN (2011)
Brasil	1979-2009	5584	13,3	1111	33,2	APPELT (2010)

A dermatofitose é considerada a zoonose micótica mais difundida mundialmente, com os animais sendo os reservatórios dessa doença, por isso possui tamanha importância (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008).

2.1.3 Patogênese

A dermatofitose é uma doença contagiosa, a qual pode ser adquirida por meio do contato com animais e fômites infectados, no caso das espécies zoofílicas, ou por meio do solo contendo o agente, quando geofílico. As formas infecciosas dos dermatófitos são denominadas de artroconídios: estruturas resistentes, que podem persistir por anos no ambiente, formados pela fragmentação das hifas nas estruturas queratinizadas (WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; QUINN *et al.*, 2011).

Idade e raça dos animais, estação do ano, doenças concomitantes e imunossupressão podem ser fatores predisponentes à dermatofitose. Cães e gatos menores que um ano de idade apresentam maior proporção de cultivos positivos para dermatófitos. Algumas raças de cães, como yorkshire terrier, e gatos de pelame longo, como persa, parecem demonstrar uma maior predisposição à dermatofitose. Quanto à estação do ano, a dermatofitose canina e felina parece apresentar maior ocorrência nos meses do outono e do inverno. A suscetibilidade também depende do estado de saúde do animal: doenças ou tratamentos imunossupressores podem desencadear ou agravar a dermatofitose (LEWIS; FOIL; HOSGOOD, 1991; SPARKES *et al.*, 1993; CABAÑES, 2000; APPELT, 2010).

A maioria das infecções zoonóticas é causada por *M. canis*. A importância da transmissão zoonótica varia de acordo com o país e a relação entre humanos e animais de estimação, principalmente gatos, que são considerados reservatórios de *M. canis*. Em alguns países, o dermatófito zoofílico *M. canis* foi o mais isolado de amostras de casos humanos suspeitos de dermatofitose, ultrapassando até mesmo os dermatófitos antropofílicos. Ainda que, com o passar dos anos, essa relação tenha decrescido em alguns países, devido à introdução da terapia antifúngica nos animais (ROMANO; VALENTI; BARBARA, 1997; BORMAN *et al.*, 2007).

2.1.4 Sinais clínicos

A lesão clássica da dermatofitose em cães e gatos mostra-se como alopecia circular, bem delimitada, com inflamação ativa na periferia, descamação e ausência de prurido em 50% dos casos caninos e em 89% dos casos felinos (BALDA, 2016). As lesões podem ser únicas ou múltiplas, localizadas em qualquer região corporal, embora a cabeça e os membros sejam acometidos com mais frequência. As lesões apresentam

uma disseminação centrífuga, com cicatrização espontânea do centro, podendo haver repilação (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008; BOND, 2010). Apresentações incomuns da doença incluem pseudomicetoma em gatos (PEREIRA *et al.*, 2006) e quérion em cães (FERREIRA *et al.*, 2006). Por ser uma das doenças cutâneas mais frequentes em cães e gatos, e devido a sua natureza contagiosa, a dermatofitose deve ser considerada um diagnóstico diferencial em qualquer caso que apresente combinações de alopecia localizada ou difusa, eritema, pápulas, descamação e crostas (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008; BOND, 2010).

2.1.5 Métodos de diagnóstico micológico convencionais

A dermatofitose, causada por diferentes espécies de dermatófitos, não pode ser diferenciada com base nas manifestações clínicas, portanto se faz necessária a realização de métodos de diagnóstico laboratorial (LIU *et al.*, 2000). A técnica da lâmpada de *Wood* e o exame microscópico direto do pelame e das escamas são testes rápidos e baratos, mas o cultivo fúngico permanece o método de referência para o diagnóstico da doença, enquanto a biópsia pode ser útil em apresentações incomuns (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008). Uma combinação dos métodos diagnósticos é necessária para uma maior acurácia do resultado (BOND, 2010).

2.1.5.1 Teste com lâmpada de *Wood*

O exame com a lâmpada de *Wood* funciona como um teste de triagem inicial para detecção da dermatofitose causada por *M. canis*. O pelame fluorescente deve ser coletado para realização de exame direto e de cultivo (FERREIRO *et al.*, 2016). Entre os dermatófitos de importância veterinária, apenas a infecção por *M. canis* induz uma fluorescência de coloração verde-maçã no pelame infectado, logo um diagnóstico de dermatofitose não pode ser descartado se o exame da lâmpada de *Wood* não for positivo e, ainda assim, o exame direto e o cultivo devem ser realizados (BOND, 2010). A fluorescência ocorre devido à interação entre a luz ultravioleta e o aminoácido triptofano produzido por alguns isolados de *M. canis* quando infecta o pelame (FERREIRO *et al.*, 2016). A fluorescência é observada em aproximadamente 50% dos casos de dermatofitose por *M. canis* (SPARKES *et al.*, 1993).

Falsos resultados podem ser obtidos quando houver: escamas infectadas (que não são fluorescentes), quebra de pelame infectado, uso de tratamentos tópicos que inibem a fluorescência ou pelame invadido por uma espécie de dermatófito diferente de *M. canis*. Por essas razões, os resultados do exame com a lâmpada de *Wood* devem ser confirmados por exame microscópico direto e cultivo micológico do pelame (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008).

2.1.5.2 Exame microscópico direto do pelame

O exame microscópico direto do pelame visa detectar a presença de arthroconídios e hifas na situação de parasitismo pilar. Os arthroconídios são formas infecciosas, que se apresentam no pelame infectado em aglomerados ou cadeias de hifas fragmentadas (FERREIRO *et al.*, 2016).

As amostras devem ser obtidas ao avulsionar o pelame ou por meio de raspado da periferia de lesões circulares quando a lesão está ativa, ou de toda lesão quando tal distinção não for visível (BOND, 2010). A iluminação com lâmpada de *Wood* pode guiar a coleta de pelame infectado por *M. canis* (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008). A amostra é, então, montada em lâmina com uma solução de clareamento, como hidróxido de potássio em concentração de 10%. A rapidez do diagnóstico no exame microscópico direto do pelame permite que os métodos de tratamento, prevenção e controle sejam iniciados, sem o atraso associado ao cultivo fúngico. No entanto, a realização desse exame requer treinamento do observador, logo a não visualização de arthroconídios ou hifas não exclui o diagnóstico positivo (BOND, 2010). Além disso, a presença de artefatos faz com que esse teste apresente grande número de resultados falso-positivos (KIZNY GORDON *et al.*, 2016).

2.1.5.3 Cultivo micológico

O cultivo micológico continua sendo o teste padrão de referência para o diagnóstico da dermatofitose animal e, entre os métodos anteriormente citados, é o único capaz de identificar as espécies de dermatófitos. A identificação permite que o clínico considere a fonte provável do dermatófito para controle e prevenção subsequentes de animais em contato (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008; FERREIRO *et al.*, 2016).

Diferentes meios de cultivo são comercializados ou preparados em laboratório para o isolamento de dermatófitos, sendo rotineiramente usado ágar *Sabouraud* dextrosado suplementado com cicloheximida (antifúngico utilizado para inibir o crescimento de fungos contaminantes) e fármacos antimicrobianos, como cloranfenicol. O uso de placas de *Petri* para o cultivo, no lugar de tubos, é preferencial na prática veterinária, devido à possibilidade de crescimento de fungos sapróbios presentes no pelame. Amostras obtidas a partir da margem ativa de lesões permitirão melhores resultados para o crescimento fúngico (CHERMETTE; FERREIRO; GUILLOT, 2008; FERREIRO *et al.*, 2016).

A identificação da espécie é realizada por meio da avaliação fenotípica do dermatófito, levando em consideração as características macroscópicas e microscópicas do fungo. São analisadas a pigmentação do verso e do anverso, a topografia, a textura e a velocidade de crescimento da colônia, além do formato dos macroconídios e dos microconídios (FERREIRO *et al.*, 2016).

No entanto, o isolamento de dermatófitos em cultivo é um exame que requer um demorado tempo de processamento (aproximadamente duas semanas), e sua identificação/deteção é frequentemente complicada pelo crescimento de outros fungos contaminantes, como, por exemplo, fungos do gênero *Alternaria*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Scopularopsis* e *Rhizopus*, normalmente presentes no pelame de animais (CAFARCHIA *et al.*, 2009; DĄBROWSKA; DWORECKA-KASZAK; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, 2014).

2.1.6 Diagnóstico molecular

A fim de melhorar a eficácia do diagnóstico, métodos moleculares têm sido pesquisados com o intuito de introduzir sua utilização na rotina de diagnóstico laboratorial. Eles apresentam grande potencial de identificar corretamente uma diversidade de microrganismos, tal como qualquer tipo de fungo em qualquer área no campo da micologia (DIAL, 2007).

As principais vantagens dos métodos moleculares baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR) são sensibilidade e especificidade elevadas e, com o desenvolvimento de novas técnicas de PCR em tempo real (qPCR), a rapidez (DIAL, 2007). Em relação ao tempo necessário para o estabelecimento do diagnóstico, a PCR possui notável vantagem em relação às técnicas convencionais baseadas nos cultivos *in*

vitro (embora a maioria dos dermatófitos possa ser identificada entre 10 a 15 dias, alguns resultados podem requerer um tempo maior). Um método rápido de extração de DNA de dermatófitos permite a sua obtenção em cerca de uma hora, enquanto a amplificação e a detecção dos produtos da PCR são concluídas dentro de quatro horas. Portanto, um resultado definitivo poderá ser fornecido em apenas um dia. Além disso, a PCR fornece um resultado mais preciso do que os métodos convencionais, porque avalia características genotípicas. Uma vantagem suplementar da PCR é que ela não requer organismos viáveis para os testes (FERREIRO *et al.*, 2016).

Diversas técnicas baseadas em PCR vêm sendo aplicadas com o objetivo de detectar dermatófitos diretamente de amostras clínicas de pacientes humanos. A PCR convencional possui como vantagem o menor custo e tem como alvo os dermatófitos ao utilizar iniciadores universais denominados pan-dermatófitos (LITZ; CAVAGNOLO, 2010; DHIB *et al.*, 2012) ou iniciadores da espécie que comumente causa doença (BRASCH; BECK-JENDROSCHEK; GLÄSER, 2011). Enquanto isso, a PCR multiplex identifica simultaneamente mais de uma espécie de dermatófito, podendo associar pan-dermatófito a iniciadores de uma ou mais espécies (BRILLOWSKA-DĄBROWSKA; SAUNTE; ARENDRUP, 2007; KONDORI *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2011; CHANDRAN *et al.*, 2013; SPILIOPOULOU *et al.*, 2015) ou iniciadores de espécies de dermatófitos com espécies não-dermatofíticas e leveduras (MEHLIG *et al.*, 2014). A qPCR é menos laboriosa e capaz de identificar diversas espécies simultaneamente (ARABATZIS *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2011; WISSELINK; VAN ZANTEN; KOOISTRA-SMID, 2011; BERGMAN *et al.*, 2013; MIYAJIMA *et al.*, 2013; PAUGAM *et al.*, 2013; KIZNY GORDON *et al.*, 2016; SHERMAN *et al.*, 2018). As técnicas pós-PCR, como *Nested-PCR* (GARG *et al.*, 2007; EBIHARA *et al.*, 2009; GARG *et al.*, 2009; UCHIDA *et al.*, 2009; VERRIER *et al.*, 2013), PCR-ELISA (BEIFUSS *et al.*, 2011; PANKEWITZ *et al.*, 2013), PCR-RFLP (ELAVARASHI; KINDO; KALYANI, 2013) e microarranjo de DNA (SATO *et al.*, 2010) aumentam o número de espécies detectadas, no entanto prolongam o tempo de diagnóstico.

Em comparação a estudos em humanos, é menor a quantidade de estudos baseados na identificação molecular de dermatófitos diretamente de amostras clínicas de animais, embora os últimos anos mostrem avanços nos estudos das técnicas moleculares, como apresentado pela Tabela 2.

Tabela 2. Metodologia dos estudos baseados na identificação molecular de dermatófitos diretamente de amostras clínicas de animais (entre o período de 2000 a 2018).

N amostral	Espécies	Amostras clínicas	Dermatófitos identificados	Técnica molecular	Referência
4	Cães	Pelame e crostas	<i>M. canis</i>	PCR	KANO <i>et al.</i> (2000)
7	Cães, gatos e coelho	Pelame e crostas	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	PCR	KANO <i>et al.</i> (2003)
15	Coelhos	Pelame, crostas e exsudato	<i>Arthroderma vanbreuseghemii</i>	PCR-RFLP	ARABATZIS <i>et al.</i> (2006)
9	Gatos e equinos	Tecido embebido em parafina	<i>M. canis</i>	PCR	NARDONI; FRANCESCHI; MANCIANTI (2007)
183	Cães e gatos	Pelame	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> , <i>T. terrestre</i> e <i>T. interdigitale</i>	One Step PCR e Nested-PCR	CAFARCHIA <i>et al.</i> (2013)
250	Cães e gatos	Pelame e/ou crostas	<i>M. canis</i> , <i>M. gypseum</i> e <i>T. mentagrophytes</i>	Multiplex PCR	LEAL <i>et al.</i> (2018)
132	Gatos	Pelame	<i>M. canis</i>	qPCR	JACOBSON; MCINTYRE; MYKUSZ (2018)
52	Gatos	Pelame e crostas	<i>M. canis</i> e <i>Trichophyton spp.</i>	qPCR	MORIELLO; LEUTENEGGER (2018)

No entanto, devido à alta sensibilidade dessas técnicas, a contaminação das amostras e a subsequente notificação de resultados falso-positivos é uma grande preocupação dentro do laboratório. Desse modo, práticas laboratoriais padronizadas e controle de qualidade são necessários para garantir resultados precisos. Além disso, amostras biológicas, em comparação com cultivos puros, podem conter substâncias inibidoras que podem causar resultados falso-negativos. Os iniciadores específicos usados na PCR podem amplificar regiões não-alvo do DNA, levando a resultados difíceis de interpretar (DIAL, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi realizar a detecção molecular de dermatófitos por meio de qPCR diretamente de amostras de pelame de cães e de gatos com suspeita de dermatofitose e comparar os resultados com o método de referência.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Comparar os resultados entre cultivo e qPCR obtidos por diferentes métodos prévios à extração de DNA da amostra (tratamento por congelamento *versus* sem tratamento);
- Comparar os resultados entre cultivo e qPCR obtidos com diferentes períodos entre coleta e extração de DNA da amostra (menor ou igual a um ano *versus* maior que um ano);
- Comparar os resultados entre cultivo e qPCR de amostras com diferentes níveis de pureza e de concentração de DNA;
- Identificar as espécies e a frequência dos dermatófitos isolados por cultivo segundo resultado na qPCR.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 População de estudo

A população alvo foi composta por cães e gatos apresentando lesões cutâneas suspeitas de dermatofitose atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias (HCV) da Faculdade de Veterinária (FaVet) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e em clínicas particulares da região metropolitana de Porto Alegre-RS durante o período de 2006 a 2019.

4.2 Número amostral mínimo

O número amostral mínimo foi calculado considerando uma população infinita de gatos, uma prevalência esperada de 16,6% de isolamento de dermatófitos em cães e gatos com suspeita de dermatofitose, nível de confiança de 95% e erro ∞ de 5%, resultando em uma amostra mínima de 213 amostras de pelame.

4.3 Coleta de amostras

As amostras de pelame de cães e de gatos foram coletadas por médicos-veterinários e enviadas ao laboratório de micologia da FaVet-UFRGS para fins diagnósticos.

Amostras positivas no cultivo que se encontravam armazenadas no laboratório em envelopes de papel em temperatura ambiente provenientes dos anos de 2006 a 2016 foram incluídas no estudo, as quais foi verificado o registro da espécie isolada em cultivo micológico, e parte do pelame se destinou a extração de DNA e reação de qPCR.

Novas amostras de pelame recebidas entre 2017 a 2019 foram divididas em duas porções: uma para cultivo micológico e outra para extração de DNA e reação de qPCR.

4.4 Critérios de inclusão e de exclusão de amostras

Foram incluídas no estudo amostras positivas no cultivo armazenadas no laboratório de micologia da FaVet-UFRGS provenientes de 2006 a 2016 que possuíam informação sobre a espécie de dermatófito isolada e que tinham quantidade de pelame

suficiente para realização de qPCR. Amostras que não possuíam quantidade suficiente de pelame para realização de qPCR foram excluídas do estudo.

Foram incluídas no estudo amostras de cães e de gatos com suspeita de dermatofitose recebidas entre 2017 a 2019, que tiveram quantidade suficiente de pelame para realização de cultivo micológico e de qPCR. Amostras que não tiveram quantidade suficiente de pelame para avaliação por meio desses métodos diagnósticos foram excluídas do estudo.

4.5 Obtenção de dados

Dados de identificação e histórico dos animais disponíveis na ficha de requisição de exame micológico, tais como espécie, raça, sexo, idade, histórico clínico e tratamento antifúngico prévio, foram tabulados e posteriormente analisados utilizando o programa *Excel*.

4.6 Cultivo micológico

Todas as amostras de pelame foram semeadas em placas contendo meio ágar *Sabouraud* dextrosado acrescido de cloranfenicol e cicloheximida, acondicionadas em estufa em temperatura constante de 25 °C a 27 °C. A placa com meio de cultivo semeado foi observada durante um período médio de 15 dias, podendo esse tempo ser estendido em casos de crescimento fúngico lento. As placas que apresentaram crescimento fúngico foram avaliadas quanto às características macromorfológicas e micromorfológicas das colônias presentes, visando à determinação da espécie de dermatófito envolvida. Nas características micromorfológicas do gênero *Microsporum* são observados macroconídios multisseptados de parede rugosa, com os da espécie *M. canis* em formato fusiforme com parede grossa e os da espécie *M. gypseum* em forma de canoa com parede fina. Já na espécie *T. mentagrophytes* são observados macroconídios multisseptados de parede lisa e fina em forma de charuto, além de microconídios e hifas espiraladas.

4.7 Diagnóstico molecular

O diagnóstico molecular foi realizado a partir da extração de DNA diretamente do pelame dos cães e dos gatos com suspeita de dermatofitose, com posterior análise por qPCR.

4.7.1 Extração de DNA

A porção das amostras de pelame destinadas à análise por qPCR foi fragmentada com auxílio de tesoura e pinça estéreis e, então, acondicionada em tubo estéril do tipo *Eppendorf* de 2 mL com adição de cinco esferas metálicas estéreis de 3 mm de diâmetro. Uma parte dessas amostras foi congelada a 20 °C negativos por no mínimo oito horas e submetidas a agitador de tubos (etapa repetida por pelo menos três vezes por amostra). O restante das amostras não passou por processo prévio de congelamento. Para a extração, foi utilizado *DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)*, conforme instruções do fabricante, com eluição final das amostras de DNA em 100 µL.

4.7.2 Avaliação de quantidade e de qualidade de DNA

O produto final da extração foi avaliado quanto à quantidade e à qualidade do DNA por meio de espectrofotometria, com o espectrofotômetro *NanoDrop Lite (Thermo Scientific)*.

4.7.3 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

As reações da qPCR foram desenvolvidas nos equipamentos de qPCR 7300 da *Applied Biosystems*, com volume final de reação de 25 µL, utilizando-se os reagentes e o protocolo do *Kit SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Groningen, The Netherlands)*. Para a identificação molecular foram utilizados iniciadores universais para dermatófitos panDerm1 (5'- GAA GAA GAT TGT CGT TTG CAT CGT CTC - 3') e panDerm2 (5'- CTC GAG GTC AAA AGC ACG CCA GAG -3'), previamente descritos (BRILLOWSKA-DĄBROWSKA; SAUNTE; ARENDRUP, 2007). As condições de ciclagem foram: um ciclo de 50 °C por dois minutos e 95 °C por três minutos, seguido de 45 ciclos de 95 °C por 20 segundos, 57 °C por 20 segundos e 65 °C

por 30 segundos. Após a ciclagem, seguiu-se a extensão final de 72 °C por cinco minutos e curva de dissociação (*melting curve*) de acordo com o protocolo padrão (*default*) dos equipamentos.

4.8 Análise de dados

Foi realizada uma análise descritiva, por meio da distribuição de frequências absoluta e relativa (representada por tabelas e gráficos) dos resultados da qPCR em relação às variáveis contidas no banco de dados no programa *Excel*.

5 RESULTADOS

Um total de 219 amostras foi obtido, sendo que 46% (n= 100) pertenceram a cães e 54% (n= 119) a gatos, com idade média dos animais de seis anos. Quanto ao sexo, obteve-se uma proporção de 36% machos (n= 78) e 37% fêmeas (n=82), sendo que 27% (n= 59) não tiveram o sexo informado. Quanto à raça, 44% (n= 97) dos animais eram de raças variadas (sendo que 10% [n= 22] pertenciam à raça yorkshire terrier e 11% [n= 25] à raça persa), 33% (n= 72) não possuíam raça definida e 23% (n= 50) não tiveram a raça informada.

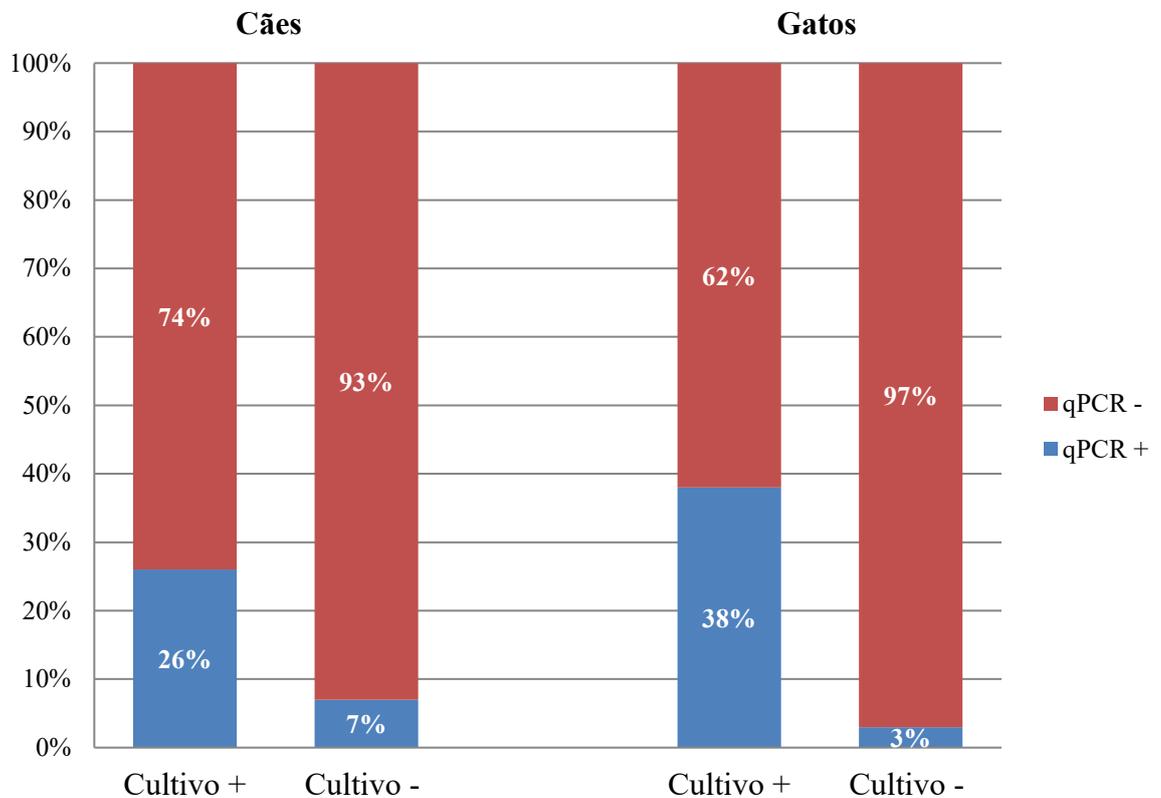
Do total de amostras, houve 70% de concordância entre os resultados de qPCR e de cultivo. Os resultados da qPCR para detecção de dermatófitos em relação ao cultivo fúngico estão descritos na Tabela 3, enquanto a proporção dos resultados da qPCR conforme resultado no cultivo de cães e de gatos foi demonstrada no Gráfico 1.

Tabela 3. Resultados da qPCR para detecção de dermatófitos em relação ao cultivo fúngico em 219 amostras de pelame de cães e de gatos.

qPCR	Cultivo		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	30 (14%)	7 (3%)	37 (17%)
Negativo	59 (27%)	123 (56%)	182 (83%)
Total	89 (41%)	130 (59%)	219 (100%)

No total de amostras negativas em cultivo e positivas na qPCR, foi constatado um caso de crescimento de colônias contaminantes ambientais no meio de cultivo.

Gráfico 1. Proporção dos resultados da qPCR conforme resultado do cultivo fúngico de cães e de gatos.



Para fins de comparação, 116 amostras de pelame foram submetidas a tratamento por congelamento prévio à extração de DNA, enquanto o restante (n= 103) não foi submetido a esse processo. Os pelames positivos ao cultivo que se encontravam armazenados no laboratório provenientes dos anos de 2006 a 2016 (n= 35) levaram mais de um ano entre coleta e realização de extração de DNA da amostra. Novas amostras de pelame recebidas entre 2017 a 2019 (n= 184) levaram um ano ou menos entre coleta e realização de extração de DNA da amostra. Combinações dos diferentes métodos realizados, ou seja, dos dois métodos prévios à extração de DNA (amostras submetidas a congelamento prévio à extração de DNA em comparação a amostras que não passaram por esse processo) com diferentes tempos entre coleta e extração de DNA (intervalo menor ou igual a um ano em comparação a intervalo maior que um ano), forneceram diferentes resultados na qPCR em amostras positivas em cultivo (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados da qPCR obtidos por realização de diferentes métodos prévios à extração de DNA em relação ao tempo entre coleta e extração de DNA em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo.

Tempo entre coleta e extração de DNA das amostras	Protocolo de extração de DNA das amostras com prévio tratamento por congelamento				Total
	Sim		Não		
	qPCR positiva	qPCR negativa	qPCR positiva	qPCR negativa	
≤ 1 ano	14/22 (64%)	8/22 (36%)	7/32 (22%)	25/32 (78%)	54 (60%)
> 1 ano	8/28 (29%)	20/28 (71%)	1/7 (14%)	6/7 (86%)	35 (40%)
Total	50 (56%)		39 (44%)		89 (100%)

Diferentes combinações entre quantidade e qualidade de DNA (demonstrada por meio da relação de absorvância a 260 nm/280 nm) forneceram diferentes resultados na qPCR em amostras positivas em cultivo (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados da qPCR de acordo com diferentes combinações de quantidade e qualidade de DNA em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo.

Relação A260/A280*	Quantificação				Total
	< 10 ng/μL		≥ 10 ng/μL		
	qPCR positiva	qPCR negativa	qPCR positiva	qPCR negativa	
≤ 1,39	3/19 (16%)	16/19 (84%)	z	z	19 (21%)
1,4 – 2,0	9/45 (20%)	36/45 (80%)	18/22 (82%)	4/22 (18%)	67 (75%)
≥ 2,1	z	3/3 (100%)	z	z	3 (4%)
Total	67 (75%)		22 (25%)		89 (100%)

*A260/280= relação de absorvância a 260 nm/280 nm.

z= zero

A espécie de dermatófito isolada com mais frequência em cultivo foi *M. canis*, totalizando 93% dos isolamentos, seguida por *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, com 3,5% dos isolamentos cada. Os resultados da qPCR nas amostras positivas em cultivo de acordo com as espécies de dermatófitos isoladas encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Resultado da qPCR em amostras de pelame de cães e de gatos positivas em cultivo de acordo com a espécie de dermatófito isolada.

qPCR	Espécie de dermatófito isolada em cultivo			Total
	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	
Positivo	26 (29%)	2 (2,5%)	2 (2,5%)	30 (34%)
Negativo	57 (64%)	1 (1%)	1 (1%)	59 (66%)
Total	83 (93%)	3 (3,5%)	3 (3,5%)	89 (100%)

6 DISCUSSÃO

Estudos com amostras obtidas de humanos que compararam cultivo fúngico de dermatófitos (em associação ou não ao exame direto) e qPCR mostraram uma excelente concordância de resultados, com proporção de resultados positivos superiores pelo método molecular (ARABATZIS *et al.*, 2007; BERGMANS *et al.*, 2010; ALEXANDER *et al.*, 2011; WISSELINK; VAN ZANTEN; KOOISTRA-SMID, 2011; BERGMAN *et al.*, 2013; MIYAJIMA *et al.*, 2013; PAUGAM *et al.*, 2013; KIZNY GORDON *et al.*, 2016; OHST; KUPSCH; GRÄSER, 2016; SHERMAN *et al.*, 2018). Igualmente, em estudos com amostras obtidas de animais, os resultados provenientes de técnicas moleculares mostraram alta concordância (94% em média) entre método molecular e de referência ou, ainda, boa acurácia, com valores de sensibilidade variando de 71,2% a 100% e de especificidade de 88,5% a 97,4% (CAFARCHIA *et al.*, 2013; JACOBSON; MCINTYRE; MYKUSZ, 2018; LEAL *et al.*, 2018; MORIELLO; LEUTENEGGER, 2018). No presente estudo, a qPCR apresentou concordância com o cultivo em 70% das amostras, isto é, a qPCR identificou corretamente amostras positivas em cultivo em 34% dos casos, enquanto identificou corretamente amostras negativas em cultivo em 95% dos casos. Além disso, a qPCR foi capaz de identificar dermatófitos em sete amostras negativas em cultivo.

A diferença de resultados entre qPCR e cultivo pode ser explicada pela carga ou distribuição esparsa e desigual de artroconídios presentes nas duas subamostras de pelame, fazendo com que os resultados nos dois testes fossem distintos. Além disso, uma quantidade limitada de amostra utilizada em testes moleculares e diferentes protocolos de extração e de amplificação de DNA podem afetar a capacidade de detecção do teste (OHST; KUPSCH; GRÄSER, 2016; NILSSON *et al.*, 2019).

Outra provável explicação para esse resultado deve-se à parede celular fúngica particularmente robusta, que impede a liberação de material de DNA para detecção (JENSEN; ARENDRUP, 2012; KIZNY GORDON *et al.*, 2016). Uma extração de DNA bem-sucedida requer um procedimento capaz de romper a rígida parede celular fúngica e lidar com os inibidores de PCR associados a amostras clínicas. Diferentes abordagens podem ser aplicadas, como maceração manual das amostras, agitação com esferas metálicas, congelamento e descongelamento, extração manual tradicional com fenol-clorofórmio ou com o uso de *kits* comerciais, extração automatizada, digestão durante a noite, uso de proteinase K, entre outros métodos (JENSEN; ARENDRUP, 2012).

No trabalho de Uchida *et al.* (2009), amostras de unhas mostraram maior proporção de positividade na análise por PCR em comparação a amostras de escamas cutâneas. Eles atribuíram isso ao fato de que amostras de unha puderam ser esmagadas mais facilmente do que as partículas de pele com o triturador mecânico devido a sua maior dureza, facilitando a extração de DNA. Contratempo também encontrado no presente estudo, no qual as amostras de pelame foram de difícil maceração.

A qPCR detectou maior proporção de dermatófitos em amostras de gatos do que em amostras de cães, ao contrário dos achados de Cafarchia *et al.* (2013), que encontraram menor sensibilidade nos testes de *One-step-PCR* e *Nested-PCR* para gatos, e atribuíram a provável menor quantidade de DNA fúngico nas amostras de gatos, relacionada a autolambedura. No entanto, no presente estudo, observou-se que os gatos possuíam um tipo de pelame mais fácil de ser manipulado/macerado durante o processo de extração de DNA.

A literatura cita diferentes protocolos para extração de DNA fúngico, tanto de amostras clínicas, como de colônias (JENSEN; ARENDRUP, 2012). No presente estudo, fez-se uma combinação entre o tempo de coleta da amostra e a extração de DNA em associação ou não ao prévio tratamento por congelamento das amostras para avaliação dos resultados. Observou-se que 64% das amostras positivas no cultivo também foram positivas na qPCR quando o tempo entre coleta da amostra e extração de DNA foi menor que um ano, associado ao tratamento por congelamento prévio à extração de DNA. Trabalhos anteriores já propuseram uma etapa de congelamento prévio à extração de DNA diretamente de amostras clínicas ao submeterem amostras de unhas, de escamas epidérmicas e de cabelos congeladas em nitrogênio líquido à maceração (GARG *et al.*, 2007, 2009; UCHIDA *et al.*, 2009) e, além disso, realizaram o congelamento e o descongelamento das amostras repetidamente durante a etapa de digestão na extração de DNA (GARG *et al.*, 2007, 2009). No presente estudo, as amostras foram congeladas a 20 °C negativos e maceradas repetidas vezes por meio do movimento de esferas metálicas em agitador de tubos, o que se mostrou eficaz na extração de DNA dos artroconídios presentes no pelame com conseqüente maior positividade na qPCR em comparação aos outros métodos de extração avaliados.

No entanto, mesmo passando por tratamento prévio por congelamento, o grupo de amostras com cultivo positivo, que possuía um intervalo maior que um ano entre coleta e extração de DNA, mostrou 29% de positividade na qPCR. Apesar de isolados fúngicos permanecerem viáveis por longos períodos se bem conservados, amostras

clínicas obtidas de pacientes com dermatofitose normalmente contêm quantidades muito menores do agente fúngico, que estão presentes em meio a outros microrganismos e envoltos em material queratinoso. A razão mais provável para não se detectar DNA fúngico após o armazenamento deve-se à deterioração genômica dependente do tempo ou da temperatura das amostras armazenadas. Além disso, a perda da capacidade de detecção por PCR está associada principalmente ao iniciador pan-dermatófito, sugerindo que a sequência alvo, isto é, o fragmento de DNA que codifica a quitina sintetase-1, pode ser mais vulnerável ao armazenamento (NILSSON *et al.*, 2019).

Os grupos de amostras com cultivo positivo que não passaram pelo tratamento prévio por congelamento apresentaram 22% de positividade na qPCR quando o intervalo entre coleta do pelame e extração de DNA foi menor que um ano, e 14% de positividade na qPCR quando o intervalo entre coleta do pelame e extração do DNA foi maior que um ano, sugerindo que o congelamento prévio é uma importante etapa para obter uma extração de DNA mais eficaz.

É comum que amostras de ácido nucleico sejam contaminadas com outras moléculas, como proteínas, compostos orgânicos ou outros contaminantes. O benefício da utilização de análise por espectrofotometria é a capacidade de determinar a pureza da amostra usando o cálculo da razão da absorbância a 260 nm/280 nm. Valores entre 1,4 e 2,0 indicam pureza adequada das extrações de DNA, enquanto valores abaixo de 1,4 podem significar a presença de proteínas ou outros contaminantes (NONOHAY; HEPP, 2017). Podem, ainda, razões imprecisas ser encontradas em concentrações muito baixas (menor que 10 ng/μL) de ácidos nucleicos (THERMO SCIENTIFIC, 2012). Neste estudo, foi encontrado 82% de positividade na qPCR em amostras positivas em cultivo quando a pureza de DNA apresentou valores entre 1,4 e 2,0 associada a uma quantificação de DNA maior que 10 ng/μL, demonstrando, novamente, a importância que a extração adequada de DNA possui para fornecer resultados de qPCR confiáveis.

Cabe ressaltar que a extração de DNA realizada diretamente de amostras clínicas envolve a extração do DNA total da amostra, ou seja, não apenas o DNA do dermatófito presente na amostra será extraído, mas também DNA animal e de outros microrganismos. Assim, amostras que possuem quantidade de DNA inferiores a 10 ng/μL (maioria dos casos neste estudo) podem conter valores ainda menores de DNA dermatofítico, podendo levar a uma hibridização cruzada, inibição da reação (GRÄSER; CZAIKA; OHST, 2012) ou ficar abaixo do limite de detecção do teste (OHST; KUPSCH; GRÄSER, 2016; NILSSON *et al.*, 2019).

A espécie de dermatófito mais isolada de cães e gatos com suspeita de dermatofitose é *M. canis*, com algumas variações entre países e períodos, seguida pelo isolamento de outras espécies, incluindo *M. gypseum* e *T. mentagrophytes* (LEWIS; FOIL; HOSGOOD, 1991; SPARKES *et al.*, 1993; MARCHISIO *et al.*, 1995; SCHMIDT, 1996; CABAÑES; ABARCA; BRAGULAT, 1997; PINTER *et al.*, 1999; PAIXÃO *et al.*, 2001; MANCIANTI *et al.*, 2002; BRILHANTE *et al.*, 2003; KHOSRAVI; MAHMOUDI, 2003; COPETTI *et al.*, 2006; COELHO; ALEGRIA; RODRIGUES, 2008; APPELT, 2010; SEKER; DOGAN, 2011). Corroborando os estudos anteriores, no presente estudo houve isolamento de *M. canis* em 83 amostras, seguido pelo mesmo número de isolamentos de *M. gypseum* (n= 3) e *T. mentagrophytes* (n= 3), com todas as espécies detectadas na qPCR.

O achado de outras espécies fúngicas em cultivo em um cenário de suspeita de dermatofitose pode ser enganador. No caso em que fungos não-dermatófitos cresceram em cultivo, enquanto a qPCR detectou um dermatófito, presumivelmente ocorreu uma contaminação ou invasão secundária por essas espécies, que inibem o crescimento de dermatófitos (OHST; KUPSCH; GRÄSER, 2016; SHERMAN *et al.*, 2018).

Nos seis casos em que não houve crescimento fúngico no cultivo, mas que a qPCR detectou a presença de dermatófito, revelam a existência de elementos fúngicos não detectáveis por cultivo (NILSSON *et al.*, 2019), provavelmente devido à presença de material fúngico não viável em amostras ou ao fato de que os cultivos fúngicos ainda não eram positivos no momento da sua leitura (CAFARCHIA *et al.*, 2013).

Tratamentos antifúngicos, muitas vezes usados sem prescrição médica, tornam o dermatófito inviável em alguns casos, não sendo possível seu isolamento em cultivo. Os métodos moleculares são capazes de detectar elementos fúngicos inibidos pelo uso de medicações antifúngicas (KIZNY GORDON *et al.*, 2016; OHST; KUPSCH; GRÄSER, 2016). No presente estudo, não houve registro de animal com cultivo negativo, que apresentasse resultado positivo na qPCR, em uso de antifúngico. No entanto, esse número pode não representar a realidade, já que em muitos casos as fichas de requisição de exame enviadas ao laboratório não possuem informações completas sobre o tratamento em uso pelo paciente.

Segundo Cafarchia *et al.* (2013), métodos moleculares podem ser usados rotineiramente como um meio de monitorar a efetividade do tratamento e detectar portadores persistentes de dermatófitos. No entanto, Jacobson, McIntyre e Mykusz (2018) propõem continuar com a recomendação de considerar um animal curado

micologicamente após dois cultivos negativos, até que haja mais dados disponíveis, pois o uso rotineiro da PCR para determinar a cura micológica pode resultar em maior duração do tratamento para muitos animais, já que a qPCR possui capacidade de identificar cargas fúngicas muito pequenas, que podem ser baixas para causar doença, bem como identificar uma contaminação da amostra em um ambiente de abrigo de animais ou a presença de organismos mortos durante o tratamento.

7 CONCLUSÕES

A qPCR apresentou concordância com o cultivo em 70% das amostras, isto é, a qPCR identificou corretamente amostras positivas em cultivo em 34% dos casos, enquanto identificou corretamente amostras negativas em cultivo em 95% dos casos, sendo capaz de identificar dermatófitos em sete amostras negativas em cultivo.

A qPCR detectou maior proporção de dermatófitos em amostras de gatos do que em amostras de cães: resultado atribuído ao tipo de pelame dos gatos, que foi mais fácil de ser manipulado/macerado durante o processo de extração de DNA.

A qPCR detectou maior proporção de dermatófitos quando realizado o tratamento das amostras por congelamento prévio à extração de DNA. Ao mesmo tempo em que detectou maior proporção de dermatófitos quando o tempo entre coleta da amostra e extração de DNA foi menor que um ano. Concluindo que o uso de amostras frescas e a adição de métodos juntos à extração de DNA, com o objetivo de otimizar sua eficácia, aumentaram a capacidade de detecção de dermatófitos pela qPCR, demonstrando a importância de fatores prévios à realização da qPCR, que podem afetar seu resultado.

A qPCR detectou maior proporção de dermatófitos em amostras com altos níveis de pureza e concentração de DNA, demonstrando a importância que a extração adequada de DNA possui para fornecer resultados de qPCR confiáveis.

A espécie de dermatófito mais isolada em cultivo foi *M. canis* – espécie predominantemente isolada de cães e gatos em vários países – seguida por *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*.

O tempo para diagnóstico foi significativamente reduzido de 15 dias (cultivo) para três dias (qPCR).

No momento, a qPCR pode ser utilizada como um teste de triagem inicial prévio ao método diagnóstico de referência (cultivo fúngico). As amostras que chegarem para diagnóstico em laboratório podem ser submetidas a qPCR e um resultado positivo deve ser reportado. Caso a qPCR forneça resultado negativo, deve-se proceder com o método de referência de diagnóstico micológico.

A técnica molecular desenvolvida ainda deve ser adaptada com a adição de novos métodos juntos a extração a fim de aumentar sua eficácia, podendo se tornar o método de escolha para a detecção de dermatófitos em amostras clínicas no futuro.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDER, C. L. *et al.* Introduction of a dermatophyte polymerase chain reaction assay to the diagnostic mycology service in Scotland. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 164, n. 5, p. 966–972, may 2011.
- APPELT, C. E. *Estudo retrospectivo das dermatofitoses diagnosticadas em cães e gatos em Porto Alegre, RS, Brasil, no período de 1979 a 2009*. Orientador: Laerte Ferreira. 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.
- ARABATZIS, M. *et al.* Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 157, n. 4, p. 681–689, oct. 2007.
- ARABATZIS, M. *et al.* Rapid detection of *Arthroderma vanbreuseghemii* in rabbit skin specimens by PCR-RFLP. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 17, n. 5, p. 322–326, oct. 2006.
- BALDA, A. C. Dermatofitose. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. (ed.). *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária*. 1. ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2016. cap. 14, p. 243–265.
- BEIFUSS, B. *et al.* Direct detection of five common dermatophyte species in clinical samples using a rapid and sensitive 24-h PCR-ELISA technique open to protocol transfer. *Mycoses*, Berlin, v. 54, n. 2, p. 137–145, mar. 2011.
- BERGMAN, A. *et al.* Fast and specific dermatophyte detection by automated DNA extraction and real-time PCR. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Paris, v. 19, n. 4, p. E205-211, apr. 2013.
- BERGMANS, A. M. C. *et al.* Evaluation of a single-tube real-time PCR for detection and identification of 11 dermatophyte species in clinical material. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Paris, v. 16, n. 6, p. 704–710, june 2010.
- BOND, R. Superficial veterinary mycoses. *Clinics in Dermatology*, New York, v. 28, n. 2, p. 226–236, mar. 2010.
- BORMAN, A. M. *et al.* Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Medical Mycology*, Oxford, v. 45, n. 2, p. 131–141, mar. 2007.
- BRASCH, J.; BECK-JENDROSCHEK, V.; GLÄSER, R. Fast and sensitive detection of *Trichophyton rubrum* in superficial tinea and onychomycosis by use of a direct polymerase chain reaction assay. *Mycoses*, Berlin, v. 54, n. 5, p. e313-317, sept. 2011.

- BRILHANTE, R. S. N. *et al.* High rate of *Microsporium canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 156, n. 4, p. 303–308, dec. 2003.
- BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A.; SAUNTE, D. M.; ARENDRUP, M. C. Five-Hour Diagnosis of Dermatophyte Nail Infections with Specific Detection of *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 4, p. 1200–1204, apr. 2007.
- CABAÑES, F. J. Dermatofitosis animales. Recientes avances. *Revista Iberoamericana de Micología*, Barcelona, v. 17, p. S8–S12, ene. 2000.
- CABAÑES, F. J. *et al.* Seasonal study of the fungal biota of the fur of dogs. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 1–7, 1996.
- CABAÑES, F. J.; ABARCA, M. L.; BRAGULAT, M. R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 137, n. 2, p. 107–113, feb. 1997.
- CAFARCHIA, C. *et al.* An improved molecular diagnostic assay for canine and feline dermatophytosis. *Medical Mycology*, Oxford, v. 51, n. 2, p. 136–143, feb. 2013.
- CAFARCHIA, C. *et al.* Molecular characterization of selected dermatophytes and their identification by electrophoretic mutation scanning. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 30, n. 20, p. 3555–3564, oct. 2009.
- CHANDRAN, N. S. *et al.* Complementary role of a polymerase chain reaction test in the diagnosis of onychomycosis. *The Australasian Journal of Dermatology*, New South Wales, v. 54, n. 2, p. 105–108, may 2013.
- CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in Animals. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 166, n. 5–6, p. 385–405, nov.-dec. 2008.
- COELHO, A. C.; ALEGRIA, N.; RODRIGUES, J. Isolamento de dermatófitos em animais domésticos em Vila Real, Portugal. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 1017–1020, ago. 2008.
- COPETTI, M. V. *et al.* Dermatophytes isolated from dogs and cats suspected of dermatophytosis in Southern Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n. 2, p. 119–124, 2006.
- DĄBROWSKA, I.; DWORECKA-KASZAK, B.; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. The use of a one-step PCR method for the identification of *Microsporium canis* and *Trichophyton mentagrophytes* infection of pets. *Acta Biochimica Polonica*, Warszawa, v. 61, n. 2, p. 375–378, 2014.
- DE HOOG, G. S. *et al.* Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, Dordrecht, v. 182, n. 1–2, p. 5–31, feb. 2017.

DHIB, I. *et al.* Evaluation of Chitine synthase (CHS1) polymerase chain reaction assay in diagnosis of dermatophyte onychomycosis. *Journal De Mycologie Medicale*, Paris, v. 22, n. 3, p. 249–255, sep. 2012.

DIAL, S. M. Fungal diagnostics: current techniques and future trends. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 373–392, viii, mar. 2007.

EBIHARA, M. *et al.* Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 161, n. 5, p. 1038–1044, nov. 2009.

ELAVARASHI, E.; KINDO, A. J.; KALYANI, J. Optimization of PCR-RFLP directly from the skin and nails in cases of dermatophytosis, targeting the ITS and the 18S Ribosomal DNA regions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, Delhi, v. 7, n. 4, p. 646–651, apr. 2013.

FERREIRA, R. R. *et al.* Quérion causado por *Microsporium gypseum* em um cão. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n. 2, p. 179–182, 2006.

FERREIRO, L. *et al.* Diagnóstico micológico. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. (ed.). *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária*. São Caetano do Sul: Interbook, 2016. cap. 2, p. 17–74.

GARG, J. *et al.* Evaluation of pan-dermatophyte nested PCR in diagnosis of onychomycosis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 45, n. 10, p. 3443–3445, oct. 2007.

GARG, J. *et al.* Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC research notes*, London, v. 2, p. 60, 18 apr. 2009.

GRÄSER, Y.; CZAİKA, V.; OHST, T. Diagnostic PCR of dermatophytes - an overview. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, Berlin, v. 10, n. 10, p. 721–726, oct. 2012.

HAWKSWORTH, D. L. *et al.* The amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA fungus*, Berkeley, v. 2, n. 1, p. 105–112, june 2011.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (Brasil). *Pesquisa domiciliar sobre cães e gatos: humanização e padrões de consumo*. Rio de Janeiro: IBGE, 2007. 80 p. (Relatório de pesquisa, n. 20). Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv39560.pdf>
Acesso em: 15 ago. 2019.

JACOBSON, L. S.; MCINTYRE, L.; MYKUSZ, J. Comparison of real-time PCR with fungal culture for the diagnosis of *Microsporium canis* dermatophytosis in shelter cats: a field study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, London, v. 20, n. 2, p. 103–107, feb. 2018.

JENSEN, R.; ARENDRUP, M. Molecular diagnosis of dermatophyte infections. *Current Opinion in Infectious Diseases*, London, v. 25, n. 2, p. 126–134, apr. 2012.

KANO, R. *et al.* Detection of *Microsporum canis* in the skin scrapings and hairs of dogs with dermatophytosis based on sequences of the chitin synthase 1 gene. *Microbiology and Immunology*, Tokyo, v. 44, n. 7, p. 605–607, 2000.

KANO, R. *et al.* Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. *The Journal of Veterinary Medical Science*, Tokyo, v. 65, n. 2, p. 267–270, feb. 2003.

KHOSRAVI, A. R.; MAHMOUDI, M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses*, Brelin, v. 46, n. 5–6, p. 222–225, june 2003.

KIM, J. Y. *et al.* Identification of dermatophytes using multiplex polymerase chain reaction. *Annals of Dermatology*, Seoul, v. 23, n. 3, p. 304–312, aug. 2011.

KIZNY GORDON, A. *et al.* Clinical application of a molecular assay for the detection of dermatophytosis and a novel non-invasive sampling technique. *Pathology*, London, v. 48, n. 7, p. 720–726, dec. 2016.

KONDORI, N. *et al.* Comparison of a new commercial test, dermatophyte-PCR kit, with conventional methods for rapid detection and identification of *Trichophyton rubrum* in nail specimens. *Medical Mycology*, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1005–1008, nov. 2010.

LEAL, C. A. S. *et al.* Padronização de multiplex PCR para detecção de dermatófitos em pelos e crostas de cães e gatos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v. 38, n. 9, p. 1824–1828, set. 2018.

LEWIS, D. T.; FOIL, C. S.; HOSGOOD, G. Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981–1990. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 2, n. 2, p. 53–58, june 1991.

LITZ, C. E.; CAVAGNOLO, R. Z. Polymerase chain reaction in the diagnosis of onychomycosis: a large, single-institute study. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 163, n. 3, p. 511–514, sep. 2010.

LIU, D. *et al.* Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *Journal of Medical Microbiology*, London, v. 49, n. 6, p. 493–497, june 2000.

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

MARCHISIO, V. F. *et al.* Dermatophytes from cases of skin disease in cats and dogs in Turin, Italy. *Mycoses*, Berlin, v. 38, n. 5–6, p. 239–244, 1 may-june 1995.

- MEHLIG, L. *et al.* Clinical evaluation of a novel commercial multiplex-based PCR diagnostic test for differential diagnosis of dermatomycoses. *Mycoses*, Berlin, v. 57, n. 1, p. 27–34, jan. 2014.
- MIYAJIMA, Y. *et al.* Rapid real-time diagnostic PCR for *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes* in patients with tinea unguium and tinea pedis using specific fluorescent probes. *Journal of Dermatological Science*, Amsterdam, v. 69, n. 3, p. 229–235, mar. 2013.
- MORIELLO, K. A. *et al.* Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats: clinical consensus guidelines of the world association for veterinary dermatology. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 28, n. 3, p. 266-e68, june 2017.
- MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J. Fungal flora of the coat of pet cats. *American Journal of Veterinary Research*, Schaumburg, v. 52, n. 4, p. 602–606, apr. 1991.
- MORIELLO, K. A.; LEUTENEGGER, C. M. Use of a commercial qPCR assay in 52 high risk shelter cats for disease identification of dermatophytosis and mycological cure. *Veterinary Dermatology*, Oxford, v. 29, n. 1, p. 66-e26, feb. 2018.
- NARDONI, S.; FRANCESCHI, A.; MANCIANTI, F. Identification of *Microsporum canis* from dermatophytic pseudomycetoma in paraffin-embedded veterinary specimens using a common PCR protocol. *Mycoses*, Berlin, v. 50, n. 3, p. 215–217, may 2007.
- NILSSON, K. *et al.* Impact of prolonged storage of clinical samples at 4 °C on the recovery of dermatophytes by culture or PCR analysis. *Journal De Mycologie Medicale*, Paris, v. 29, n. 1, p. 1–6, apr. 2019.
- NONOHAY, J. S.; HEPP, D. Técnicas e análises de biologia molecular. In: BRUNO, A. J. (org.). *Biotecnologia II*. Porto Alegre: Artmed, 2017. cap. 1.
- OHST, T.; KUPSCH, C.; GRÄSER, Y. Detection of common dermatophytes in clinical specimens using a simple quantitative real-time TaqMan polymerase chain reaction assay. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 174, n. 3, p. 602–609, mar. 2016.
- PAIXÃO, G. C. *et al.* Dermatophytes and saprobe fungi isolated from dogs and cats in the city of Fortaleza, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, São Paulo, v. 53, n. 5, p. 568–573, oct. 2001.
- PANKEWITZ, F. *et al.* Development of a novel polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trichophyton rubrum* onychomycosis. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 168, n. 6, p. 1236–1242, june 2013.
- PAUGAM, A. *et al.* Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 95, n. 2, p. 218–222, nov. 2013.
- PEREIRA, A. N. *et al.* Pseudomicetoma dermatofítico causado por *Microsporum canis* em gato da raça persa. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n. 2, p. 193–196, 2006.

PINTER, L. *et al.* Epidemiological and clinical features of dermatophytoses in dogs and cats in Croatia between 1990 and 1998. *Veterinarski arhiv*, Zagreb, v. 69, n. 5, p. 261–270, 21 oct. 1999.

QUINN, P. J. *et al.* Dermatophytes. In: _____. *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2nd ed. Ames: Wiley-Blackwell, 2011. ch. 43, p. 419–424.

ROMANO, C.; VALENTI, L.; BARBARA, R. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. *Mycoses*, Berlin, v. 40, n. 11–12, p. 471–472, 1997.

SATO, T. *et al.* Simple PCR-based DNA microarray system to identify human pathogenic fungi in skin. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 48, n. 7, p. 2357–2364, july 2010.

SCHMIDT, A. Diagnostic results in animal dermatophytoses. *Journal of Veterinary Medicine: Series B*, Berlin, v. 43, n. 9, p. 539–543, nov. 1996.

SEKER, E.; DOGAN, N. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. *Preventive Veterinary Medicine*, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 46–51, 1 jan. 2011.

SHERMAN, S. *et al.* Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples: a multicentre study. *Mycoses*, Amsterdam, v. 61, n. 2, p. 119–126, feb. 2018.

SPARKES, A. H. *et al.* Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. *The Veterinary Record*, London, v. 133, n. 3, p. 57–61, july 1993.

SPILIOPOULOU, A. *et al.* Evaluation of a commercial PCR test for the diagnosis of dermatophyte nail infections. *Journal of Medical Microbiology*, London, v. 64, n. Pt 1, p. 25–31, jan. 2015.

THERMO SCIENTIFIC. *T123 - Technical bulletin Nanodrop Lite: Interpretation of Nucleic Acid 260/280 Ratios*. Wilmington: 2012, 1 p. Disponível em: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2FProduct-Bulletins%2FT123-NanoDrop-Lite-Interpretation-of-Nucleic-Acid-260-280-Ratios.pdf&title=TnVjbGVpYyBBY2lkIFB1cmI0eSBSYXRpb3M=/> Acesso em: 17 jul. 2019.

UCHIDA, T. *et al.* Comparative study of direct polymerase chain reaction, microscopic examination and culture-based morphological methods for detection and identification of dermatophytes in nail and skin samples. *The Journal of Dermatology*, London, v. 36, n. 4, p. 202–208, apr. 2009.

VERRIER, J. *et al.* Dermatophyte identification in skin and hair samples using a simple and reliable nested polymerase chain reaction assay. *The British Journal of Dermatology*, Oxford, v. 168, n. 2, p. 295–301, feb. 2013.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 8, n. 2, p. 240–259, apr. 1995.

WISSELINK, G. J.; VAN ZANTEN, E.; KOOISTRA-SMID, A. M. D. Trapped in keratin: a comparison of dermatophyte detection in nail, skin and hair samples directly from clinical samples using culture and real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods*, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 62–66, apr. 2011.