

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DERMATOFITOSE EM ANIMAIS DE COMPANHIA

Lundia Luara Cavalcante Bin¹, Juliano Gomes², Sidenir Aparecida Bráz³, Rogério Giuffrida⁴

¹ Médica Veterinária Residente da área de Laboratório Veterinário, e-mail: lundia.bin@hotmail.com. ² Discente de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista, e-mail: juliano-vet@hotmail.com. ³ Bióloga e Técnica do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da UNOESTE, email: sidenirbraz@gmail.com. ⁴ Docente da Faculdade de Ciências Agrárias, Curso de Medicina Veterinária da Universidade do Oeste Paulista, e-mail: rgiuffrida@unoeste.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi comparar os resultados de três exames de diagnóstico para dermatofitose em 71 cães e cinco gatos com lesões de pele: microscopia direta, cultura de fungos e fluorescência à lâmpada de Wood. A concordância entre os três testes foi avaliada pela estimativa do coeficiente Kappa. A sensibilidade e a especificidade dos testes de microscopia direta e fluorescência foram calculadas com base nos resultados das culturas de fungos. Dos 76 cães e gatos avaliados, 18 (23,6%) tiveram culturas positivas. As espécies de fungos isoladas foram *Microsporum canis* (88,8%), *Microsporum gypseum* (5,5%) e *Trichophyton mentagrophytes* variedade *mentagrophytes* (5,5%). A estimativa dos coeficientes Kappa indicou concordância fraca entre os três métodos diagnósticos. A sensibilidade da microscopia direta e fluorescência em lâmpada de Wood foram respectivamente 64,71% e 41,18% e especificidade de 27,12% e 66,10%, respectivamente. Considerando as consequências dos resultados falso-positivos e falso-negativos para o diagnóstico das dermatofitoses, é recomendado não usar esses três testes separadamente, mas combiná-los para obter resultados mais confiáveis.

Palavras – chave: dermatofitoses, animais de estimação, testes diagnósticos, zoonose, dermatologia

COMPARATIVE STUDY OF DIAGNOSTIC METHODS FOR DERMATOPHYTOSIS IN DOGS AND CATS

ABSTRACT

The objective of this study was to compare results of three diagnostic tests for dermatophytosis in 71 dogs and five cats with skin lesions: direct microscopy, fungal culture and the Wood's lamp fluorescence. The agreement between the three tests was evaluated by Kappa coefficient estimates. The sensitivity and specificity of the fluorescence and direct microscopy were calculated based on the results of fungal cultures. Of the 76 dogs and cats evaluated, 18 (23.6%) results in positive cultures. The fungal species isolated were: *Microsporum canis* (88.8%), *Microsporum gypseum* (5.5%) and *Trichophyton mentagrophytes* variety *mentagrophytes* (5.5%). Estimates of Kappa coefficient indicated weak agreement between the three tests. The sensitivity of the direct microscopy and fluorescence at Wood's lamp were respectively 64.71% and 41.18% and specificity of 27.12% and 66.10% respectively. Considering the consequences of false-positive and false-negative results for diagnostic of dermatophytosis, it recommended not to use the three testes separately, but combine them for more reliable results.

Keywords: dermatophytosis, pets, diagnostic tests, zoonosis, dermatology

INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são um grupo peculiar de fungos descritos como agentes etiológicos de lesões dermatológicas no homem e nos animais. Eles são caracterizados por apresentarem elevada afinidade por substratos queratinizados presentes na pele e seus anexos (CHERMETTE et al., 2008). Mais raramente, são capazes de desencadear micoses subcutâneas denominadas de pseudomicetomas dermatofíticos (TOSTES e GIUFFRIDA, 2003). Atualmente, três gêneros de dermatófitos são considerados importantes: *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum*. Apenas os gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* são agentes relevantes de infecções cutâneas em animais domésticos (CHERMETTE et al., 2008).

O diagnóstico definitivo das dermatofitoses clínicas deve ser realizado antes do início da medicação antifúngica, pois os fármacos prescritos, além de possuírem custos elevados, apresentam efeitos colaterais indesejáveis (ROBERT e PIHET, 2008). Um dos testes diagnósticos mais utilizados é o uso da luz de Wood, uma radiação ultravioleta que induz fluorescência esverdeada nas moléculas de coproporfirinas produzidas durante o parasitismo pelo dermatófito *M. canis*. Apesar de útil, este teste, pode apresentar resultados falso-positivos quando outras substâncias, também fluorescentes, estiverem impregnadas nos pêlos tais como sabões, pomadas, resíduos de urina, antibióticos e outros (CAFARCHIA et al., 2004), além de resultados falso-negativos se a espécie de dermatófito for diferente de *M. canis* e não ser capaz de fluorescer (KEFALIDOU et al., 1997).

Outro teste empregado é a semeadura das amostras de pêlo em meios de cultura seletivos como os meios Mycosel e DTM (*Dermatophyte Test Medium*). Apesar de possibilitar a determinação da espécie de fungo infectante, a semeadura apresenta desvantagens como o tempo prolongado para que as colônias

fúngicas se desenvolvam e a possibilidade de resultados falso-positivos, se o animal estiver na condição de carreador mecânico de esporos fúngicos na cobertura pilosa, sem infecção ativa estabelecida (SPARKES et al., 1993).

O exame microscópico direto de pêlos com suspeita de infecção, após tratamento prévio com soluções clarificantes é um diagnóstico rápido e de fácil execução (ROBERT e PIHET, 2008). As substâncias mais empregadas para clarificação são o hidróxido de potássio (KOH) e o dimetilssulfóxido (DMSO). Em alguns estudos, a microscopia direta apresentou resultados mais consistentes do que a cultura fúngica (SINGH e BEENA, 2003). Este exame, desde que realizado por um micologista experiente, pode propiciar resultados imediatos, reduzindo o tempo entre o diagnóstico e o tratamento do animal.

O presente trabalho pretendeu comparar os resultados de exames de microscopia direta, cultura fúngica e fluorescência à lâmpada de Wood registrados nos anos de 2008, 2009 e 2010 nos prontuários de 71 cães e 5 gatos pertencentes ao arquivo do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva 1 da Unoeste.

MÉTODOS

Foram levantados resultados de exames de microscopia direta dos pêlos com a utilização de solução clarificante de KOH a 10% e DMSO a 10%, cultura fúngica em meio de Mycosel e Sabouraud e fluorescência à lâmpada de Wood a partir das fichas de 71 cães e cinco gatos registradas nos últimos três anos pelo Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva 1 da Unoeste. A concordância entre os testes foi avaliada por meio do cálculo do índice *Kappa*, estimado por ponto e por intervalo com 95% de confiança para cada combinação de testes. A sensibilidade e especificidade dos testes de fluorescência e microscopia direta foram calculadas com base nos resultados de cultura fúngica. As frequências

de positividade para machos e fêmeas nos testes considerados foram comparadas pelo teste de Qui-quadrado com correção de Yates (PAGANO e GAUVREAU, 2004). Para todas as comparações adotou-se nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Dos 76 animais avaliados 18 (23,6%) apresentaram culturas positivas. As espécies fúngicas isoladas de cães e gatos foram: *Microsporium canis* (88,8%), *Microsporium gypseum* (5,5%) e *Trichophyton mentagrophytes* variedade *mentagrophytes* (5,5%). Os resultados

dos exames de microscopia direta, fluorescência à lâmpada de Wood e cultura fúngica das amostras de pelame, para as 71 amostras originárias de cães encontram-se descritos na tabela 1. Não foram observadas diferenças significativas entre resultados positivos e negativos de machos e fêmeas para o exame de microscopia direta ($p = 0,9940$), cultivo fúngico ($p = 0,9308$) e fluorescência ($p = 0,2649$). Dos cinco felinos examinados, quatro (80%) foram positivos ao teste de cultura fúngica, 3 (60%) ao teste de microscopia direta e 2 (40%) apresentaram fluorescência evidente nos pêlos.

TABELA 1 – Resultados de exame de microscopia direta, cultivo fúngico e fluorescência à luz de Wood em relação ao sexo para 71 cães, Presidente Prudente, 2009

Sexo	Microscopia direta			Cultivo			Fluorescência		
	Pos	Neg	Total	Pos	Neg	Total	Pos	neg	Total
Machos	28(39%)	11(15%)	39(55%)	7(10%)	32(45%)	39(55%)	11(15%)	28(39%)	39(55%)
Fêmeas	23(32%)	9(13%)	32(45%)	6(8%)	26(37%)	32(45%)	14(20%)	18(25%)	32(45%)
Total	51(72%)	20(28%)	71(100%)	13(18%)	58(82%)	71(100%)	25(35%)	46(55%)	71(100%)

Pos- positivo; Neg-negativo.

Quando se comparou os resultados dos exames de microscopia direta e cultivo fúngico, observou-se concordância global de 35,53% considerando-se resultados positivos e negativos. O índice *Kappa* para esta comparação não foi estatisticamente significativo. A concordância global entre os testes de cultivo fúngico e fluorescência foi de 60,53% e neste caso, o índice *Kappa* calculado também não foi significativo. A concordância entre os exames de microscopia direta e fluorescência foi de 59,21% e o índice

Kappa foi estatisticamente significativo, porém sua magnitude indicou concordância fraca entre estes dois testes. Os resultados dos cálculos dos índices *Kappa* e respectivos valores de significância para todas as comparações encontram-se descritos na tabela 2. A sensibilidade e especificidade dos testes de fluorescência e exame direto, em relação ao teste de cultivo fúngico estão descritos na tabela 3.

TABELA 2 - Estimativa por ponto e por intervalo com 95% de confiança (IC95%) e significância estatística (*p*) para índices Kappa de concordância entre os testes diagnósticos para dermatofitoses em cães e gatos, Presidente Prudente, 2010

Contraste	Kappa	IC 95%	P
Microscopia direta x fluorescência	0,2728	0,076 to 0,470	0,0011
Microscopia direta x cultivo	-0,046	-0,221 to 0,129	0,2563
Cultivo x fluorescência	0,6053	-0,201 to 0,322	0,2903

TABELA 3- Estimativas por ponto e intervalo com 95% de confiança (IC 95%) dos valores de sensibilidade (S) e especificidade (E) dos testes de microscopia direta (MD) e fluorescência (F) em relação ao teste de cultivo fúngico

Teste	S	IC 95%	E	IC 95%
MD	0,6471	0,3834 – 0,8579	0,2712	0,1639 – 0,4029
F	0,4118	0,1843 – 0,6704	0,6610	0,5257 – 0,7789

DISCUSSÃO

A acurácia dos testes diagnósticos pesquisados é essencial para evitar resultados falso-positivos, que têm como conseqüências, a instituição de tratamentos em animais sem enfermidade e sua conseqüente exposição aos efeitos colaterais indesejáveis das medicações antifúngicas. Por outro lado, animais com resultados falso-negativos nestes testes não são submetidos à terapia antifúngica e permanecendo doentes aumentam os riscos de transmissão zoonótica e contaminação do ambiente de convívio com esporos fúngicos.

Não foi observada influência do sexo dos animais nos resultados de positividade das três modalidades de exames pesquisadas. Estes resultados concordam com estudos prévios que excluem o sexo dos animais como fator determinante dos resultados de exames positivos ou negativos para as dermatofitoses (SPARKES et al., 1993).

A concordância entre os testes de microscopia direta e cultura fúngica foi considerada fraca e não significativa. A sensibilidade do exame de microscopia direta em relação ao à cultura fúngica foi considerada apenas razoável (64,71%), sendo inferior a outros

estudos previamente publicados que relataram valores de sensibilidade desse teste, em relação à cultura fúngica, superiores a 80% (HALDANE e ROBERT, 1980; SILVA et al., 2003). Apesar disso, a sensibilidade estimada indica que quase 2/3 dos animais doentes podem ser detectados pelo teste de microscopia, o que não desqualifica este teste diagnóstico.

A estimativa da especificidade do exame microscopia direta foi bastante baixa (27,12%), possivelmente em razão de resultados falso-positivos oriundos da ação do KOH e DMSO empregadas para clarificar os pêlos. O KOH, apesar de clarificar pigmentos e digerir o material protéico presente nas amostras, tende a absorver dióxido de carbono do ar e formar cristais, além de saponificar a gordura formando glóbulos e estruturas similares aos artrósporos fúngicos que dificultam a visualização dos pêlos (MEHTA et al., 1977). Por outro lado, o DMSO, apesar de clarificar a queratina e prevenir a desidratação da amostra, induz a queratólise das estruturas observadas (STOUGHTON e FRITSCH, 1964; KLINGMAN, 1965). Em face destas observações, recomenda-se, para melhorar o desempenho da microscopia direta, alternativas como o uso de substâncias corantes que destacam

seletivamente elementos fúngicos entre os debris celulares, tais como laranja de acridina, negro clorazol e Chicago Sky Blue 6B, que apresentam afinidade pela quitina dos fungos (PANASITI et al., 2006; LIM; LIM, 2008) ou o calcofluor, substância que permite a observação dos artrósporos em microscópio de fluorescência (HALDANE; ROBERT, 1980).

A fluorescência à lâmpada de Wood não apresentou concordância significativa com o exame de cultura fúngica. A sensibilidade deste teste foi considerada baixa (41,18%) e a especificidade apenas razoável (66,10%). Este teste propicia um grande número de resultados falso-negativos, possivelmente por que cerca de 50% das espécies de *M. canis*, principal agente fúngico isolado dos animais estudados, não emitem fluorescência quando submetidos a esta modalidade de radiação ultravioleta (SCOTT et al., 2001). Mesmo considerando este aspecto, o uso desta técnica é útil como diagnóstico presuntivo e pode auxiliar na seleção de amostras para exames complementares.

Apesar de ter sido considerada como teste padrão-ouro para os exames pesquisados, é possível que na presente pesquisa, em alguns casos a cultura fúngica tenha falhado em recuperar elementos fúngicos das amostras de pêlos. Este teste resulta falso-negativo quando o animal examinado tiver recebido alguma medicação antifúngica (ROBERT e PIHET, 2008) ou forem colhidas amostras que não contêm artrósporos fúngicos viáveis. Por outro lado a cultura fúngica pode resultar falso-positivas quando os animais forem carreadores mecânicos de esporos fúngicos na cobertura pilosa, sem apresentar a infecção ativa (SPARKES et al., 1993). Em algumas pesquisas a cultura fúngica, isoladamente foi considerada insuficiente para diagnosticar conclusivamente casos de dermatofitoses em cães e gatos (SPARKES et al., 1993; SINGH e BEENA, 2003).

Conclui-se que os três exames pesquisados não devem ser realizados isoladamente sob o risco de apresentarem resultados falso-positivos ou falso-negativos. Recomenda-se a combinação entre os testes para resultados mais acurados.

REFERÊNCIAS

- CAFARCHIA, C. et al. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. **Mycoses**, Berlin, v. 47, n. 11-12, p. 508-13, 2004. DOI 10.3923/javaa.2009.803.806. <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2009.803.806>
- CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatophytoses in animals. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 166, n. 5-6, p. 385-405, 2008. DOI 10.1007/s11046-008-9102-7. <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-008-9102-7>
- HALDANE, D. J., ROBERT, E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 13, n. 4, p. 337-9, 1990. DOI 10.1016/0732-8893(90)90027-S.
- KEFALIDOU, S. et al. Wood's light in *Microsporum canis* positive patients. **Mycoses**, Berlin, v. 40, n. 11-12, p. 461-3, 1997. DOI 10.1111/j.1439-0507.1997.tb00185.x. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.1997.tb00185.x>
- KLINGMAN, A. Topical pharmacology and toxicology of dimethyl sulfoxide. **J. Am. Med. Assoc.**, New York, n. 193, p. 796-98, 1965. DOI 10.1001/jama.1965.03090100042010.
- LIM, C. S.; LIM, S. L. New contrast stain for the rapid diagnosis of dermatophytic and candidal dermatomycoses. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v. 144, n. 9, p. 1228-9, 2008.
- MEHTA, J. P. et al. A study of dermatomycosis in Bombay. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, Chandigarh, v. 20, n. 1, p. 23-31, 1977.
- PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Princípios de Bioestatística**. 2.ed. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2004.
- PANASITI, V. et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. **Mycoses**, Berlin, v. 49, n. 1, p. 26-9, 2006. DOI 10.1111/j.1439-0507.2005.01185.x.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0507.2005.01185.x>

ROBERT, R.; PIHET, M. Conventional methods for the diagnostic of dermatophytosis.

Mycopathology, Den Haag, v. 166, p. 295-306, 2008. DOI 10.1007/s11046-008-9106-3.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Fungal skin diseases. In: **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 2001. p. 336-361.

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7216-7618-0.50019-5>

SILVA, V. et al. Infección y colonización por dermatofitos en cánidos del area sur de Santiago, Chile. **Rev. Iber. de Micología**, Barcelona, v. 20, n. 4, p. 145-8, 2003.

SINGH, S.; BEENA, P. M. Comparative study of different microscopic techniques and culture media for the isolation of dermatophytes. **Indian J. Med. Microbiol.**, Mumbai, v. 21, n. 1, p. 21-24, 2003.

SPARKES, A. H. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. **Vet. Rec.**, London, v. 133, n. 3, p. 57-61, 1993. DOI 10.1136/vr.133.3.57.

STOUGHTON, R. B.; FRITSCH, W. The influence of dimethyl sulfoxide on human percutaneous absorption. **Arch. Dermatol.**, Chicago, n. 90, p. 512-17, 1964. DOI 10.1002/jps.2600571022.

TOSTES, R. A.; GIUFFRIDA, R. Pseudomicetoma dermatofítico em felinos. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 363-365, 2003. DOI 10.1590/S0103-84782003000200028.

<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000200028>