

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DERMATÓFITOS EM BOVINOS: INCIDÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* À DROGAS ANTIFÚNGICAS**

Alessandra Gonçalves Krakhecke
Farmacêutica - Bioquímica

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
2003

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DERMATÓFITOS EM BOVINOS: INCIDÊNCIA E
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* À DROGAS ANTIFÚNGICAS**

Alessandra Gonçalves Krakhecke

Orientadora: Profa. Dra. Regina Celia Candido

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias – Câmpus de
Jaboticabal – UNESP, para
obtenção do Título de Mestre em
Microbiologia, Área de
Concentração em Microbiologia
Agropecuária.

Jaboticabal – SP
Maio - 2003

Krakhecke, Alessandra Gonçalves

K89d Dermatofitos em bovinos: incidência e suscetibilidade *in vitro* a
drogas antifúngicas / Alessandra Gonçalves Krakhecke. – –
Jaboticabal, 2003
xi, 91 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003

Orientadora: Regina Celia Candido

Banca examinadora: Ely Nahas, Izabel Yoko Ito

Bibliografia

1. Tricofitose. 2. Dermatofitose. 3. Animais. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 576.89:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALESSANDRA GONÇALVES KRAKHECKE – brasileira, nascida aos 15 de abril de 1975 em Dourados – MT, filha de Egon Krakhecke e Suely Gonçalves Krakhecke. Farmacêutica-Bioquímica (modalidade de Análises Clínicas) formada pela Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, câmpus de Campo Grande, em fevereiro de 1998; especialista em Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, câmpus de Ribeirão Preto, em fevereiro de 2001. É filiada, desde de 1998, ao Conselho Regional de Farmácia do Estado de Mato Grosso do Sul – CRF/MS nº 1631.

Deixe-me dizer o segredo que levou-me
a atingir minha meta: minha força está
unicamente na minha tenacidade.

Louis Pasteur

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo incentivo e apoio para que eu pudesse realizar meus ideais.

À Profa. Dra. Regina Celia Candido, minha orientadora, pela oportunidade, confiança e sugestões no desenvolvimento deste trabalho.

À FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, câmpus de Jaboticabal, por propiciar a oportunidade de aprender e apresentar o presente trabalho.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.

À Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Pecuária Sudeste em São Carlos – SP, por sua imensa colaboração e disposição na realização desta pesquisa.

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) - USP pela possibilidade de realização da parte experimental deste trabalho.

Ao médico veterinário Dr. Euripedes Afonso e a todos os funcionários da Embrapa – Pecuária Sudeste que contribuíram na obtenção das amostras biológicas.

Ao médico veterinário Dr. Gustavo Torres Vilaverde e funcionários das propriedades rurais visitadas, pela colaboração na obtenção das amostras biológicas.

Às funcionárias do Laboratório de Micologia da FCFRP – USP, Joseane C. Ferreira e Solange Bocado, pelo auxílio laboratorial.

À Edna M. T. Daquila, secretária da Microbiologia do Departamento de Produção Vegetal da FCAV – UNESP, pela atenção e auxílio nos momentos de dificuldade.

Ao colega Reginaldo dos Santos Pedroso pela colaboração durante os testes de suscetibilidade a antifúngicos e convivência no Laboratório de Micologia da FCFRP – USP.

Ao médico veterinário Msc. Èriklis Nogueira, docente da Universidade para o Desenvolvimento Econômico da Região Pantaneira – UNIDERP em Campo Grande – MS, pelo apoio, auxílio e amizade no decorrer deste trabalho.

Às minhas amigas Marilei Üecker, Carla Biella, Tânia Ogasawara, Ana Paula Zueli e Carla Domingues dos Santos pelo incentivo, apoio, carinho, amizade e convivência para que eu pudesse cumprir mais esta etapa em minha vida.

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Posição sistemática dos dermatófitos e fungos afins.....	4
2. Distribuição ecológica das espécies de dermatófitos e fungos afins.....	5
3. Distribuição das amostras segundo o local de coleta.....	20
4. Protocolo de diluição do fluconazol.....	33
5. Protocolo de diluição do itraconazol e terbinafina.....	34
6. Percentual de amostras positivas para dermatófitos nos animais, no ambiente e no solo.....	40
7. Fungos isolados de amostras dos animais com pododermatites.....	41
8. Fungos isolados de amostras dos animais com lesão de pele.....	42
9. Distribuição de dermatófitos isolados das amostras de pele coletadas de bovinos em São Carlos – SP no período da seca.....	47
10. Distribuição de dermatófitos isolados das amostras de pele coletadas de bovinos em São Carlos – SP no período das águas.....	47
11. Distribuição das amostras de solo, número, amostras positivas e dermatófitos isolados.....	48
12. Fungos isolados dos animais e do ambiente/solo na região sul do estado de Mato Grosso do Sul.....	49
13. Fungos isolados dos animais e do ambiente/solo de São Carlos – SP.....	50
14. Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas apresentada pelos dermatófitos identificados.....	51
15. Número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados e das cepas padrão (ATCC).....	54
16. Número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados para o teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método da difusão em ágar.....	55

17. Atividade <i>in vitro</i> dos antifúngicos pelo método da macrodiluição em caldo frente às espécies de dermatófitos e cepas padrão.....	56
18. Diâmetro dos halos de inibição dos dermatófitos frente aos medicamentos de uso veterinário pelo método de difusão em ágar.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Vista de carpete utilizado nas coletas com respectiva embalagem	21
2. Suscetibilidade dos dermatófitos aos antifúngicos pelo método da macrodiluição em caldo.....	35
3. Suscetibilidade dos dermatófitos aos antifúngicos pelo método de difusão em ágar.....	38
4. Vista do pescoço de animal com lesões aparentemente características de tricofitose.....	43
5. Vista panorâmica de animal com lesões verrugosas.....	44
6. Vista de animal com lesões verrugosas, secreção e sangramento.....	44
7. Vista panorâmica de animal com alopecia e eritema (com presença de carrapatos).....	45
8. Vista de animal com lesões e perda de grande extensão de pele.....	46
9. Vista da colônia de <i>Microsporum</i> spp: aspecto aveludado, bordas brancas e centro rosa-escuro, (a) anverso e (b) verso.....	52
10. Vista da colônia de <i>M. gypseum</i> : aspecto gizado, bordas brancas e irregulares, centro acastanhado, (a) anverso e (b) verso.....	52
11. Atividade antifúngica do medicamento de uso veterinário (a) LEPECID®, (b) controle positivo e (c) controle negativo frente ao <i>M. gypseum</i>	57
12. Atividade antifúngica dos medicamentos de uso veterinário (a) solução de iodo a 5% e (b) UNGÜENTO® spray, (c) controle positivo e (d) controle negativo frente ao <i>M. gypseum</i>	58

DERMATÓFITOS EM BOVINOS: INCIDÊNCIA E SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* A DROGAS ANTIFÚNGICAS.

RESUMO - A etiologia, epidemiologia e sintomatologia das dermatofitoses são quase heterogêneas e complexas. Nos últimos anos, a literatura vem divulgando o aumento das infecções fúngicas, sendo as dermatofitoses as principais responsáveis. Este trabalho teve como objetivos a observação de bovinos como possíveis reservatórios de dermatófitos, isolando e identificando esses fungos nos animais, ambiente e solo, bem como a determinação do perfil de suscetibilidade *in vitro* frente às drogas antifúngicas itraconazol, terbinafina e fluconazol; e aos medicamentos tópicos de uso veterinário LEPECID®, UNGÜENTO® spray e iodo a 5%. Foram coletadas 538 amostras em São Carlos – SP e região sul do estado de Mato Grosso do Sul. Foram identificados 12 (2,23%) dermatófitos nas amostras, sendo que, oito (7 *Microsporum gypseum* e um *Microsporum* spp) foram isolados de animais aparentemente saudáveis e quatro (*M. gypseum*) no solo. Dos 38 (7,6%) animais que apresentaram lesões sugestivas de dermatofitoses, somente três tinham características clínicas de tricofitose, porém, não foram identificados dermatófitos em cultura. Os antifúngicos itraconazol e terbinafina apresentaram melhor atividade fungicida *in vitro* que o fluconazol. Os medicamentos de uso veterinário LEPECID® e iodo a 5% foram mais ativos *in vitro* que o UNGÜENTO® spray. Todos os medicamentos apresentaram atividade fungicida frente ao *M. gypseum*, revelando serem excelentes alternativas para o tratamento tópico de lesões causadas por dermatófitos em bovinos.

Palavras-chave: animais, dermatofitoses, *Microsporum gypseum*, *Microsporum* spp, solo, tricofitose

DERMATOPHYTES IN CATTLE: INCIDENCE AND SUSCEPTIBILITY IN VITRO AGAINST ANTIFUNGAL AGENTS

ABSTRACT - The etiology, epidemiology and symptomatology of dermatophytosis are quite heterogeneous and complex. In the last years, the literature showed an increase of fungal infections, being dermatophytosis main the responsible ones. This work had as objective the comment of bovines as possible reservoirs of dermatophytes, isolating and identifying to these fungi in animals, environment and soil, as well as determining susceptibility profile in vitro against antifungal agents (itraconazole, terbinafine and fluconazole) and against topical veterinarian use medicines (LEPECID®, UNGÜENTO® spray and iodine 5%). For this, 538 samples had been collected in São Carlos - SP and south region of the Mato Grosso do Sul state. The dermatophytes had been identified in 12 (2,23%) of the samples, being that, eight (7 *Microsporum gypseum* and 1 *Microsporum* spp) had been in apparently healthy animals and four (*M. gypseum*) in. Thirty-eight animals had presented suggestive dermatophytosis lesions being three to clinical characteristics of trichophytosis, however, in these samples had not been identified dermatophytes. The antifungals itraconazole and terbinafine had presented fungicidal activity better in vitro that fluconazole. The veterinarian use medicines LEPECID® and iodine 5% had been more active that the UNGÜENTO® spray in vitro, however, all had presented fungicidal activity against *M. gypseum*, disclosing to be excellent alternatives for topical treatment to dermatophytosis in cattle.

Keywords: animals, dermatophytosis, *Microsporum gypseum*, *Microsporum* spp, soil, trichophytosis

1. INTRODUÇÃO

De aproximadamente 500.000 fungos conhecidos, cerca de 100 são patogênicos para os homens e animais. Relativamente poucas espécies são parasitas de animais e muitas são parasitas de plantas, sendo o restante organismos sapróbios. A maioria dos fungos é oportunista e prolifera se houver condições (RICHARD et al., 1994).

Historicamente, a micologia médica, especificamente relacionada à doenças humanas, começou com a descoberta da etiologia do favus e centrou-se em torno de três médicos europeus no século XIX. Robert Remak e Johann Schönlein observaram as estruturas do agente causal do favus, e David Gruby descreveu o agente etiológico do favus, detalhes microscópicos e clínicos das crostas, e estabeleceu os contágios naturais da doença (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Um dos mais influentes micologistas, Raimond Sabouraud, começou suas pesquisas sobre os dermatófitos em torno de 1890, culminando na publicação de *Les Teignes*, em 1910. As contribuições de Sabouraud incluíram estudos em taxonomia, morfologia, métodos de cultura dos dermatófitos e a terapia das dermatofitoses (ODDS, 1991).

Os marcos fundamentais da micologia médica e veterinária foram, em 1983, revistos por Ainsworth e Stockdale (LACAZ et al., 1991).

1.1 Dermatófitos e dermatofitoses

A expressão dermatófitos ficou consagrada para designar um grupo de fungos que, geralmente, em vida parasitária vive à custa de queratina da pele, pêlos e unhas. O termo dermatofitoses, apesar de não corresponder à classificação taxonômica normalmente utilizada para as micoses, relaciona-se às infecções produzidas pelos dermatófitos (LACAZ et al., 1998).

Os agentes etiológicos das dermatofitoses estão distribuídos em três gêneros anamórficos (formas assexuadas): *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Os três gêneros são compostos de 41 espécies e diversas espécies possuem variedades, como por exemplo, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. Dessas espécies, aproximadamente 20 têm interesse em

micologia médica. Quando esses fungos se reproduzem de forma sexuada (estado teleomorfo) são classificados no gênero *Arthroderma* (Tabela 1), cujas características morfológicas, fisiológicas e antigênicas estão relacionadas entre si (LACAZ et al., 1998; ZAITZ, 1998; SIDRIM e MOREIRA, 1999).

Em bovinos, as dermatofitoses são as principais infecções fúngicas, sendo freqüente o isolamento de *T. verrucosum*, ocasionalmente *T. mentagrophytes* e em raros casos *M. canis* (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991).

1.2 Taxonomia

Em 1934, Chester Emmons modernizou o esquema taxonômico de Sabouraud e outros, estabelecendo a classificação atual dos dermatófitos. A taxonomia é baseada principalmente na formação de microconídios e macroconídios nos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum*, e somente macroconídios no gênero *Epidermophyton* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; LACAZ et al., 1998).

1.3 Ecologia

Segundo Rubio et al. (1999), os dermatófitos são comumente encontrados no ambiente e ecologicamente, são agrupados em: antropofílicos, zoofílicos e geofílicos (Tabela 2). Os dermatófitos antropofílicos estão restritos aos humanos, e raramente infectam animais. Os zoofílicos infectam primariamente os animais, mas podem infectar o homem. Os dermatófitos geofílicos vivem no solo como saprófitas, mas têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de animais e de humanos (LONDERO, 1990; LACAZ et al., 1991; KANE et al., 1997).

Os dermatófitos zoofílicos e geofílicos geralmente produzem em humanos lesões mais inflamatórias que os antropofílicos. A reação altamente inflamatória limita a disseminação da infecção e pode levar a cura espontânea, mas resulta em cicatriz e alopecia permanentes (KANE et al., 1997).

Tabela 1: Posição sistemática dos dermatófitos e fungos afins.***Formas imperfeitas (conidiais)**

Reino	<i>Fungi</i>
Filo (divisão)	<i>Eumycota</i>
Subfilo (subdivisão)	<i>Deuteromycota</i>
Classe	<i>Hyphomycetes</i>
Ordem	<i>Hyphomycetales</i>
Família	<i>Moniliaceae</i>
Gêneros	<i>Epidermophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Trichophyton</i>

Formas perfeitas (sexuadas)

Reino	<i>Fungi</i>
Filo (divisão)	<i>Eumycota</i>
Subfilo (subdivisão)	<i>Ascomycotina</i>
Classe	<i>Ascohymenomycetes</i>
Ordem	<i>Onygenales (Eurotiales)</i>
Família	<i>Arthrodermataceae</i>
Gênero	<i>Arthroderma</i>

* Segundo Lacaz et al. (1998).

Tabela 2: Distribuição ecológica das espécies de dermatófitos e fungos afins.*

Antropofílicos	Zoofílicos	Geofílicos
<i>E. floccosum</i>	<i>M. canis</i> var. <i>canis</i>	<i>E. stockdaleae</i>
<i>M. audouinii</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. amazonicum</i>
<i>M. ferrugineum</i>	var. <i>distortum</i>	<i>M. boullardii</i>
<i>T. concentricum</i>	<i>M. equinum</i>	<i>M. cookei</i>
<i>T. gourvilii</i>	<i>M. gallinae</i>	<i>M. fulvum</i>
<i>T. kanei</i>	<i>M. persicolor</i>	<i>M. gypseum</i>
<i>T. megninii</i>	<i>T. equinum</i>	<i>M. nanum</i>
<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. praecox</i>
var. <i>interdigitale</i>	var. <i>erinacei</i>	<i>M. racemosum</i>
<i>T. raubitschekii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. ripariae</i>
<i>T. rubrum</i>	var. <i>mentagrophytes</i>	<i>M. vanbreyseghemii</i>
<i>T. schoenleinii</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>T. ajelloi</i>
<i>T. soudanense</i>	var. <i>quinckeanum</i>	<i>T. flavescens</i>
<i>T. tonsurans</i>	<i>T. sarkisarii</i>	<i>T. gloriae</i>
<i>T. violaceum</i>	<i>T. simii</i>	<i>T. longifusum</i>
<i>T. yaeundeii</i>	<i>T. verrucosum</i>	<i>T. phaseoliforme</i>
		<i>T. terrestre</i>
		<i>T. vanbreyseghemii</i>

* Segundo Rubio et al. (1999).

1.4 Distribuição Geográfica

As dermatofitoses têm distribuições universais, predominando nos países tropicais e subtropicais. Diferenças geográficas importantes ocorrem na distribuição das espécies. Alguns dermatófitos são cosmopolitas, enquanto outros apresentam distribuição geográfica restrita. Entretanto, essa restrição nem sempre é estática, uma vez que pode ser influenciada por migrações populacionais

(GAMBALE et al., 1987; IMWIDTHAYA e THIANPRASIT, 1988; AZULAY, 1989; LONDERO e RAMOS, 1989; COSTA et al., 1991; WANKE et al., 1991).

A distribuição das dermatofitoses varia por influência de fatores populacionais; fatores temporais, como sazonalidade e distribuição das espécies no ecossistema; fatores geográficos, por exemplo, a intensidade solar, movimentação da camada atmosférica, índice pluviométrico, regime fluvial, constituição do solo, tipos de vegetação, variedade de animais e densidade populacional de humanos e de animais (RIPPON, 1988; KWON-CHUNG e BENNETT, 1992; ZAITZ, 1992).

1.5 Fatores de Virulência

Fatores de virulência que podem explicar a habilidade dos dermatófitos em colonizar a pele e seus anexos, são enzimas. As principais são as proteinases, particularmente as queratinases que degradam a queratina (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Reações severas produzidas por fungos zoofílicos ou geofílicos são devidas aos níveis mais elevados de enzimas proteolíticas, sendo as reações hospedeiro-específicas. Desse modo, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* produz poucas proteases quando cresce em queratina de gado. No entanto, sintetiza essas enzimas mais ativamente e produz grande variedade de proteases quando cresce em tecidos queratinizados de humanos (ALY, 1994; WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Apesar dos fatores de virulência, acima citados, as maiores manifestações da doença parecem estar relacionadas à resposta do hospedeiro aos antígenos fúngicos (CESTARI et al., 1990).

Entre as classes de antígenos dos dermatófitos destacam-se os glicopeptídeos e as queratinases. A porção protéica dos glicopeptídeos estimula a imunidade celular, enquanto a porção polissacarídica estimula a imunidade humoral do hospedeiro (DAHL, 1993). As queratinases, produzidas pelos dermatófitos, permitem a invasão epidérmica, elicitando uma resposta de

hipersensibilidade do tipo tardia quando injetadas intradermicamente na pele de animais (GRAPPEL e BLANK, 1972).

Alguns dermatófitos produzem substâncias que diminuem a resposta imune. As principais são as mananas, constituintes glicoprotéicos da parede celular que são liberadas durante o crescimento fúngico e podem ser detectadas no soro de pacientes severamente infectados (BLAKE et al., 1991).

1.6 Transmissão

Ao contrário de outras micoses, as dermatofitoses são contagiosas. Podem ser transmitidas por contato direto entre homens ou animais infectados, por contato com unha ou pêlos liberados de lesões ou por meio de fômites contaminados (LACAZ et al., 1991; BARON et al., 1994).

Romano et al. (2001) relataram seis casos de infecção em humanos por *T. verrucosum*, dois apresentaram tinea barbae, dois tinea corporis e os outros tinea capitis. Concluíram que a transmissão foi pelo contato com equinos, bovinos e pessoa infectada. Mostrando a diversidade de formas de contágio do patógeno ao indivíduo suscetível.

1.7 Patogênese

O elemento infeccioso de um dermatófito pode ser um artroconídio ou um fragmento de hifa. No material infectado, esses propágulos podem ficar dormentes por um período prolongado, ou então, germinar quando estimulados por alguns aminoácidos e componentes do ciclo da uréia (BARON et al., 1994; WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Os artroconídios ou fragmentos de hifas crescem rapidamente no extrato córneo de indivíduos sensíveis. Nesse tecido, dispõem-se no interior das células, e a infecção espalha-se centrifugamente (CESTARI et al., 1990; WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Após a infecção, as estruturas queratinizadas, são decompostas enzimaticamente, começando assim, uma resposta inflamatória. Contudo, o fungo

não penetra em outros tecidos, pois não há o substrato e também são inibidos pelas proteínas séricas (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991; KANE et al., 1997).

A tricofitose ataca principalmente animais com menos de um ano de idade, alojados em condições de umidade e pouca iluminação. É uma doença típica de rebanho que pode afetar uma área por anos (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991; MORETTI et al., 1998).

As lesões podem ocorrer por todo o corpo do animal, mas principalmente: na testa, no lombo, área dos olhos e orelhas, na nuca e pescoço. A lesão é pruriginosa com forma anular, eritemato-escamosa, bordas nítidas e vesiculosas. Quando há uso de corticoterapia, as lesões não apresentam tais características (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991).

A infecção natural, em animais, ocorre em quatro estágios: incubação, maturação, formação das crostas, e regressão. A desordem é geralmente autolimitante, mas muito variável. Algumas vezes os animais são curados em três semanas, após iniciado o tratamento, em outras pode levar mais de nove meses para se obter a cura. Após a infecção esses animais podem desenvolver imunidade contra a dermatofitose (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991).

1.8 Importância em Saúde Pública e Veterinária

Em animais domésticos as dermatofitoses desempenham um papel importante como reservatório da zoonose. Em áreas rurais, mais de 80% das infecções fúngicas da pele em humanos podem ser de origem animal. Já nas áreas urbanas, menos de 20% das infecções humanas podem estar relacionadas ao contato direto com animais, como cães, gatos e roedores (CERVANTES e PIJOAN, 1976; RICHARD et al., 1994).

A incidência das dermatofitoses varia de acordo com o clima e os reservatórios naturais, são facilmente transmitidas de um animal para outro, bem como dos animais para o homem, e raramente do homem para os animais (PIER et al., 1994; RICHARD et al., 1994; CABAÑES et al., 1997).

Em locais de clima temperado um levantamento indicou que 10 a 20% da população está cronicamente infectada ou sujeita a recorrentes infecções por dermatófitos (JONES, 1993).

Essas micoses em bovinos aumentaram nos últimos anos, particularmente devido ao aumento na densidade de animais por unidade de área, e maior número de animais confinados com maior contato físico entre esses (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991; WEBER, 2000).

A literatura indica as tricofitoses bovinas não apenas como uma dermatose freqüente, mas como uma dermatose importante para a economia pecuária, resultando em prejuízos econômicos por diminuir o preço de venda dos animais afetados, por perda da produtividade e por produzir danos ao couro. Na Alemanha as perdas financeiras por danos às peles atingem em torno de 15 milhões de marcos por ano e 3,1% dos produtos de couro produzidos no país (WEBER, 2000).

As dermatofitoses são causas significativas de alterações em bovinos, pois afeta um grande número de animais, mas mesmo assim, parece não despertar importância em muitos países. No norte e centro da Europa, é considerada uma das zoonoses mais importantes. Na Suíça, 74% dos tratadores de animais tiveram ou têm alguma dermatofitose, o que indica o caráter de zoonose dessa enfermidade (GARCIA e BLANCO, 2000).

Para a prevenção e o controle das dermatofitoses deve ser levado em consideração a área infectada, o agente etiológico e a fonte de infecção. É importante localizar o animal infectado, principalmente por espécies zoofílicas (*M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*), pois serve de reservatório para esses fungos (RIPPON, 1985).

As infecções produzidas por *M. canis* podem ser detectadas pela luz de Wood. Porém, essa metodologia dificulta observar e eliminar a micose em bovinos quando produzida por *T. verrucosum*, pois os pêlos infectados não apresentam fluorescência. Além, dos pêlos e escamas infectados por *T. verrucosum* sobreviverem durante anos em fômites como cercas de madeira, escovas e outros utensílios dos animais e tratadores (RIPPON, 1985; LATEUR, 2000). Uma boa

higienização dos fômites tem sido eficaz no controle dessas infecções (RIPPON, 1982).

1.9 Terapêutica

No início do século, os compostos utilizados para o tratamento de micoses superficiais apresentavam espectro de ação inespecífico, e não havia antifúngicos sistêmicos (GUPTA et al., 1994a).

O iodo foi uma das primeiras drogas utilizadas para o tratamento de micoses em humanos e animais. É considerado um agente antimicrobiano potente, pois, em concentrações adequadas, pode destruir bactérias, fungos, vírus e protozoários (KOROLKOVAS, 1997/1998).

O mecanismo de ação dessa droga ainda não está totalmente esclarecido (LACAZ et al., 1991). No entanto, por ser um halogênio é considerado agente oxidante, causando inativação enzimática (TRABULSI e TOLEDO, 1996; JAWETZ et al., 1998).

O iodo pode ser complexado com polivinilpirrolidona para formar o iodo-povidona (PVP-I), o qual é descrito como composto orgânico do iodo. Esse composto é denominado iodóforo, mantém o mesmo espectro de ação que o elemento iodo, porém apresenta efeito prolongado após aplicação e maior estabilidade. Seu valor terapêutico e profilático foi clinicamente comprovado em todos os tipos de aplicações tópicas na medicina humana e veterinária (PVP-I, 1998).

No Brasil, os medicamentos veterinários de uso tópico comumente utilizados são larvicidas e cicatrizantes, como: Mata-Bicheira® (OURO FINO), Tanidil® (BAYER), Krona Casco® (KRONA FARM USES) e Ungüento® (FAGRA); além de antissépticos a base de iodo em soluções variando de 5 a 10%; e de uso sistêmico a griseofulvina em casos mais graves (PIER et al., 1994).

Esses medicamentos de uso tópico têm formulações diversas, que vão desde oligoelementos até inseticidas piretróides, apresentam um rendimento satisfatório no tratamento das infecções, mesmo naquelas sem diagnóstico comprobatório de origem fúngica. No entanto, têm sido amplamente utilizados,

principalmente pelo baixo custo em relação aos antifúngicos disponíveis e facilidade no manuseio do medicamento.

Quanto ao tratamento das dermatofitoses em humanos, a griseofulvina é utilizada somente no tratamento sistêmico, enquanto que o fluconazol, itraconazol e terbinafina no tratamento sistêmico e tópico das lesões (PIER et al., 1994; KANE et al., 1997).

A griseofulvina foi descoberta em 1939, sendo isolada de *Penicillium griseofulvum*, e introduzida na prática médica em 1958. Foi o primeiro antifúngico administrado por via oral para o tratamento das dermatofitoses. Esse antifúngico foi utilizado amplamente no tratamento de dermatofitoses durante décadas, no entanto, com o surgimento dos azóis, o mesmo tem tido indicação bastante limitada (PRAZAK et al., 1960; GUPTA et al., 1994a).

A griseofulvina apresenta atividade fungistática *in vitro* para várias espécies de dermatófitos, porém não tem efeito sobre bactérias e outros fungos (LESHER e SMITH, 1987; BENNETT, 1996).

O mecanismo de ação dessa droga ocorre através da desagregação do fuso mitótico mediante a interação com os microtúbulos, provocando, assim, uma inibição no processo de mitose e, conseqüentemente, inibindo a multiplicação do microrganismo (BENNETT, 1996; SIDRIM e MOREIRA, 1999).

Os antifúngicos azólicos incluem duas classes amplas – os imidazóis (cetoconazol) e os triazóis (itraconazol e fluconazol). Ambas as classes compartilham do mesmo espectro antifúngico e mecanismo de ação. Os azóis, como um grupo, têm uma atividade clínica útil contra diversas leveduras e os dermatófitos (BENNETT, 1996).

O principal efeito de imidazóis e triazóis sobre os fungos é a inibição da esterol 14- α -desmetilase, um sistema enzimático microsomal dependente do citocromo P450. Prejudicando, portanto, a biossíntese do ergosterol na membrana citoplasmática e conduzindo a um acúmulo de 14- α -metilesteróis. Esses metilesteróis podem desagregar as cadeias dos fosfolipídios e prejudicar as funções de determinados sistemas enzimáticos ligados à membrana, aumentando sua permeabilidade, inibindo o crescimento do fungo (BENNETT, 1996).

O itraconazol e o fluconazol são considerados eficazes por suas propriedades farmacocinéticas. Nos tecidos queratinosos alcançam concentrações 3 a 10 vezes superiores às plasmáticas (MEINHOF, 1993; GUPTA et al., 1994b). No entanto, além de produzirem efeitos adversos, ambos são caros e, principalmente para o fluconazol, têm sido observadas falhas terapêuticas e resistência *in vitro* de muitos fungos, inclusive dermatófitos (KEAY et al., 1991; BODEY, 1992; MONTERO-GEI e PERERA, 1992; GUPTA et al., 1994b; LE GUENNEC et al., 1995; SOARES e CURY, 1995; VALENTIN et al., 1996).

No Brasil e em outros países, entre as alilaminas somente a terbinafina encontra-se comercialmente disponível; tem sido indicada para tratamento de micoses superficiais e cutâneas, principalmente dermatofitoses (REYNOLDS e PRASAD, 1993; BENNETT, 1996; KOROLKOVAS, 1997/1998).

As alilaminas impedem a biossíntese do ergosterol, um constituinte essencial das membranas celulares fúngicas. Essa ação é decorrente da inibição da enzima esqualeno-epoxidase pela droga, inibindo o ergosterol. É importante salientar que apesar das alilaminas possuírem um mecanismo de ação semelhante ao dos derivados azólicos, elas atuam independentemente do citocromo P450 (GUPTA et al., 1994b; BENNETT, 1996; SIDRIM e MOREIRA, 1999).

1.10 Diagnóstico Laboratorial

A presença das lesões típicas é uma indicação de dermatofitose, mas o diagnóstico deve ser confirmado pelo exame direto e o cultivo, sendo que esse último, permite definir o agente etiológico, com o qual pode-se deduzir a evolução do processo, conhecer sua fonte de origem e estabelecer o tratamento (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991; ZAROR e BUSTAMANTE, 1998).

Segundo Cabañes (2000), o diagnóstico laboratorial das dermatofitoses em animais, representa a maior demanda de exames em laboratório de micologia veterinária.

Os dermatófitos bem como os demais fungos filamentosos apresentam crescimento radial, dessa forma, o centro da lesão é composto de material pouco

viável, sendo então, a coleta recomendada sempre na borda da lesão (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

O exame com luz de Wood é usado para identificar com rapidez os pêlos e cabelos infectados pelas espécies do gênero *Microsporum* que apresentam fluorescência esverdeada. As infecções produzidas pelo gênero *Trichophyton* não fluorescem, com exceção do *T. schoenleinii* (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995; ZAITZ, 1998).

A cultura é um complemento valioso e essencial no diagnóstico das dermatofitoses. A literatura recomenda, para o isolamento primário, o uso de um meio seletivo contra fungos filamentosos não dermatófitos e bactérias, o qual apresenta em sua composição a cicloheximida e o cloranfenicol (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

A taxonomia tradicional dos dermatófitos está baseada essencialmente na macro e micromorfologia, com menor ênfase na fisiologia e nutrição. Contudo, a identificação das cepas isoladas tem sido complicada por suas semelhanças, variabilidade e pleomorfismo (WEITZMAN e SUMMERBELL, 1995).

Achados genotípicos têm sido utilizados para resolver problemas taxonômicos relacionados aos dermatófitos. Já que, características genotípicas são consideradas mais estáveis e precisas que as fenotípicas (GRÄSER et al., 1998; LIU et al., 2000).

Recentemente, várias técnicas de biologia molecular têm sido disponibilizadas para o diagnóstico clínico, quase todas essas metodologias envolvem PCR (*polymerase chain reaction*). O PCR sintetiza uma alta quantidade de DNA uniforme disponível para sequenciamento e análise de RFLP - *restriction fragment length polymorphism* (ELIAS COSTA et al., 2000).

Métodos moleculares trouxeram importante progresso na distinção entre espécies e cepas. A maioria dessas técnicas são complexas, laboriosas, consomem muito tempo, e não são facilmente empregadas para identificação de dermatófitos em rotina (FAGGI et al., 2001).

1.11 Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos *in vitro*

Os testes de suscetibilidade *in vitro* fornecem uma medida segura das atividades de dois ou mais agentes antifúngicos; correlaciona-se com a atividade *in vivo* e predizem a melhor terapia, fornecem uma medida com a qual monitora-se o desenvolvimento de resistência em uma população de organismos normalmente suscetíveis, e predizem o potencial terapêutico de novos agentes descobertos (ESPINEL-INGROFF, 1996, 1997; PFALLER et al., 1997).

Os métodos mais utilizados para determinar a suscetibilidade a antifúngicos incluem, diluição em caldo (macro e microdiluição), diluição em ágar e difusão em ágar (ESPINEL-INGROFF et al., 2000).

Os resultados dos testes de suscetibilidade que envolve as técnicas de diluição em caldo ou em ágar, podem ser expressos em termos de concentração inibitória mínima (CIM), considerada a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento do microrganismo em questão. Esses testes podem também ser expressos em termos de concentração fungicida mínima (CFM), considerada a menor concentração da droga capaz de matar o fungo (CURY e MICHE, 1989; ALVES et al., 1992; LE GUENNEC, 1995; FURTADO e MINAMI, 1997; MURRAY, 1999).

Apesar de o número de infecções por fungos filamentosos serem menores do que por leveduras, o teste de suscetibilidade a antifúngicos dos bolores pode ser um importante guia de seleção de agente antifúngico para o tratamento dessas doenças (ESPINEL-INGROFF et al., 1997).

O desenvolvimento de um método de padronização dos testes de suscetibilidade a antifúngicos para fungos filamentosos representa o maior desafio. Vários estudos realizados pela NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) têm avaliado os problemas de preparação do inóculo e a reprodutibilidade dos testes de macro e microdiluição bem como sua correlação *in vivo* e *in vitro* (ESPINEL-INGROFF et al., 1995; ODDS et al., 1998).

Segundo Jessup et al. (2000), Meletiadis et al. (2000) e Pfaller et al. (2000), os seguintes parâmetros: meio de cultura RPMI-1640, temperatura de incubação de 35°C, tempo de incubação de 4 dias, e inóculo de 10³ conídios/mL, são

avaliados para determinação das suscetibilidades de dermatófitos pelo método da diluição em caldo.

O meio de cultura deve conter substâncias que favoreçam o crescimento do fungo, mas que não antagonizem e nem interfiram no mecanismo de ação da droga. Em 1992, o *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS), preconizou a realização da macrotécnica da diluição em caldo, utilizando o meio RPMI-1640 como procedimento padrão para os testes com as diferentes classes de antifúngicos (ITOYAMA et al., 1994; NCCLS, 1997).

A temperatura e o tempo de incubação devem ser determinados pela velocidade de crescimento do fungo e pela estabilidade do antifúngico a ser avaliado. O tempo de incubação acompanha o crescimento de cepas padrão, que resultam em 24-48 horas para as leveduras e cerca de 7 dias para os dermatófitos (POLONELLI e MORACE, 1984; RUSTÂN et al., 1987; ALVES et al., 1992; BUTTY et al., 1995; TORNATORE et al., 1997).

Para a preparação do inóculo, devem-se considerar as propriedades morfofisiológicas do fungo, a concentração e o volume da suspensão, bem como, a idade da cultura, a partir da qual o inóculo é preparado (MURRAY, 1999).

O pH influi na estabilidade do antifúngico, na velocidade de crescimento dos fungos e na atividade das drogas. O efeito do pH é mais ou menos pronunciado de acordo com a classe do antifúngico (GADEA et al., 1997; MURRAY et al., 1999).

Alguns autores sugerem que os antifúngicos sejam avaliados em pH 7,0, pois refletem as condições biológicas do organismo do homem, permite o crescimento dos fungos e não interfere na ação da maioria das drogas. Desse modo, torna-se necessário o uso de solução tampão, que não deve interferir na atividade dos antifúngicos nem ser tóxico para os fungos, sendo recomendado o tampão MOPS - Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico (ITOYAMA et al., 1994; GADEA et al., 1997; NCCLS, 1997; TORNATORE et al., 1997).

Para a realização dos testes de suscetibilidade *in vitro*, é muito importante conhecer as características físico-químicas da droga, bem como, seus mecanismos de ação, entre outros fatores, a fim de se evitar falsos resultados (REYNOLDS e PRASAD, 1993; MURRAY et al., 1999).

A leitura dos testes é determinada pela presença ou ausência de crescimento do fungo, através de inspeção visual, medida de densidade óptica ou turbidimétrica, liberação de dióxido de carbono, entre outros (PFALLER et al., 1995).

Os testes de diluição em caldo apresentam dificuldade de leitura do ponto final (endpoint) com os azóis, devido à solubilização parcial desses antifúngicos. Isso resulta em depósito ou turvação, ou em inibições parciais e crescimento residual. Desse modo, devem ser incluídos nos testes microrganismos controles, ou seja, que apresentem CIM conhecido para determinados antifúngicos (NNCLS, 1997; MURRAY et al., 1999).

Em adição, também devem ser avaliados os seguintes itens quanto à interferência no teste: a esterilidade do meio de cultura, a viabilidade e atividade de crescimento do inóculo, e o solvente utilizado na solubilização da droga (McGINNIS e RINALDI, 1986).

Durante vários anos os animais domésticos infectados, bem como os animais saudáveis têm sido reconhecidos como reservatórios para os dermatófitos zoonóticos potencialmente patogênicos (ALTERAS et al, 1986; BAGY 1986).

No entanto, informações sobre a microbiota fúngica em animais domésticos, principalmente em bovinos, são limitadas no mundo inteiro (BAGY e ABDEL-HAFEZ, 1985; BAGY, 1986; ZAROR et al., 1986). Em nosso meio, não foram encontradas publicações sobre esse assunto de grande importância epidemiológica.

Os dermatófitos são, também, importantes para o homem, sendo agentes de dermatofitoses em grande parte da população e muitos são resistentes ao tratamento, além de, pouco se conhecer sobre a suscetibilidade *in vitro* desses fungos frente as principais drogas antifúngicas por métodos preconizados e recomendados recentemente pelo NCCLS (1998).

2. OBJETIVOS

- Isolar e identificar os agentes etiológicos das dermatofitoses em bovinos e de ambientes onde permaneciam esses animais, em período de seca e chuva.
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* dos dermatófitos isolados, frente a itraconazol, terbinafina e fluconazol pelo método da macrodiluição em caldo.
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* dos dermatófitos isolados, frente ao LEPECID®, solução de iodo a 5% e UNGÜENTO® spray pelo método da difusão em ágar.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Durante o período de abril de 2001 a outubro de 2002 foram avaliadas 538 amostras provenientes de animais, do ambiente e do solo (Tabela 3). As amostras foram coletadas na Fazenda Canchim no município de São Carlos – SP (Embrapa Pecuária Sudeste) e na região sul do estado de Mato Grosso do Sul, nas seguintes propriedades rurais: Agropecuária Matoverde no município de Douradina, Agropecuária Larissa no município de Ponta Porã e Fazenda Santa Fé das Cachoeiras no município de Antônio João (Apêndices B e C), com a supervisão dos respectivos médicos veterinários.

Tabela 3: Distribuição das amostras segundo o local de coleta.

Amostras	São Carlos – SP Nº	Sul do MS Nº	Total
Animais com lesão	41	4	45
Animais aparentemente saudáveis	441	22	463
Ambiente	18	0	18
Solo	8	4	12
Total	508	30	538

3.2 Coleta

Após a limpeza dos cascos com água corrente e escovão, foram raspadas as escamas com bisturi e acondicionadas em placas de Petri esterilizadas descartáveis.

Escamas de pele e o pêlo foram obtidos com auxílio de pedaços de carpete esterilizados - técnica de Mariat e Tapia (MARIAT e TAPIA, 1966), friccionados assepticamente contra a pele dos animais (KOMAREK e WURST, 1989; ZAROR e ALIAGA, 1990). Após a coleta, os pedaços de carpete foram acondicionados no próprio invólucro de transporte (Figura 1).

As amostras do ambiente: cochos, palanques e dos locais onde os animais se coçavam, foram obtidas pela técnica de Mariat e Tapia (MARIAT e TAPIA, 1966).

Cerca de 30g da camada superficial do solo foram coletadas aleatoriamente dos locais onde os animais eram mantidos (curral, piquetes e invernadas) com auxílio de uma pá de jardinagem e acondicionadas em frascos de plásticos esterilizados.

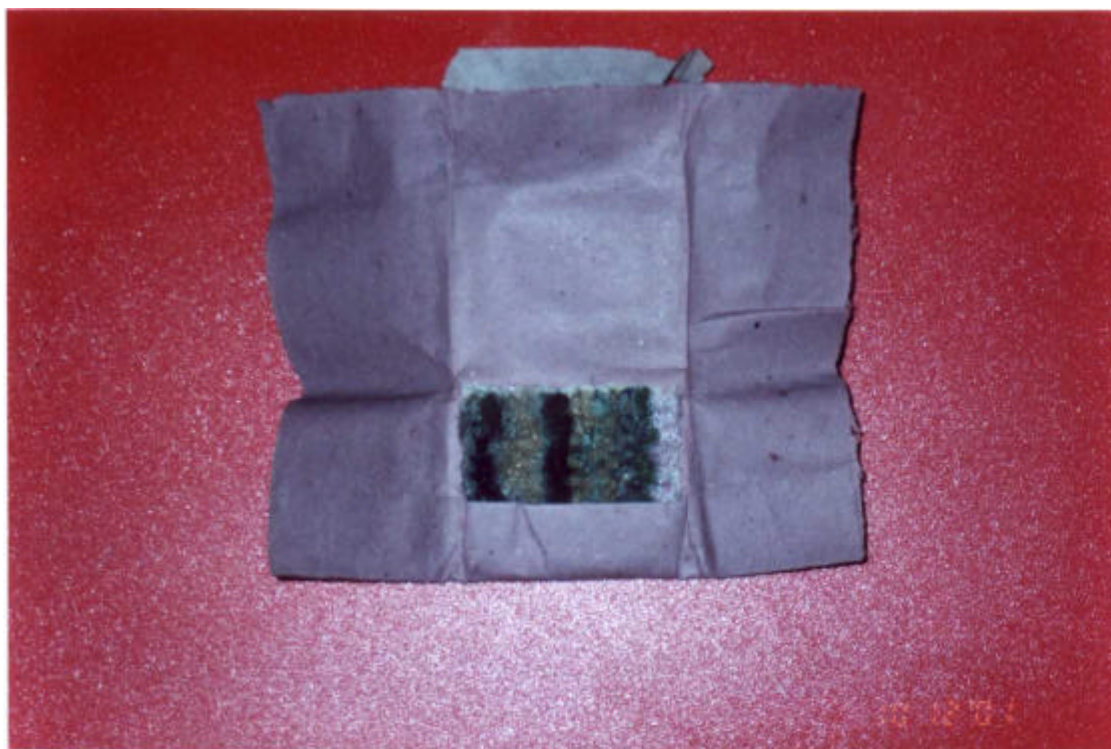


Figura 1: Vista de carpete utilizado nas coletas com respectiva embalagem.

3.3 Meios de cultura

- Ágar Sabouraud-dextrose (LACAZ et al., 1991)

Composição

Dextrose	20g
Peptona	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

Preparação:

A peptona e o ágar foram diluídos em água destilada. Após a fusão do ágar foi acrescentada a dextrose. O meio foi distribuído em tubos (18x180mm) e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização e solidificação em posição inclinada, o meio foi conservado em geladeira.

Objetivo: Foi utilizado para isolamento das amostras e manutenção das cepas.

- Dermatophyte Test Medium – DTM (LACAZ et al., 1991)

Composição

<i>Selective agar for pathogenic fungi</i>	33g
Solução de vermelho de fenol 0,5%	40mL
HCl 0,8M	6mL
Água destilada	1000mL

Preparação:

Após a fusão do *selective agar for pathogenic fungi*, foi adicionado o vermelho de fenol e o HCl, e homogeneizados. O meio foi distribuído em tubos (18x180mm) e balão, a seguir, foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, o meio contido no balão foi distribuído em placas de Petri (90x15mm), e o outro solidificado em posição inclinada. Ambos foram conservados em geladeira.

Objetivo: Meio utilizado para o isolamento de dermatófitos. Propicia uma identificação rápida dos dermatófitos através da mudança da cor original do meio (amarelo) para vermelho devido à mudança de pH. Essa transformação ocorre em decorrência da capacidade desses fungos em utilizar precocemente as proteínas do meio, tornando-o alcalino (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

▪ Ágar Trichophyton 3 (KANE et al., 1997)

Composição

Trichophyton agar 3	59g
Água destilada	1000mL

Preparação: O ágar foi misturado em água destilada num balão e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri (90X15mm) e conservado em geladeira.

Objetivo: Meio utilizado para o isolamento de *T. verrucosum*.

▪ Ágar Trichophyton 4 (KANE et al., 1997)

Composição

Trichophyton agar 4	59g
Água destilada	1000mL

Preparação: O ágar foi misturado em água destilada num balão e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, o meio foi distribuído em placas de Petri (90X15mm) e conservado em geladeira.

Objetivo: Meio utilizado para o isolamento de *T. verrucosum*.

- Ágar batata (LACAZ et al., 1991)

Composição

Infusão de batatas	500mL
Ágar	15g
Glicose	10g
Água	500mL

Preparação:

Após lavar e cortar em pequenos pedaços 200g de batatas, esses foram colocados em 500ml de água e submetidos à fervura, lentamente, até cozinhar. Em seguida, a infusão de batatas foi filtrada com gaze e o volume completado para 1 litro com água. A seguir, foi adicionado o ágar, após fervura foi adicionada a glicose. O meio foi homogeneizado, distribuído em tubos (18X180mm) e esterilizado em autoclave a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização e solidificação em posição inclinada, o meio foi conservado em geladeira.

Objetivo: Meio utilizado para estimulação da esporulação.

- Ágar Sabouraud-dextrose com 5% de NaCl (KANE et al., 1997)

Composição

Dextrose	20g
Peptona	10g
NaCl	50g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

Preparação:

Os componentes foram homogeneizados em água destilada em balão e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, foi distribuído em placas de Petri (90X15 mm) e conservado em geladeira.

Objetivo: Foi utilizado para identificação de características morfológicas.

▪ Ágar Peptona (KANE et al., 1997)

Composição

Peptona	10g
Ágar	15g
Água destilada	1000mL

Preparação:

Os componentes foram homogeneizados em água destilada em balão e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Após a esterilização, foi distribuído em placas de Petri (90X15 mm) e conservado em geladeira.

Objetivo: Foi utilizado para identificação de características morfológicas da cepa de animal sem lesão identificada apenas como do gênero *Microsporum*.

▪ Ágar uréia de Christensen (LACAZ et al., 1991)

Composição

Peptona	1g
Dextrose	1g
Cloreto de Sódio	5g
Fosfato de potássio monobásico	2g
Vermelho de fenol	0,012g
Ágar	15g
Água destilada.....	1000mL

Preparação:

Todos os componentes foram homogeneizados em balão, com exceção da uréia, e esterilizados em autoclave a 120°C durante 20 minutos. O meio foi resfriado à aproximadamente 50°C e, a seguir, adicionada assepticamente a uréia. O meio foi homogeneizado, distribuído em tubos (15X100mm) esterilizados,

solidificado em posição inclinada e conservado em geladeira.

Objetivo: Meio utilizado para obtenção de característica bioquímica das amostras. Esse teste se baseia na capacidade de determinadas espécies de dermatófitos de produzirem a enzima urease, a qual hidrolisa a uréia, liberando amônia e alcalinizando o meio, fazendo com que a coloração do mesmo vire de amarelo para rosa-escuro, em toda a extensão do meio. Leituras após 7 dias de incubação não são consideradas, pois os dermatófitos liberam metabólitos alcalinos que promovem a mudança da coloração do meio, resultando falso-positivo (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

▪ Meio RPMI-1640 (NCCLS, 1997)

Composição

RPMI-1640	10,4g
Glicose	20,0g
MOPS	34,53g
Água destilada	1000,0mL
pH	7,0

Preparação:

O tampão MOPS foi diluído em água destilada, a seguir, foi acrescentado à glicose e o RPMI-1640. O pH foi ajustado em pHmetro utilizando NaOH 10N na quantidade necessária para obtenção do pH 7,0. O meio foi esterilizado por filtração em Millipore com membrana biológica 0,22µm, em câmara de fluxo laminar. O meio foi distribuído em frascos de vidro esterilizados e conservado em geladeira por até duas semanas após a preparação.

Objetivo: Foi utilizado nos testes de suscetibilidade a antifúngicos. Esse meio foi preconizado pelo NCCLS para a realização da macrotécnica de diluição em caldo.

- Meio utilizado no método de difusão em ágar (PFALLER et al., 2000)

Composição

Solução A:

RPMI-1640	10,4g
Glicose	20,0g
MOPS	34,53g
Água destilada	500,0mL
pH	7,0

Preparação:

O tampão MOPS foi diluído em água destilada, a seguir, foi acrescentado à glicose e o RPMI-1640. O pH foi ajustado em pHmetro utilizando NaOH 10N na quantidade necessária para obtenção do pH 7,0. O meio foi esterilizado por filtração em Millipore com membrana biológica 0,22µm, em câmara de fluxo laminar. O meio foi distribuído em frascos de vidro esterilizados e conservado em geladeira por até duas semanas após a preparação.

Solução B:

Ágar	20g
Água destilada	500mL

Preparação:

Após a fusão do ágar em água destilada, 20mL do meio foram distribuídos em tubos rosqueados (22X250mm), autoclavados a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, o meio foi resfriado à aproximadamente 50°C e adicionado 20mL da solução A. O meio foi distribuído em placas de Petri (20X150mm).

Objetivo: Meio utilizado para os testes de suscetibilidade a medicamentos de uso veterinário pelo método de difusão em ágar. O meio de RPMI-1640 foi escolhido por apresentar uma composição química definida que não interfere nas drogas antifúngicas (NORRIS et al., 1999).

3.4 Isolamento

As primeiras 50 amostras foram inoculadas simultaneamente nos meios DTM (*Dermatophyte Test Medium*), ágar seletivo para fungos patogênicos e ágar Sabouraud-dextrose (ASD) acrescido de cloranfenicol. As amostras coletadas com pedaços de carpete foram semeadas no centro da placa de Petri (60X15mm) por *in print* (aproximadamente 1 minuto). Os respectivos meios foram incubados a 30°C por até 30 dias, com observação diária. Como não houve crescimento fúngico no DTM e houve um crescimento exacerbado no ASD, as amostras seguintes (n=488) foram semeadas, conforme descrito acima, somente em placas de Petri (60X15mm) contendo o meio ágar seletivo para fungos patogênicos e incubadas a 30°C por até 4 semanas (KANE et al., 1997).

As amostras provenientes de lesões circulares e verrugosas, com características de tricofitose, também foram semeadas, em triplicata, por *in print* nas placas de Petri (60X15mm) contendo ágar *Trichophyton* 3 e ágar *Trichophyton* 4, e incubadas nas condições descritas acima (KANE et al., 1997).

3.5 Amostras do solo

Aproximadamente 30g de terra, foi diluída em cerca de 100mL de água destilada. A seguir foi misturada vigorosamente com um bastão e deixada em repouso por cerca de 30 minutos. A suspensão foi agitada novamente e mantida em repouso por mais 30 minutos. Após esse tempo, 100µL do sobrenadante foi semeado em ágar seletivo para fungos patogênicos, por toda extensão da placa com auxílio de um bastão de vidro em L. Foram incubadas a 30°C por até 4 semanas - modificação da técnica descrita por Pelczar (1996).

3.6 Identificação

As colônias suspeitas de dermatófitos foram reisoladas em placas de Petri contendo o meio ágar seletivo para fungos patogênicos para posterior identificação. Após 1 semana de incubação a 30°C, as colônias foram repicadas em tubos contendo ASD, incubadas a 30°C durante 7-10 dias e identificadas pelas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas.

As características macromorfológicas foram vistas após semeadura de um bloco da cultura, de aproximadamente 0,5cm, na superfície do meio ASD contido em placas de Petri e incubados a 30°C durante 10-14 dias. Decorrido esse tempo, foram avaliados o aspecto e a coloração do anverso e reverso da colônia (KANE et al., 1997).

As características micromorfológicas, dos macro e microconídios, foram analisadas em objetiva de 40X, após crescimento em ASD e ágar batata, pelo método do cultivo em lâmina - microcultivo (KANE et al., 1997).

As características bioquímicas e fisiológicas foram avaliadas, em alguns casos, por: prova da urease, teste da perfuração de pêlo *in vitro*, crescimento em: ASD com 5% de NaCl, em ágar peptona e em arroz autoclavado (KANE et al., 1997).

Os fungos filamentosos não-dermatófitos foram identificados pelas características morfológicas (macro e microscópicas), a partir do crescimento em meio ágar seletivo para fungos patogênicos em período de 3 a 15 dias de incubação a 30°C.

Microcultivo em lâmina

Foram preparadas e esterilizadas placas de Petri (90X15mm) forrada com papel de filtro contendo uma lâmina apoiada sobre um suporte (bastonete de vidro em V). Com auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada retirou-se blocos (com aproximadamente 1cm²) de ágar batata contido em placas de Petri. Esses blocos foram dispostos de forma asséptica sobre as lâminas acondicionadas nas placas de Petri. Nas quatro faces do bloco de ágar batata foram feitos repiques da colônia em estudo. A seguir, o bloco foi coberto com uma lamínula esterilizada e o papel de filtro foi umedecido com aproximadamente 5mL de água esterilizada. As placas foram incubadas a 30°C por 7-10 dias. Decorrido esse tempo, as lamínulas eram retiradas e colocadas sobre uma lâmina limpa contendo 1 gota de lactofenol azul de algodão e observadas em objetiva de 40X.

Prova da urease

O teste foi feito por meio da semeadura de um pequeno fragmento da colônia em ágar uréia de Christensen, incubado a 30°C por até 7 dias, com observação diária. O resultado foi considerado positivo quando, após o crescimento fúngico, ocorreu a modificação na coloração do meio, que passou de amarelo a rosa-escuro.

Teste da perfuração do pêlo *in vitro*

Numa placa de Petri (90X15mm) forrada com papel de filtro, foram colocados alguns pedaços (aproximadamente 1cm) de fio de cabelo de criança, pois provavelmente estão isentos de produtos químicos (tintura, etc.). O conjunto foi esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após esfriar, foram adicionados 20mL de água destilada, três gotas de extrato de levedura a 10%, ambos previamente esterilizados e fragmentos da colônia de dermatófito. As placas de Petri foram incubadas a 30°C por 4 semanas. Periodicamente, era retirado um fio de cabelo, colocado sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol azul-algodão, coberto com lamínula e observado em microscópio óptico. O teste foi considerado positivo quando ocorreu perfuração do pêlo em forma de cunha (KERN e BLEVINS, 1999).

Crescimento em arroz autoclavado

Foram colocados alguns grãos de arroz crus e sem casca em uma placa de Petri (30X20mm) de diâmetro, com um pouco de água destilada e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após a esterilização, foi adicionado um fragmento da colônia e incubado a 30°C por até 2 semanas.

Esse teste é particularmente útil na identificação dos fungos do gênero *Microsporum*, uma vez que esse meio favorece o desenvolvimento de macroconídios típicos de cada espécie, bem como de pigmentos (SIDRIM e MOREIRA, 1999).

Crescimento em ASD com 5% de NaCl

Blocos de aproximadamente 1cm da colônia foram repicados no centro das placas contendo o referido meio. Após incubação a 30°C por até 2 semanas, observou-se o crescimento.

Esse meio fornece informações sobre a tolerância ao sal e promove a formação de macroconídios em algumas espécies de *Trichophyton* e *Microsporum* (KANE et al., 1997).

Crescimento em ágar peptona

Blocos de aproximadamente 1cm da colônia foram repicados no centro das placas de Petri (90X15mm) contendo o referido meio e incubados a 30°C por até 2 semanas.

Esse meio foi utilizado para estimular a esporulação e pigmentação de amostra suspeita de *M. persicolor* (KANE et al., 1997).

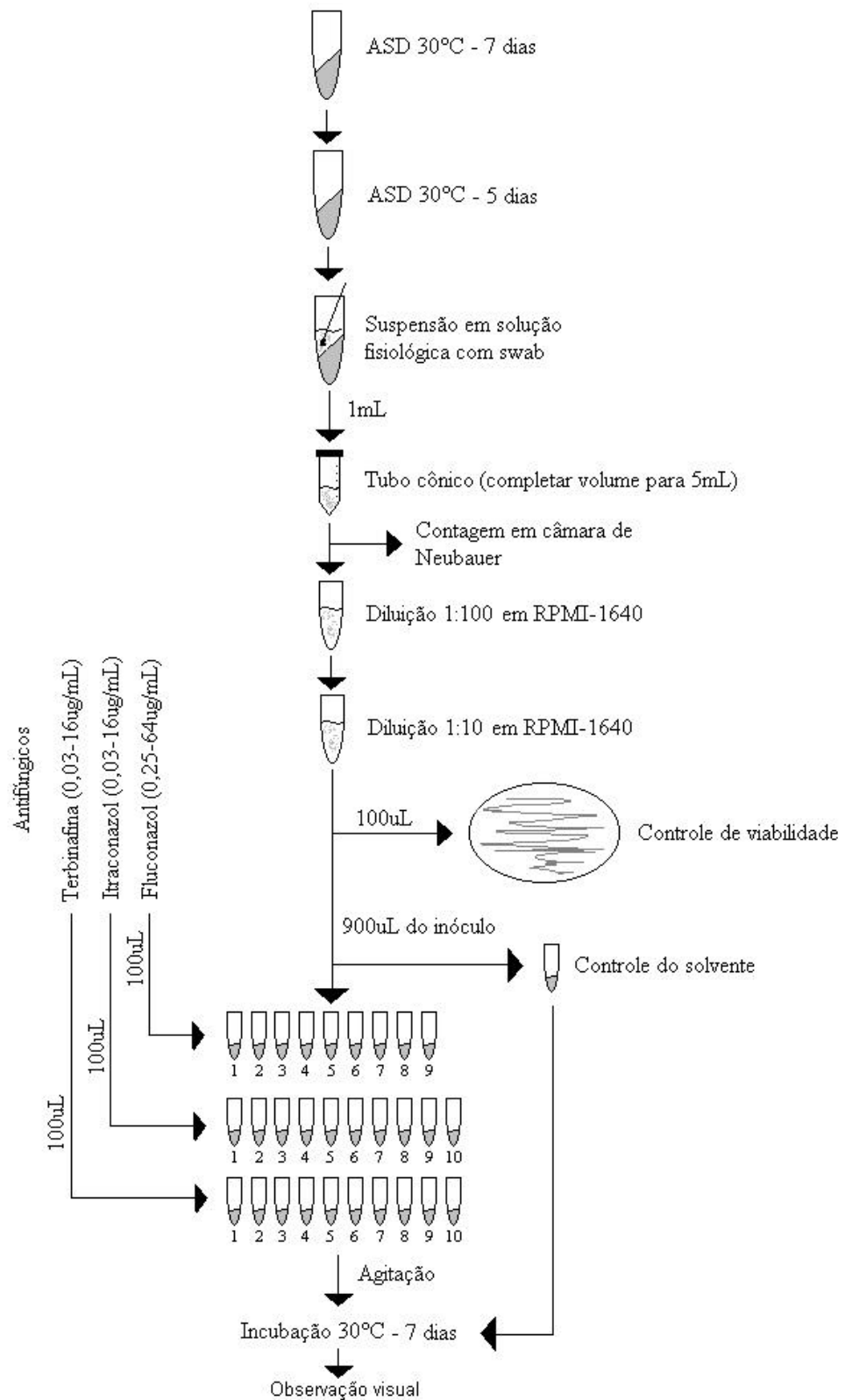
3.7 Testes de Suscetibilidade a Antifúngicos

Método da macrodiluição em caldo (Figura 2)

Foram utilizados três antifúngicos: fluconazol na concentração de 0,25 a 64µg/mL, itraconazol e terbinafina na concentração de 0,03 a 16µg/mL, sob forma de referência em pó. Os tubos foram incubados a 30°C e após 5 dias, o resultado foi obtido por observação visual.

Foi utilizado o meio RPMI-1640 acrescido de glicose e tampão MOPS (Ácido 3-N-morfolinopropanossulfônico) em pH 7,0.

Soluções estoque: foram preparadas em tubos rosqueados (22X250mm) esterilizados. O fluconazol foi solubilizado em água destilada esterilizada, nas seguintes concentrações: 5120µg/mL, 640µg/mL, 160µg/mL e 20µg/mL. O itraconazol e a terbinafina foram preparados com o solvente dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1600µg/mL e 200µg/mL. Após a solubilização das drogas, aguardou-se trinta minutos para auto-esterilização das mesmas. As soluções foram preparadas no dia do experimento e foram diluídas para obtenção



das concentrações desejadas conforme apresentado nas tabelas 4 e 5. As concentrações intermediárias foram distribuídas em tubos (12X75mm) previamente autoclavados, na quantidade de 0,1mL.

Inóculos: foram preparados conforme padronização feita por Candido et al. (2001). Os dermatófitos foram semeados em tubos (18X180mm) contendo meio ASD, após 7 dias de incubação a 30°C os fungos foram repicados novamente em tubos (18X180mm) contendo o mesmo meio e incubados a 30°C por 5 dias. A seguir, foi adicionado ao tubo 1mL de solução salina 0,85% esterilizada e após homogeneização com *swab* esterilizado, obteve-se uma suspensão de conídios que foi transferida para um tubo cônico graduado esterilizado e o volume completado para 5 ml com solução salina 0,85% esterilizada. Dessa suspensão foi feita à contagem de conídios em câmara de Neubauer e padronizado para conter aproximadamente 1 a 5×10^6 UFC/mL. A seguir, essa suspensão de conídios foi diluída (1:1000) em meio RPMI-1640 para a obtenção de um inóculo contendo aproximadamente 1 a 5×10^3 UFC/mL.

Foi adicionado 0,9mL da suspensão de conídios contendo 1 a 5×10^3 UFC/mL, em tubos (12X75mm) contendo 0,1mL das drogas nas respectivas concentrações. Após agitação em mixer, os tubos foram incubados a 30°C por 7 dias.

O controle de viabilidade do inóculo foi feito após semeadura de 100µL da suspensão de conídios contendo 1 a 5×10^3 UFC/mL em meio ASD por toda extensão da placa de Petri (90X15mm), com auxílio de um bastão de vidro em L. Após incubação a 30°C por 5 dias foi observado o crescimento fúngico e contagem de UFC/placa por mL conforme a seguinte equação:

$$\text{UFC/mL} = \text{UFC/placa} \times 10 \times 1000$$

UFC/placa = n° de colônias na placa

10 = fator quantidade (µL para mL)

1000 = fator diluição (1:1000)

Tabela 4: Protocolo de diluição do fluconazol.

Concentração Inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Volume (mL) + RPMI (mL)	Concentração Intermediária ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Final ($\mu\text{g/mL}$)	Tubo
5120	0,5 + 3,5	640	64	1
640	1,0 + 1,0	320	32	2
640	0,5 + 1,5	160	16	3
160	1,0 + 1,0	80	8	4
160	0,5 + 1,5	40	4	5
160	0,5 + 3,5	20	2	6
20	1,0 + 1,0	10	1	7
20	0,5 + 1,5	5	0,5	8
20	0,5 + 3,5	2,5	0,25	9

Tabela 5: Protocolo de diluição do itraconazol e terbinafina.

Concentração Inicial (µg/mL)	Volume (mL) + DMSO (mL)	Concentração Intermediária A (µg/mL)	Volume (mL) + RPMI (mL)	Concentração Intermediária B (µg/mL)	Concentração Final (µg/mL)	Tubo
1600	-	-	0,2 + 1,8	160	16	1
1600	0,5 + 0,5	800	0,2 + 1,8	80	8	2
1600	0,5 + 1,5	400	0,2 + 1,8	40	4	3
1600	0,5 + 3,5	200	0,2 + 1,8	20	2	4
200	0,5 + 0,5	100	0,2 + 1,8	10	1	5
200	0,5 + 1,5	50	0,2 + 1,8	5	0,5	6
200	0,5 + 3,5	25 ⁺	0,2 + 1,8	2,5	0,25	7
25*	0,5 + 0,5	12,5	0,2 + 1,8	1,25	0,12	8
25*	0,5 + 1,5	6,25	0,2 + 1,8	0,625	0,06	9
25*	0,5 + 3,5	3,125	0,2 + 1,8	0,3125	0,03	10

* Diluições feitas a partir da concentração intermediária A de 25⁺ µg/mL.

Método de difusão em ágar (Figura 3)

Foram avaliados três medicamentos tópicos de uso veterinário: LEPECID® (Dow AgroSciences) e UNGÜENTO® SPRAY (Vansil) nas formulações comercializadas, e iodo a 10% (Pinus) diluído (v/v) em etanol (concentração final 5% - Apêndice D).

O cetozonazol foi diluído em DMSO para se obter uma concentração de 1280µg/mL, e a seguir, diluído 1:10 no meio RPMI-1640 para obter a concentração utilizada como controle positivo de 128µg/mL. A concentração de DMSO foi inferior a 10%, já que, nesta concentração pode inibir o crescimento do microrganismo avaliado. Foi utilizada como controle negativo, uma solução do meio de cultura RPMI-1640 com 5% de DMSO.

Os dermatófitos foram semeados em tubos (18X180mm) contendo ágar batata e incubados a 30°C por 6 dias. A seguir, foi obtida suspensão dos conídios em solução fisiológica 0,85% esterilizada com auxílio de *swab* esterilizado. Essa suspensão de conídios foi retirada com pipeta Pasteur, previamente autoclavada, e colocada em tubo cônico graduado esterilizado. O volume foi completado para 5mL com solução fisiológica 0,85% esterilizada, a suspensão foi agitada durante 15 segundos em vortex e, a seguir, sedimentada durante 5 minutos. Decorrido esse tempo, foi feita a contagem de conídios em câmara de Neubauer para a obtenção de 1 a 5×10^5 UFC/mL. Alíquota de 300µL da suspensão foi adicionada no meio de cultivo (*pour plate*).

Para o controle de viabilidade do inóculo, esta suspensão foi diluída em 1:1000 no meio RPMI-1640 e semeados 100µL por toda a extensão da placa de Petri contendo o meio ASD, com auxílio de bastão de vidro em L. Após incubação a 30°C por 5 dias foi observado o crescimento fúngico e contagem de UFC/placa por mL conforme citado anteriormente no método da macrodiluição em caldo.

Após a solidificação do meio de cultivo em placas de Petri (150X20mm), foram confeccionados poços, inserindo a parte de maior diâmetro de ponteiros de 100µL e os blocos foram retirados com a ponta das ponteiros. Em cada poço

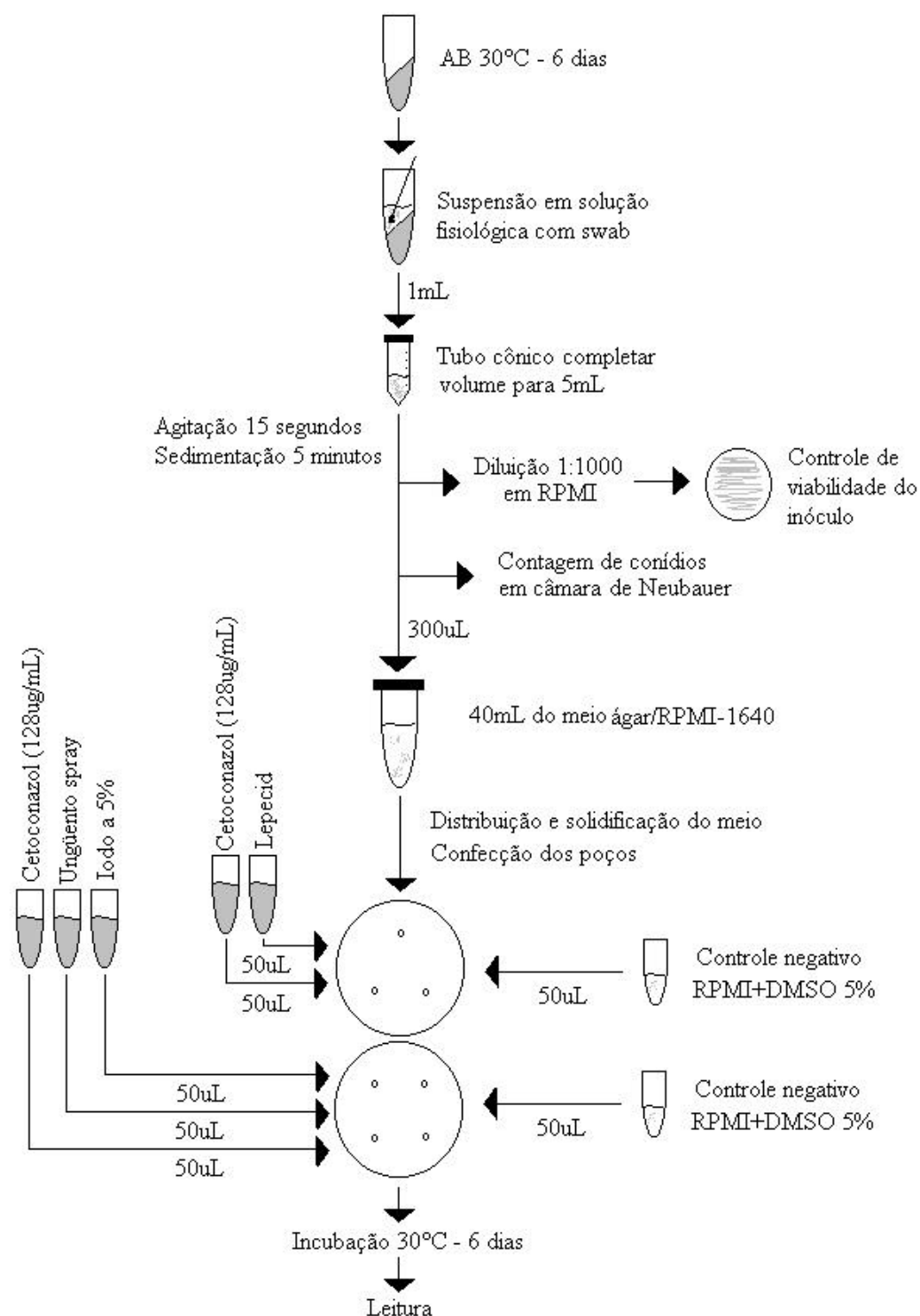


Figura 3: Suscetibilidade dos dermatófitos aos medicamentos de uso veterinário pelo método de difusão em ágar.

foram adicionados respectivamente, 50µL das soluções controle positiva (cetoconazol), negativa (solução RPMI -1640 com 5% de DMSO) e drogas-teste.

Estas placas foram mantidas à temperatura ambiente por cerca de duas horas e depois incubadas a 30°C por seis dias. Decorrido o período de incubação, o diâmetro das zonas de inibição do desenvolvimento fúngico foi medido em milímetros.

4. RESULTADOS

Entre as 538 amostras coletadas nas duas regiões (São Carlos e sul do estado de Mato Grosso do Sul), em apenas doze (2,23%) foram observados dermatófitos (Tabela 6).

Tabela 6: Percentual de amostras positivas para dermatófitos nos animais, no ambiente e no solo.

Amostras	Total coletado	Total de amostras positivas (%)
Animais com lesão de casco	7	0
Animais com lesão aparentemente característica de tricofitose	3	0
Animais com lesão aparentemente característica de dermatofitose	35	0
Animais sem lesão de pele	463	8 (1,73)
Ambiente	18	0
Solo	12	4 (33,3)
Total	538	12 (2,23)

As 7 amostras coletadas dos animais com lesões podais não resultaram em culturas negativas para dermatófitos (Tabela 6). As lesões, em geral, eram inflamatórias com sangramento, edema de membro e provocavam claudicação do animal. Foram denominadas clinicamente, segundo Nicoletti et al. (2001), como: dermatite interdigital com exposição dos tendões; dermatite digital com comprometimento axial e dermatite digital (papilomatosa) proliferativa. Porém, foram encontrados nas culturas, apenas fungos filamentosos sapróbios, leveduras e bactérias (Tabela 7). Não houve a possibilidade de coletar amostras de casco sem lesão devido à dificuldade em conter estes animais, sendo necessário

pessoal e equipamento específico. A contenção era feita apenas para o tratamento destes animais, onde se aproveitou para coletar as amostras.

Tabela 7: Fungos isolados de amostras dos animais com pododermatites.

Amostra	Fungo isolado
1	<i>Acremonium</i> spp, <i>Beauveria</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, bactérias
2	<i>Geotrichum</i> spp
3	<i>Geotrichum</i> spp, <i>Trichosporon</i> spp, fungo demáceo, leveduras
4	<i>Fusarium</i> spp, fungo demáceo e leveduras
5	<i>Geotrichum</i> spp, bactérias e leveduras
6	<i>Geotrichum</i> spp, bactérias e leveduras
7	<i>Geotrichum</i> spp, bactérias e leveduras

Dos 38 animais com dermatoses, apenas três apresentaram lesões aparentemente características de tricotofose, porém a cultura foi negativa para dermatófitos (Tabelas 6 e 8). Um dos animais encontrava-se em São Carlos - SP (Fazenda Canchim - Embrapa) e apresentava lesões múltiplas por todo corpo, crostosas, secas e arredondadas (Figura 4), que persistiam há vários meses. Cerca de dois meses após a coleta, as lesões regrediram e desapareceram por completo com uso de iodo em solução a 5%. Como o tratamento foi iniciado logo após a coleta, não foi possível coletar novo material para diagnóstico diferencial, visto que o animal foi descartado após a cura.

Tabela 8: Fungos isolados de amostras dos animais com lesão de pele.

Amostra	Tipo de lesão	Fungo isolado
1	Tricofitose	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Fusarium</i> spp, <i>Scopulariopsis</i> spp, levedura
2	Tricofitose	<i>Penicillium</i> spp
3	Alopecia	Levedura
4	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i> , levedura
5	Alopecia	Fungos ambientais
6	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
7	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
8	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
9	Alopecia	Fungos ambientais
10	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
11	Alopecia	Fungos ambientais
12	Alopecia	<i>Scopulariopsis</i> spp
13	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
14	Alopecia	Fungos ambientais
15	Alopecia	<i>Paecilomyces</i> spp, <i>Penicillium</i> spp
16	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
17	Alopecia	<i>Paecilomyces</i> spp
18	Alopecia	Fungos ambientais
19	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i> , <i>Penicillium</i> spp
20	Alopecia	Fungos ambientais
21	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
22	Alopecia	<i>Penicillium</i> spp
23	Alopecia	<i>Paecilomyces</i> spp, <i>Penicillium</i> spp
24	Alopecia	Fungos ambientais
25	Alopecia	Fungos ambientais
26	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
27	Alopecia	Levedura
28	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
29	Alopecia	<i>Paecilomyces</i> spp
30	Alopecia	Fungos ambientais
31	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
32	Alopecia	Fungos ambientais
33	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
34	Alopecia	<i>C. keratinophilum</i>
35	Alopecia	<i>Aspergillus</i> spp
36	Fotossensibilização	<i>Paecilomyces</i> spp, <i>Penicillium</i> spp
37	Fotossensibilização	<i>C. keratinophilum</i>
38	Lesões verrugosas	<i>Aspergillus</i> spp, <i>Penicillium</i> spp

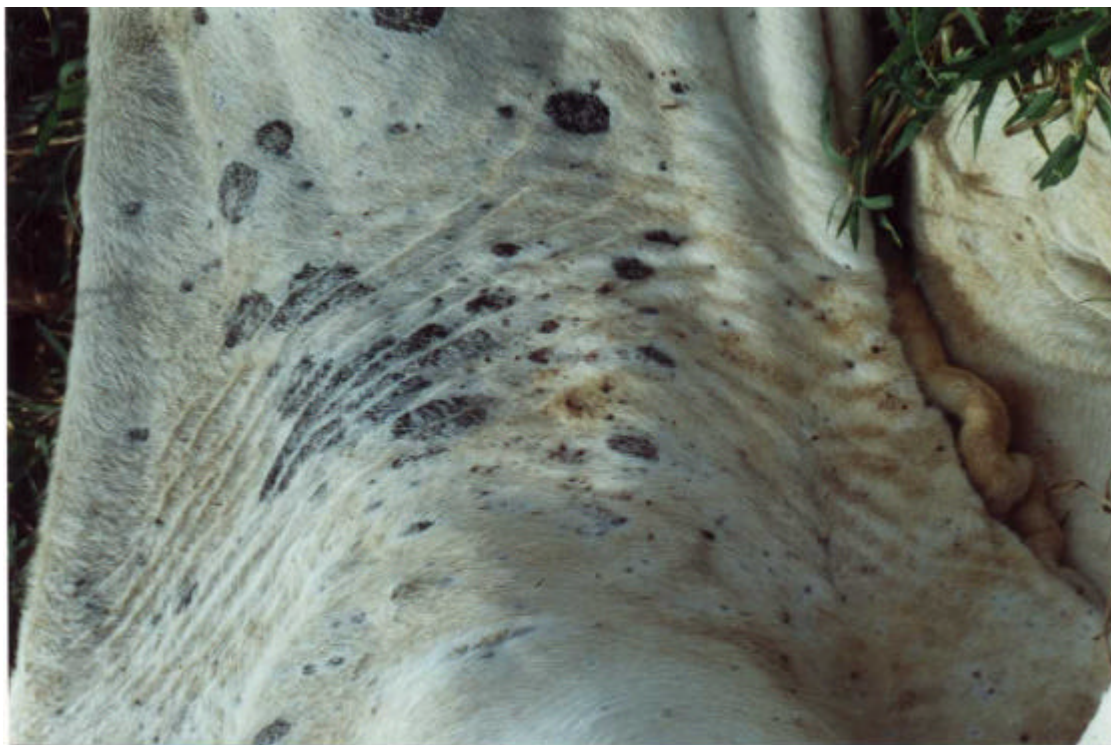


Figura 4: Vista do pescoço de animal com lesões aparentemente características de tricofitose.

Os outros animais encontravam-se na região sul do estado de Mato Grosso do Sul. Um deles era um animal adulto (aproximadamente três anos), apresentava poucas lesões crostosas, secas e arredondadas na região do pescoço. O outro era um animal jovem, apresentava lesões múltiplas verrugosas por todo corpo que se desprendiam com facilidade da pele, apresentavam secreção purulenta e sangramento (Figuras 5 e 6). Porém, a cultura revelou apenas fungos sapróbios e leveduras (Tabela 8).



Figura 5: Vista panorâmica de animal com lesões verrugosas.



Figura 6: Vista de animal com lesões verrugosas, secreção e sangramento.

Os 35 animais, restantes, apresentavam alopecia (Figura 7), escamação e lesões com perda de grande extensão de pele (Figura 8), consideradas pelo médico veterinário como lesões por fotossensibilização. Porém, essas amostras apresentaram cultura negativa para dermatófitos (Tabela 8).



Figura 7: Vista panorâmica de animal com alopecia e eritema (com presença de carrapatos).

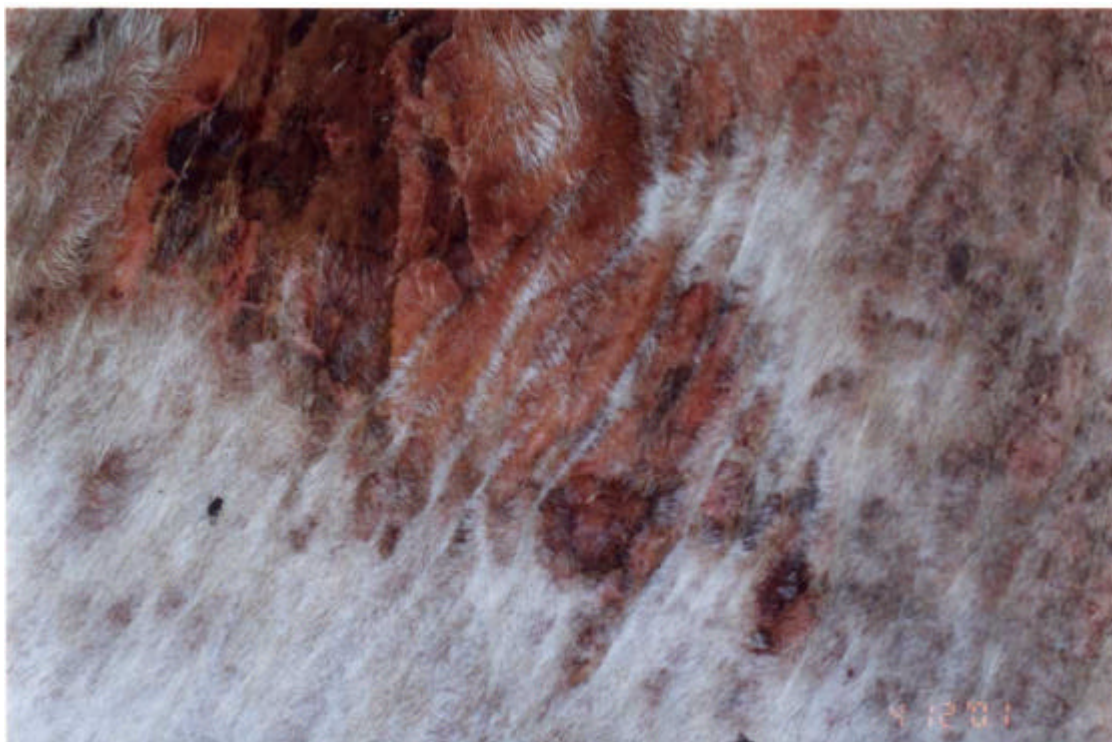


Figura 8: Vista de animal com lesões e perda de grande extensão de pele.

Das 463 amostras dos animais aparentemente saudáveis, apenas oito (1,7%) apresentaram dermatófitos (Tabela 6), sendo isoladas apenas espécies do gênero *Microsporum* spp. Desse gênero foram detectadas duas espécies, *M. gypseum* (7) e uma espécie não identificada (Tabelas 9 e 10). Esses fungos foram isolados apenas das amostras provenientes de São Carlos – SP.

No período da seca e das águas, na região sul do estado de Mato Grosso do Sul, não foram isolados dermatófitos nos animais avaliados, tanto com lesão (4) quanto sem lesão (22). Em São Carlos – SP houve maior isolamento de dermatófitos nos animais no período das águas, conforme demonstra as tabelas 9 e 10.

Tabela 9 Distribuição de dermatófitos isolados das amostras de pele coletadas de bovinos em São Carlos - SP no período da seca.

Amostra	Número	Positivas	Dermatófito
Com lesão	1	0	0
Sem lesão	92	1	<i>M. gypseum</i>

Tabela 10: Distribuição de dermatófitos isolados das amostras de pele coletadas de bovinos em São Carlos - SP no período das águas.

Amostra	Número	Positivas	Dermatófito
Com lesão	33	0	0
Sem lesão	349	1	<i>Microsporum</i> spp
		6	<i>M. gypseum</i>

Com relação as 18 amostras coletadas do ambiente, como: cochos, árvores, mourões de cerca, bretes, currais, porteiras e postes; estas apresentaram cultura negativa para dermatófitos. Das 12 amostras de solo, 4 (33,3%) foram positivas para cultura de dermatófitos (Tabela 6). Sendo detectada apenas a espécie *M. gypseum* (Tabela 11).

Os fungos encontrados nos animais e no ambiente nas duas regiões estão relacionados nas tabelas 12 e 13. A tabela 14 apresenta as características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas dos dermatófitos isolados. Os demais fungos filamentosos foram identificados baseando-se, apenas, nas características morfológicas.

Tabela 11: Distribuição das amostras de solo, número, amostras positivas e dermatófitos isolados.

Local (curral)	Número	Positivas	Dermatófito
Fazenda Canchim (Confinamento)	2	2	<i>M. gypseum</i>
Fazenda Canchim (Bananal)	2	0	0
Fazenda Canchim (Lagoa)	3	1	<i>M. gypseum</i>
Fazenda Canchim (Ordenha)	1	0	0
MS – região sul	4	1	<i>M. gypseum</i>

Tabela 12: Fungos isolados dos animais e do ambiente/solo da região sul do estado de Mato Grosso do Sul.

Fungos	Amostras encontradas nos animais	Amostras encontradas no ambiente/solo
<i>Absidia</i> spp.	2	0
<i>Acremonium</i> spp.	18	0
<i>Aspergillus</i> spp.	29	5
<i>M. gypseum</i>	0	1
<i>Paecilomyces</i> spp.	14	3
<i>Penicillium</i> spp.	25	4
<i>Scopulariopsis</i> spp.	15	2
Leveduras	7	0
Fungos não identificados	10	2

Tabela 13: Fungos isolados dos animais e do ambiente/solo de São Carlos – SP.

Fungos	Amostras encontradas nos animais	Amostras encontradas no ambiente/solo
<i>Absidia</i> spp.	1	0
<i>Acremonium</i> spp.	2	0
<i>Acrophialophora</i> spp.	2	0
<i>Aspergillus</i> spp.	5	0
<i>Beauveria</i> spp.	2	0
<i>Bipolaris</i> spp.	1	0
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	96	0
<i>Fusarium</i> spp.	12	4
<i>Geotrichum</i> spp.	11	0
<i>Microsporum gypseum</i>	7	3
<i>Microsporum</i> spp.	1	0
<i>Paecilomyces</i> spp.	27	7
<i>Penicillium</i> spp.	6	5
<i>Scopulariopsis</i> spp.	11	1
<i>Trichosporon</i> spp.	1	0
Fungos demáceos	19	5
Leveduras	62	5
Fungos não identificados	165	9

Tabela 14: Características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas apresentadas pelos dermatófitos identificados.

Fungo	<i>Microsporum</i> spp	<i>M. gypseum</i> *
Crescimento em ASD	<u>Macroscopia:</u> Colônia ave-ludada, com centro rosa-escuro e borda branca, reverso igual ao anverso (Figura 9). <u>Microscopia:</u> Macroconídios abundantes de paredes espessas. Microconídios abundantes clavados e sésseis.	<u>Macroscopia:</u> Colônia de superfície plana, de bordas irregulares e pulverulenta (aspecto gizado característico), com centro acastanhado e borda clara, reverso igual ao anverso (Figura 10). <u>Microscopia:</u> Macroconídios abundantes e característicos, com paredes finas, extremidades arredondadas e superfície levemente rugosa. Microconídios piriformes.
Crescimento em arroz	<u>Macroscopia:</u> Colônia sem pigmentação. <u>Microscopia:</u> Macroconídios e microconídios abundantes sem características específicas.	NR
Crescimento em NaCl	<u>Macroscopia:</u> Crescimento tolerante ao sal, com colônia pulverulenta branca, reverso marrom-avermelhado com borda amarelada. <u>Microscopia:</u> Macroconídios e microconídios abundantes sem características específicas.	NR
Crescimento em ágar peptona	<u>Macroscopia:</u> Colônia sem pigmentação. <u>Microscopia:</u> Macroconídios abundantes sem características específicas, sem microconídios.	NR
Perfuração de pêlo <i>in vitro</i>	Positiva	Positiva
Urease	Negativa	Positiva

*Todas as cepas de *M. gypseum* apresentaram as mesmas características. NR – prova não realizada.

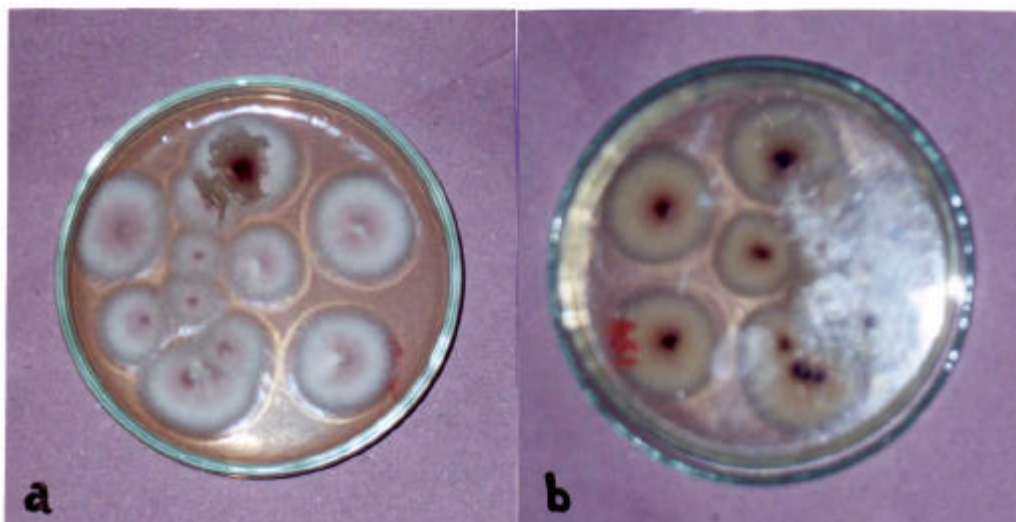


Figura 9: Vista da colônia de *Microsporium* spp: aspecto aveludado, bordas brancas e centro rosa-escuro, (a) anverso e (b) verso.

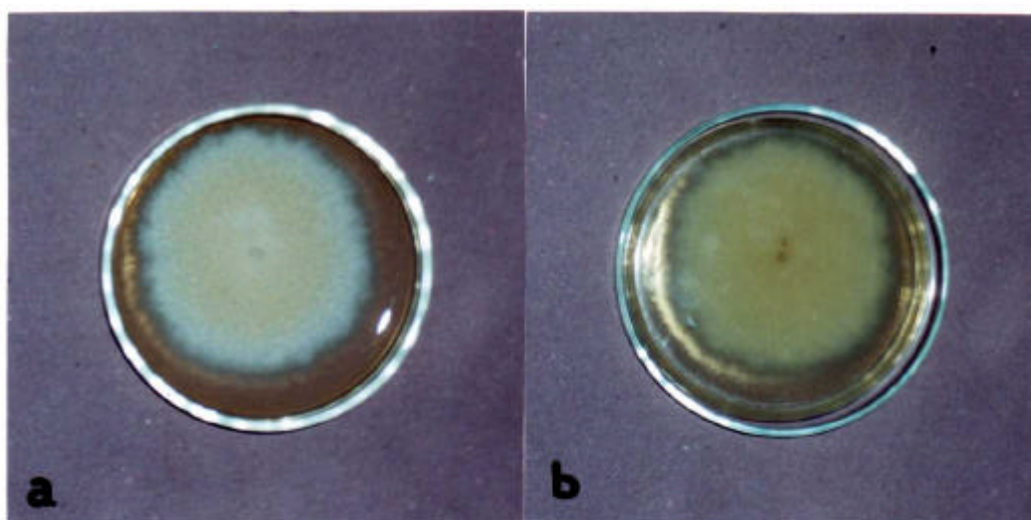


Figura 10: Vista da colônia de *M. gypseum*: aspecto gizado, bordas brancas e irregulares, centro acastanhado, (a) anverso e (b) verso.

O número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados e das cepas padrão bem como os resultados encontrados nos testes de suscetibilidade frente às drogas antifúngicas pelo método da macrodiluição em caldo estão nas tabelas 15 e 17, respectivamente. O itraconazol e a terbinafina inibiram todos os isolados fúngicos numa concentração $<0,03\mu\text{g/mL}$. A atividade antifúngica do fluconazol, em termos de CIM, variou de 8 a $>64\mu\text{g/mL}$ para os isolados avaliados. Sendo que, mais de 80% das amostras apresentaram CIM $\leq 64\mu\text{g/mL}$. As cepas padrão apresentaram valores de CIM correspondentes aos descritos e padronizados pelo NCCLS (1997).

O número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados para o teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método da difusão em ágar estão relacionados na tabela 16.

Os medicamentos de uso veterinário: LEPECID® e solução de iodo a 5% apresentaram variação do halo de 46-64mm e 20-85mm, respectivamente. Esses medicamentos foram mais ativos *in vitro* que o UNGÜENTO® spray, cuja variação foi de 8-17mm (Tabela 18). As figuras 11 e 12 referem-se a atividade antifúngica desses medicamentos pelo método da difusão em ágar.

Tabela 15: Número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados e das cepas padrão (ATCC).

Microrganismos Nº	Contagem dos conídios em câmara de Neubauer (conídios/mL)	Controle de viabilidade do inóculo (UFC/mL)
<i>Microsporum gypseum</i> (1)	$2,40 \times 10^6$	$1,70 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (2)	$2,70 \times 10^6$	$2,30 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (3)	$2,65 \times 10^6$	$2,10 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (4)	$2,30 \times 10^6$	$2,40 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (5)	$3,25 \times 10^6$	$2,10 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (6)	$5,15 \times 10^6$	$2,30 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (7)	$2,65 \times 10^6$	$4,80 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (8)	$2,55 \times 10^6$	$1,90 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (9)	$2,40 \times 10^6$	$2,60 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (10)	$2,40 \times 10^6$	$2,50 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (11)	$4,00 \times 10^6$	$2,60 \times 10^5$
<i>Microsporum</i> spp (12)	$1,80 \times 10^6$	$2,00 \times 10^5$
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	*	$4,07 \times 10^5$
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	*	$4,26 \times 10^5$

* Densidade celular ajustada para obter um padrão 0,5 da escala de McFarland segundo a padronização estabelecida pelo NCCLS (documento M27-A de 1997).

Tabela 16: Número e viabilidade dos conídios dos dermatófitos isolados para o teste de suscetibilidade a antifúngicos pelo método da difusão em ágar.

Microrganismos Nº	Contagem dos conídios em câmara de Neubauer (conídios/mL)	Controle de viabilidade do inóculo (UFC/mL)
<i>Microsporum gypseum</i> (1)	$7,20 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (2)	$1,70 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (3)	$2,00 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (4)	$3,00 \times 10^5$	$0,9 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (5)	$2,40 \times 10^5$	$0,7 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (6)	$4,75 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (7)	$6,00 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (8)	$4,20 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (9)	$6,50 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (10)	$7,50 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$
<i>Microsporum gypseum</i> (11)	$4,47 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
<i>Microsporum</i> spp (12)	NC	NC

NC – amostra não esporulou.

Tabela 17: Atividade *in vitro* dos antifúngicos pelo método da macrodiluição em caldo frente às espécies de dermatófitos e cepas padrão.

Microrganismos Nº	CIM (µg/mL)		
	Fluconazol	Itraconazol	Terbinafina
<i>Microsporum gypseum</i> (1)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (2)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (3)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (4)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (5)	8	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (6)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (7)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (8)	16	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (9)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (10)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum gypseum</i> (11)	64	<0,03	<0,03
<i>Microsporum</i> spp (12)	>64	<0,03	<0,03
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019*	0,5	<0,03	2,0
<i>C. krusei</i> ATCC 6258*	32	0,5	>16

* Cepas controle.

Tabela 18: Diâmetro dos halos de inibição dos dermatófitos frente aos medicamentos de uso veterinário pelo método de difusão em ágar.

Medicamento	Varição do halo (mm)
LEPECID®	46-64
Solução de Iodo a 5%	20-85
UNGÜENTO® spray	8-17
Cetoconazol 128 µg/mL	16-21

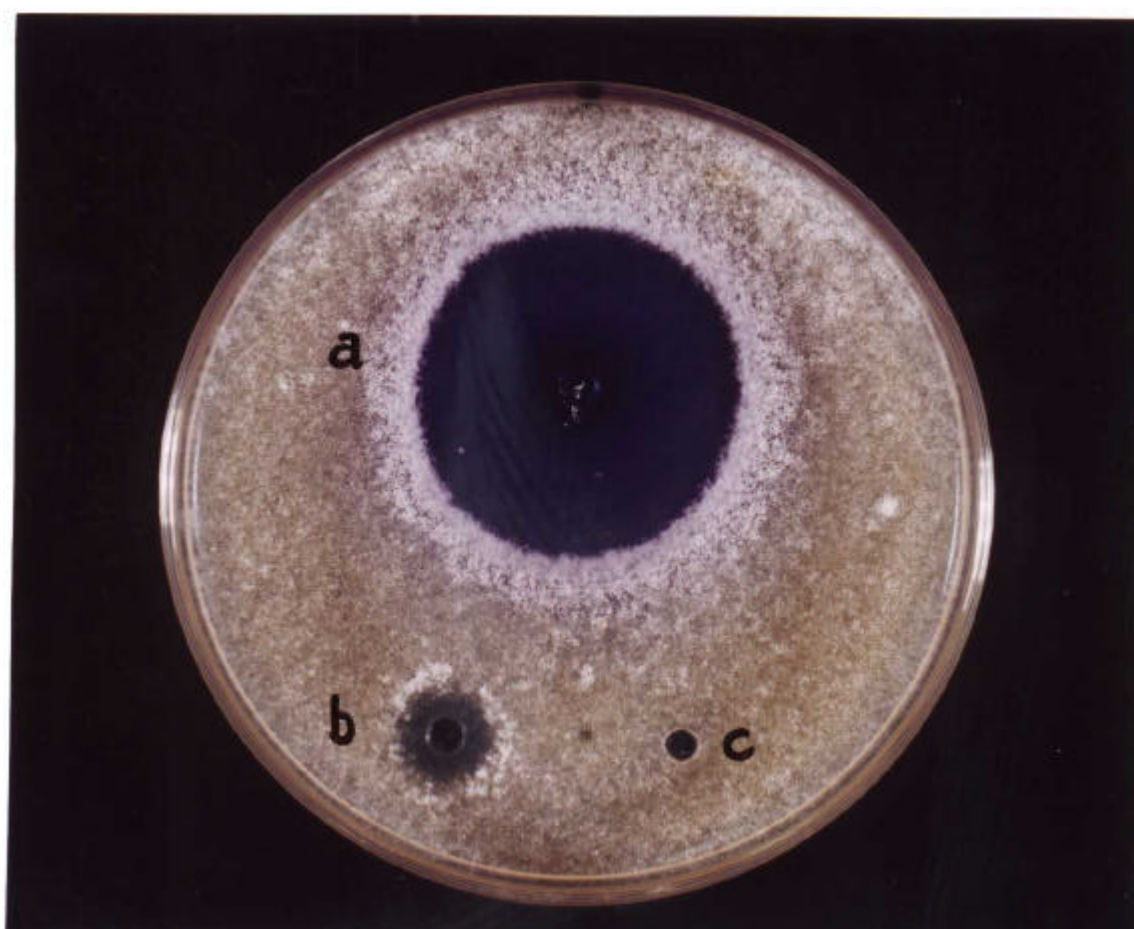


Figura 11: Atividade antifúngica do medicamento de uso veterinário (a) LEPECID®, (b) controle positivo e (c) controle negativo frente ao *M. gypseum*.

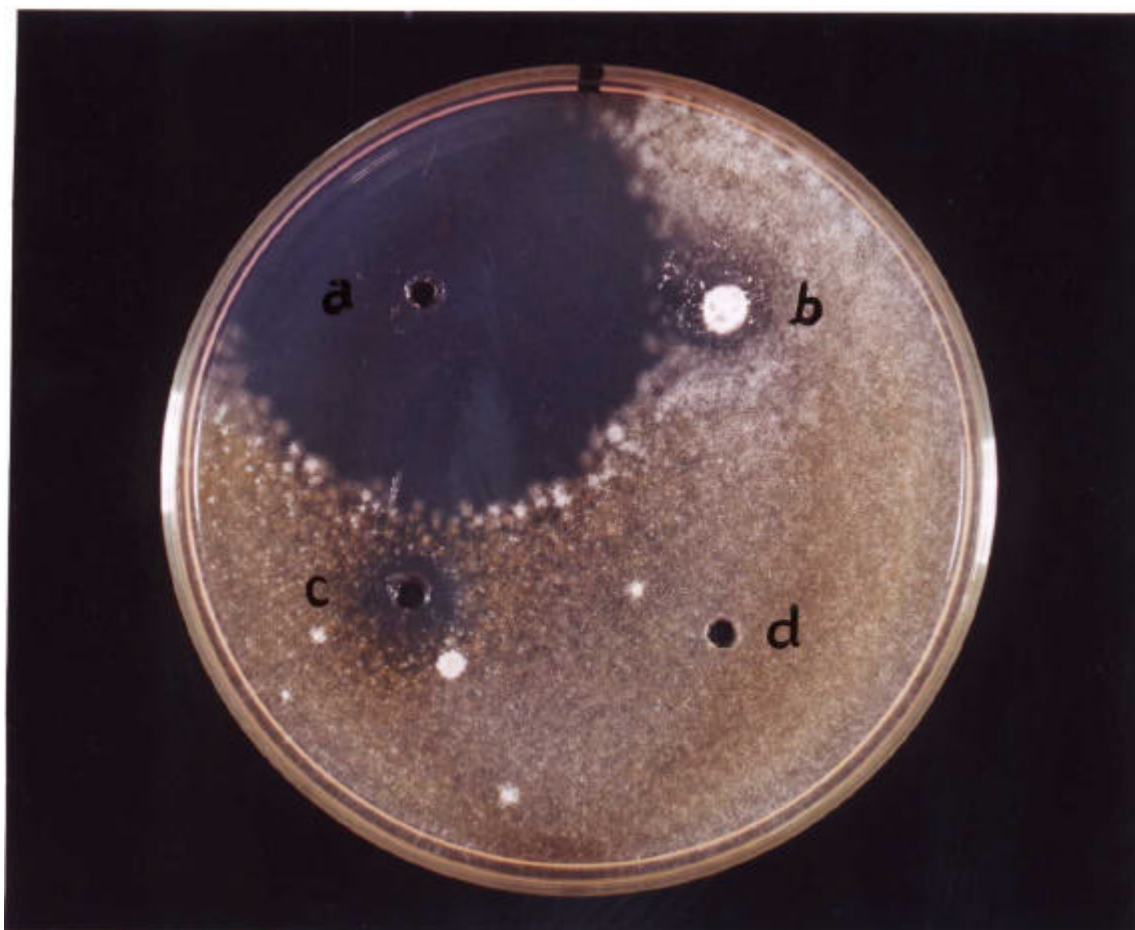


Figura 12: Atividade antifúngica dos medicamentos de uso veterinário (a) solução de iodo a 5% e (b) UNGÜENTO® spray, (c) controle positivo e (d) controle negativo frente ao *M. gypseum*.

5. DISCUSSÃO

As dermatofitoses constituem um dos grupos de doenças mais importantes dentro da prática dermatológica e são adquiridas por diversas formas de contágio, entre elas, o contato direto com animais que são reservatórios de fungos.

Tem-se estabelecido que a maioria dessas infecções encontra-se primariamente concentrada nas regiões tropicais, onde o clima é quente e úmido, causando grandes problemas de saúde pública, além de produzirem perdas econômicas na pecuária (KHARE, 1983; FARUQUI, 1984).

O projeto proposto, inicialmente, para esta dissertação visava, principalmente, verificar a incidência de dermatofitoses em bovinos na Fazenda Canchim (Embrapa – pecuária Sudeste em São Carlos – SP). Visto ser uma propriedade que apresenta condições adequadas de manejo dos animais, com funcionários e pesquisadores de várias formações, inclusive médicos veterinários que atuam em período integral. No entanto, como o número de animais com dermatoses nessa propriedade foi pequeno, optou-se então, por procurar animais com lesão de pele em outras regiões. Porém, foram encontradas diversas dificuldades, dentre estas, a disponibilidade de médico veterinário e funcionários para acompanhar as coletas e verificar animais com lesões. Outra dificuldade foi a distância das propriedades e o pouco tempo que restava para efetuar as coletas nessas outras áreas.

Nesse trabalho, verificamos que, apenas 12 (2,23%) das 538 amostras coletadas apresentavam dermatófitos (Tabela 6), sendo que, esses foram isolados apenas das amostras coletadas dos animais aparentemente saudáveis e do solo. E somente o gênero *Microsporium* foi detectado.

Dos 508 animais avaliados, 7 apresentaram pododermatite, três (0,59%) tinham lesões aparentemente características de tricofitose (Figuras 4-6), e 35 (6,9%) eram sugestivas de dermatofitoses (Figuras 7 e 8). Os animais com pododermatite tinham diagnóstico clínico de lesões por traumatismo, com infecção secundária por bactérias (Tabela 7).

Dos animais que apresentavam lesões sugestivas de tricofitose, não ocorreu o isolamento do *T. verrucosum*. Esse fato, provavelmente, foi devido ao crescimento abundante de fungos sapróbios (*Aspergillus* spp, *Penicillium* spp,

Fusarium spp e *Scopulariopsis* spp – Tabela 8), que poderia ter colaborado para a inibição do provável agente etiológico. Desses fungos, a literatura cita apenas o gênero *Scopulariopsis* spp como agente etiológico de dermatoses em caninos, eqüinos, bovinos e suínos (KINTNER e BLENDEN, 1961; PURCHIO et al., 1980; GANDRA et al., 1986). Outro fator que pode ser considerado foi o tratamento de um dos animais (Figura 4) com solução de iodo a 5% algumas semanas antes da coleta. Conforme citado na literatura essa solução tem atividade fungicida contra dermatófitos (SOARES, 1998). Outra possibilidade seria a similaridade entre a tricofitose e as lesões provocadas pelo actinomiceto *Dermatophilus congolensis*, ou por outras dermatoses, por exemplo, infecção bacteriana, escabioses, tumores e reações alérgicas (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991).

As lesões sugestivas de dermatofitoses, segundo a literatura (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991), poderiam ser causadas ocasionalmente por *T. mentagrophytes* ou, raramente por espécies do gênero *Microsporum*. Ressalta-se que, em 28,6% dos 35 bovinos, que apresentavam esse tipo de lesão, foi isolado o fungo queratinofílico *C. keratinophilum* (Tabela 8), e segundo relato de Shankar et al. (2002), esse fungo secreta substâncias que possuem atividade antidermatofítica. Como houve o crescimento rápido e abundante de *C. keratinophilum* bem como de outros fungos saprófitas, acredita-se também, que esses poderiam ter impedido o desenvolvimento de um fungo de crescimento moderado a lento, como um dermatófito. Ou então, essas lesões poderiam ser provenientes de processos alérgicos (van CUTSEM e ROCHETTE, 1991) ou causadas por outros fungos, inclusive os queratinofílicos (Tabela 8). Porém, para se ter certeza que uma espécie de fungo saprófita é o agente etiológico, torna-se necessário o isolamento do mesmo microrganismo três vezes em diferentes ocasiões. Todavia, devido à alta rotatividade dos animais, esse procedimento se tornou impossível.

Outro fator que poderia ter contribuído para a baixa incidência de fungos dermatófitos seria a amostragem. Porém, em outras pesquisas, realizadas em diversos países, a amostragem estudada foi superior a utilizada no presente estudo, sendo que, na maioria das vezes a incidência também foi baixa. Mitra et

al. (1998) avaliando a incidência de dermatófitos em um rebanho de 1062 bovinos na Índia, observaram que apenas 21 animais apresentavam lesões de pele e desses, em 5 (0,47% do total de animais) foram isolados dermatófitos, sendo *M. gypseum* em 2 animais. Pesquisas realizadas, durante anos em Baden-Württemberg (Alemanha), relataram que de 55.720 animais avaliados, apenas 2,9% apresentaram tricofitose (HECKERT e GRÜNDER, 1988).

Scott (1994) relata que em regiões tropicais como na África, onde a criação é mais extensiva, a prevalência da infecção é baixa. A literatura revela a prevalência variável dessa dermatofitose no mundo, demonstrando que existe uma gama de fatores que interferem na distribuição da infecção, entre esses, hábitos e atividades desenvolvidos nas propriedades rurais (MORETTI et al., 1998), como o confinamento, que segundo Wabacha et al. (1998), interfere mais na disseminação das dermatofitoses do que a influência climática. Esses fatos poderiam explicar o baixo número de animais com lesão no Brasil, já que o sistema de confinamento não é muito utilizado.

Dos animais aparentemente saudáveis (463), foram isolados 8 dermatófitos, pertencentes ao gênero *Microsporum*, com predominância de *M. gypseum* (Tabela 6). Esses fungos foram detectados apenas nos animais de São Carlos – SP. Um fato observado foi à presença de ectoparasitas nos animais de São Carlos – SP, o que não foi constatado na região sul do estado de Mato Grosso do Sul. Segundo Beck (1999) e Soares et al. (2000), os ectoparasitas (carrapatos, microácaros e pulgas) são vetores de epizoonoses, dentre essas, podemos citar as dermatofitoses. Esse achado poderia, também, explicar o fato dos animais apresentarem o fungo numa região, e não na outra.

Além dos dermatófitos, também foram isolados outros gêneros de fungos filamentosos, entre esses, destaca-se o isolamento freqüente de *C. keratinophilum* (20,4%) somente nos animais de São Carlos – SP (Tabela 13); e de *Aspergillus* spp (24,1%) em todas as amostras coletadas dos animais da região sul do estado de Mato Grosso do Sul (Tabela 12). Segundo Ranganathan e Balajee (2000), a variação na freqüência das espécies pode estar relacionada ao pH e a umidade dos tipos de solo. Fatores ambientais poderiam explicar a diversidade dos gêneros

de fungos nas duas regiões avaliadas (Apêndice E). Os resultados obtidos em São Carlos – SP estão de acordo com pesquisa realizada no Egito, onde Bagy (1986) relatou a frequência de 2,6% de *M. gypseum*, 22,1% de *C. keratinophilum* em 77 bovinos saudáveis. Porém, diferem dos achados de Efuntoye e Fashanu (2001), que realizaram um estudo em diferentes áreas na Nigéria e relataram 10% de *M. gypseum*, 12,5% de *C. keratinophilum* e 45% de *Aspergillus* spp, em 40 bovinos aparentemente saudáveis. Essa diferença poderia ser atribuída a hábitos e condições de manejo dos animais nessas regiões.

Dentre os 8 dermatófitos isolados dos animais de São Carlos – SP (Tabelas 9 e 10), sete foram detectados no período das águas e apenas um no período da seca. Esse fato, segundo Ranganathan et al. (1998) e Carrillo-Muñoz e Tur Tur (2002), poderia estar relacionado ao maior contato dos animais com o solo, habitat natural desses fungos, bem como a umidade que é um dos fatores que colabora na germinação dos propágulos dos fungos.

Segundo Ranganathan e Balajee (2000), experimentos realizados *in vitro* verificaram que a umidade do solo variando entre 10-15% aumentava a sobrevivência do *M. gypseum*, bem como percentuais menores que 10% e acima de 15%, contribuem para a diminuição da viabilidade dessa espécie de fungo. Diante desses resultados, acreditamos que possa ter ocorrido uma umidade suficiente no período das águas, que contribuiu para a maior frequência de isolamento desse fungo nos animais.

Das 12 amostras de solo, foram detectados dermatófitos em 4 (33,3%). Sendo que, três amostras foram de São Carlos – SP e apenas uma da região sul do estado de Mato Grosso do Sul (Tabela 11). Foi identificado somente o dermatófito *M. gypseum*. Esse fungo geofílico tem distribuição universal, é ubiqüitário do solo, sendo facilmente isolado em cultura (SEVERO et al, 1989). Esses achados estão de acordo com outros trabalhos similares. No Brasil foi amplamente documentado na natureza por Castro (1961), que encontrou o dermatófito em três das 13 amostras coletadas nos estados de São Paulo e de Minas Gerais. Londero e Ramos (1961), isolaram *M. gypseum* em 29,6% de 27 amostras coletadas do solo no estado do Rio Grande do Sul. Padilha Gonçalves

(1961), avaliou 38 amostras de solo de diversos estados do Brasil (Rio de Janeiro, Goiás, Espírito Santo, Pernambuco, Ceará, Paraíba e Distrito Federal), e identificou 11 *M. gypseum* e 3 *Microsporium* spp em diferentes locais onde permaneciam animais. Não foram encontrados trabalhos na literatura envolvendo a microbiota fúngica do estado de Mato Grosso do Sul.

Georg (1960), relata que *M. gypseum* isolado do solo tem uma patogenicidade menor que aquele isolado de animais, e somente uma cepa muito virulenta tem capacidade de produzir infecção. Isso poderia explicar a baixa incidência de infecções causadas por esse gênero.

Embora a literatura sobre testes de suscetibilidade *in vitro* ser extensa, poucos trabalhos seguem as preconizações indicadas pelo NCCLS, onde, em 1998 começaram os primeiros estudos para a preconização de testes de suscetibilidade *in vitro* para os fungos filamentosos (documento M-38P). Os relatos sobre antibiograma dos dermatófitos usando esse protocolo são recentes, dessa forma, além desse experimento contribuir para a literatura atual, demonstra que os antifúngicos usados no tratamento das dermatofitoses em humanos (itraconazol e terbinafina) apresentam uma concentração inibitória mínima baixa (Tabela 17).

Embora, o itraconazol e a terbinafina apresentem o mesmo mecanismo de ação, inibição da biossíntese do ergosterol, agem em enzimas diferentes. Porém, ambas apresentaram CIM $<0,03\mu\text{g/mL}$, mostrando uma alta atividade inibitória *in vitro*. Esses dados estão de acordo com outros estudos similares. Hofbauer et al. (2002), encontraram uma variação no CIM de 0,004 a $0,03\mu\text{g/mL}$ para terbinafina avaliada com 7 amostras de *M. gypseum*. Fernández-Torres et al. (2002a), determinaram CIM de 32 amostras de *M. gypseum*, encontrando valores médios baixos para o itraconazol ($0,04\mu\text{g/mL}$). Fernández-Torres et al. (2002b) relataram uma variação de 0,03 a $2\mu\text{g/mL}$ para o itraconazol e de 0,03 a $0,12\mu\text{g/mL}$ para a terbinafina.

O antifúngico fluconazol apresentou CIM mais elevados que os outros antifúngicos avaliados (Tabela 17), variando de 8 a $>64\mu\text{g/mL}$, sendo a maioria consideradas resistentes *in vitro* (CIM $\geq 64\mu\text{g/mL}$), que são concordantes com os resultados de Fernández-Torres et al. (2001) e Pujol et al. (2002). Esses autores

verificaram a suscetibilidade de diversas drogas, entre elas o fluconazol, frente ao *M. gypseum* e outros dermatófitos. Relataram que o antifúngico apresentou menor atividade inibitória quando comparado com as outras drogas avaliadas por eles.

Apesar de não se conhecer estudos sobre a correlação *in vitro* e *in vivo* do fluconazol frente ao *M. gypseum*, mesmo assim, é preocupante o fato dessa espécie ser resistente *in vitro* a esse antifúngico, que atualmente é utilizado no tratamento de micoses, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (PORRO et al., 1997). Ressaltamos que, as cepas avaliadas no presente estudo, foram isoladas da natureza e de animais aparentemente saudáveis, podendo a qualquer momento, causar infecção ao homem e aos animais, dependendo do sistema imune do hospedeiro e da virulência da mesma.

Os medicamentos de uso veterinário foram avaliados pelo método da difusão em ágar e apresentaram uma atividade satisfatória *in vitro* (Tabela 18, Figuras 11 e 12). Esses medicamentos são amplamente utilizados nas propriedades rurais estudadas, sendo muitas vezes utilizados em associação. Essa associação não é feita com base em estudos científicos, apenas são utilizados dessa forma por não haver um diagnóstico laboratorial prévio, ou seja, não há constatação da causa das lesões. Mesmo assim, são utilizados e apresentam uma atividade satisfatória contra o agente patogênico.

Não foram encontrados, na literatura consultada, estudos relacionados à suscetibilidade *in vitro* dos medicamentos de uso veterinário. No entanto, Soares e Cury (2001), concluíram que os anti-sépticos representam uma excelente alternativa para o tratamento tópico das dermatofitoses, e que as drogas antifúngicas devem ser reservadas para os casos mais severos de infecções fúngicas.

Portanto, a partir dos resultados obtidos, pode-se considerar que os medicamentos de uso veterinário estudados podem ser indicados como medicações alternativas ou como drogas de primeira escolha em casos de dermatofitoses em bovinos, uma vez que, mostraram-se tão eficazes quanto as drogas antifúngicas específicas *in vitro*, incluídas nesse trabalho.

Considerando-se os resultados encontrados nesse trabalho, observa-se a necessidade do desenvolvimento de estudos mais amplos nessa área. Devendo ser avaliado um número maior de animais, e com isso, produzir um levantamento epidemiológico mais significativo, que possa abranger não só essas como outras regiões do Brasil.

6. CONCLUSÕES

1. A partir de 508 amostras coletadas dos animais, constatou-se que, 1,6% dessas apresentaram dermatófitos, identificados por exames micológicos.
2. Dos 38 (7,6%) animais que tinham lesões de pele, somente três apresentaram características clínicas de tricofitose, demonstrando uma baixa frequência desse tipo de lesão entre os animais das regiões avaliadas.
3. Não foram identificados dermatófitos causando lesão. Somente os animais aparentemente saudáveis de São Carlos – SP apresentaram os mesmos, que predominaram no período das águas, demonstrando que os bovinos são reservatórios desses e de outros fungos potencialmente patogênicos.
4. Somente o gênero *Microsporum* foi isolado, sendo encontradas duas espécies: *M. gypseum* e *Microsporum* spp.
5. As condições de manejo e climáticas das regiões estudadas colaboraram para a baixa incidência de animais com lesão, bem como com a ausência de infecção causada por dermatófitos.
6. Das 30 amostras coletadas do ambiente, somente nas amostras do solo (13,3%) foram detectados dermatófitos, sendo que, apenas a espécie *M. gypseum* foi isolada, predominando no período da seca.
7. A partir dos testes de suscetibilidade, verificou-se que, nas concentrações estudadas, o itraconazol e a terbinafina apresentaram melhor atividade antifúngica *in vitro* que o fluconazol.
8. Os medicamentos de uso veterinário estudados apresentaram uma ótima atividade antifúngica *in vitro*, revelando serem excelentes alternativas para o tratamento tópico de lesões causadas por dermatófitos em bovinos.

9. Os resultados desse trabalho justificam a realização de estudos mais amplos nessa área, que possam atingir um número maior de animais, e com isso, produzir um levantamento epidemiológico mais significativo, abrangendo diversas regiões do Brasil.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A UNIDADE. Desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de São Carlos-SP (Embrapa Pecuária Sudeste). Apresenta dados climáticos e geográficos da região de São Carlos-SP. Disponível em: <<http://www.cppse.embrapa.br>>. Acesso em: 06 mar. 2003.

ALTERAS, I. et al. The increasing role of *Microsporum canis* in the variety of dermatophytic manifestations reported from Israel. *Mycopathologia*, The Hague, v. 94, p. 105-157, 1986.

ALVES, S. M et al. *Candida albicans* from aids patients: susceptibility *in vitro* to antifungal agents. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v.23, n. 2, p. 133-135, 1992.

ALY, R. Ecology and epidemiology of dermatophyte infections. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 31, p. S21-S25, 1994.

AZULAY, D. R. Dermatofitoses. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 1, p. 93-96, 1989.

BAGY, M. M. K. Fungi on the hair of large mammals in Egypt. *Mycopathologia*, The Hague, v. 93, p. 73-75, 1986.

BAGY, M. M. K.; ABDEL-HAFEZ, A. A. I. Mycoflora of camel and goat hairs from Al-Arish, Egypt. *Mycopathologia*, The Hague, v. 92, p. 125-128, 1985.

BARON, E. J.; CHANG, R. S.; DEXTER, H. *Medical microbiology: a short course*. New York: Wiley, 1994. p. 523-533.

BECK, W. Landwirtschaftliche Nutztiere als Vektoren von parasitären Epizoonoseerregern und zoophilen Dermatophyten. *Hautarzt*, Berlin, v.50, p.621-628, 1999.

BENNETT, J. E. Fármacos antimicrobianos: fármacos antifúngicos. In: GOODMAN, A. G. et al. *Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 9. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1996. p. 1436.

BLAKE, J. S. et al. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.*, Baltimore, v. 96, p. 657-661, 1991.

BODEY, G. P. Azole Antifungal Agents. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 14, n. 1, p. S161-S169, 1992.

BUTTY, J. P. et al. Evaluation of susceptibility of dermatophytes to antifungal drugs: a new technique. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v.33, p. 403-409, 1995.

CABAÑES, F. J. Dermatofitosis animales. Recientes avances. *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao, v. 17, p. S8-S12, 2000.

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

CANDIDO, R. C. et al. Quantificação de conídios de *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* em diferentes meios de cultura. In: JORNADA FARMACÊUTICA DA UNAERP, 5., 2001, Ribeirão Preto. *Anais...* Ribeirão Preto: UNAERP, 2001. p. 14.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; TUR TUR, C. Hongos dermatofitos; aspectos biológicos. *Actualidad Dermatológica*, [S. l.], ago. 2002. Disponível em: <<http://www.actualidaddermatol.com/art41095.pdf>>. Acesso em: 22 ago. 2002.

CASTRO, R. M. Isolamento do dermatófito *Microsporum gypseum* de amostras de terra dos Estados de São Paulo e Minas Gerais (Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 3, p. 78-80, 1961.

CERVANTES, R. A.; PIJOAN, C. Aislamento e identificación de dermatofitos a partir de muestras de animales en México. *Rev. Latinoam. Microbiol.*, México, v. 18, p. 25-27, 1976.

CESTARI, T. F.; ABDALLA, C.; ASSIS, T. L. Fisiopatogenia das dermatofitoses. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 65, n. 6, p. 310-316, 1990.

COSTA, E. F.; WANKE, B.; MARTINS, E. C. S. Micoses superficiais e cutâneas. Estudo comparativo entre duas populações: Rio de Janeiro (RJ) e Aracajú (SE). *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 3, p. 119-122, 1991.

CURY, A. E.; MICHE, M. P. Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 249-253, 1989.

DAHL, M. V. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 28, p. S19-S23, 1993.

EFUNTOYE, M. O.; FASHANU, S. O. Fungi isolated from skins and pens of healthy animals in Nigeria. *Mycopathologia*, The Hague, v. 153, p. 21-23, 2001.

ELIAS COSTA, M. R. et al. Conventional versus molecular diagnostic tests. *Med. Mycol.*, Philadelphia, v. 30, suppl. 1, p. 139-145, 2000.

ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal susceptibility testing. *Clin. Microbiol. Newsl.*, New York, v. 18, p. 161-168, 1996.

ESPINEL-INGROFF, A. Clinical relevance of antifungal resistance. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, Philadelphia, v. 11, p. 929-944, 1997.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Comparative and collaborative evaluation of standardization of antifungal susceptibility testing for filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 39, p. 314-319, 1995.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 35, p. 139-143, 1997.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. *In vitro* antifungal susceptibility methods and clinical implications of antifungal resistance. *Med. Mycol.*, Philadelphia, v. 38, Suppl. 1, p. 293-304, 2000.

FAGGI, E. et al. Application of PCR to distinguish common species of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 39, n. 9, p. 3382-3385, 2001.

FARUQUI, A. H. Study of 1324 cases of dermatomycosis. *Indian J. Dermatol.*, Calcutta, v. 29, n. 3, p. 7-16, 1984.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. *In vitro* activities of 10 antifungal drugs against 508 dermatophyte strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 45, n. 9, p. 2524-2528, 2001.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. Subcutaneous infection by *Microsporum gypseum*. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 146, p. 311-313, 2002a.

FERNÁNDEZ-TORRES, B. et al. Collaborative evaluation of optimal antifungal susceptibility testing conditions for dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 40, n. 11, p. 3999-4003, 2002b.

FURTADO, M. S. S.; MINAMI, P. S. Invitro susceptibility tests of dermatophytes to griseofulvin and imidazole derivates. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 28, p. 110-115, 1997.

GADEA, I. et al. Effect of pH and buffer system on the *in vitro* activity of five antifungals against yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.*, London, v. 39, n. 4, p. 453-459, 1997.

GAMBALE, W. et al. Incidência de micoses superficiais em São Paulo, capital. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 62, n. 4, p. 193-194, 1987.

GANDRA, C. R. P. et al. Dermatose por *Scopulariopsis brevicaulis* em eqüinos e cães. In: SEMANA CIENTÍFICA DO VPT, 2., 1986, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1986. IP-02.

GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao, v. 17, p. S2-S7, 2000.

GEORG, L. K. Epidemiology of dermatophytes: sources of infection, modes of transmission and epidemicity. *Ann. NY Acad. Sci.*, New York, v. 89, p. 69-77, 1960.

GRAPPEL, S. F.; BLANK, F. Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. *Dermatologica*, Basel, v. 145, p. 245-255, 1972.

GRÄSER, Y. et al. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. *Br. J. Dermatol.*, Oxford, v. 138, p. 576-582, 1998.

GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: an overview. Part I. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 31, n. 3, p. S51-S55, 1994a.

GUPTA, A. K.; SAUDER, D. N.; SHEAR, N. H. Antifungal agents: an overview. Part II. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 30, n. 6, p. 911-933, 1994b.

HECKERT, H. P.; GRÜNDER, H.-D. Untersuchungen über Vorkommen, Häufigkeit und Ursachen von Hautkrankheiten bei Rindern. *Prakt. Tierarzt*, Hannover, v. 69, p. 45-48, 1988.

HOFBAUER, B.; LEITNER, I.; RYDER, N. S. *In vitro* susceptibility of *Microsporum canis* and other dermatophyte isolates from veterinary infections during therapy with terbinafine or griseofulvin. *Med. Mycol.*, Philadelphia, v. 40, p. 179-183, 2002.

IMWIDTHAYA, S.; THIANPRASIT, M. A study of dermatophytes in Bangkok (Thailand). *Mycopathologia*, The Hague, v. 102, p. 13-16, 1988.

ITOYAMA, T. et al. Various factors influencing *in vitro* antifungal activities of omoconazol nitrate (OMZ), a new imidazole antimycotic. *Jnp. J. Antibiot.*, Tokyo, v. 47, n. 1, p. 40-49, 1994.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. *Microbiologia Médica* 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 524.

JESSUP, C. et al. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, n. 1, p. 341-344, 2000.

JONES, H. E. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J. Am. Acad Dermatol.*, St. Louis, v. 28, n. 5, p. S12-S18, 1993.

KANE, J. et al. *Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nail*. Belmont: STAR, 1997. p. 344.

- KEAY, S.; DENNING, D. W.; STEVENS, D. A. Endocarditis due to *Trichosporon beigelii*: *in vitro* susceptibility of isolates and review. *Rev. Infect. Dis.*, Chicago, v. 13, p. 383-386, 1991.
- KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. *Micologia médica* texto & atlas. 2. ed. São Paulo: Premier, 1999. p. 256.
- KHARE, A. K. A clinical and mycological study of dermatophytosis. *Indian J. Dermatol.*, Calcutta, v. 28, n. 4, p. 163-164, 1983.
- KINTNER, L. D.; BLENDEN, D. C. Mycotic dermatitis in a steer. *J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v. 138, p. 9-12, 1961.
- KOMAREK, J.; WURST, Z. Dermatophytes in clinically healthy dogs and cats. *Vet. Med.*, Praha, v. 34, n. 1, p. 59-63, 1989.
- KOROLKOVAS, A. *Dicionário terapêutico*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997/1998. p. 18.2-19.9.
- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. *Medical mycology*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992. p. 866.
- LACAZ, C. S.; PORTO E.; MARTINS, J. E. C. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. 8. ed. São Paulo: SARVIER, 1991. p. 695.
- LACAZ, C. S. et al. *Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico*. São Paulo: Sarvier-Fapesp, 1998. p. 445.
- LATEUR, N. Les dermatophytoses dues aux animaux domestiques. *Rev. Med. Brux.*, Bruxelles, v., p. A237-A241, 2000.

LE GUENNEC, R. et al. Fluconazole and itraconazole resistant *Candida albicans* strains from AIDS patients multilocus enzyme electrophoresis analysis and antifungal susceptibilities. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 33, n. 10, p. 2732-2737, 1995.

LESHER, J. L. Jr.; SMITH, J. G. Jr. Continuing medical education (Therapy). Antifungal agents in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 17, n. 3, p. 383-394, 1987.

LIU, D. et al. Application of PCR to the identification of dermatophyte fungi. *J. Med. Microbiol.*, Edinburgh, v. 49, p. 493-497, 2000.

LOCALIZAÇÃO. Desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Dourados – MS (Embrapa Agropecuária Oeste). Apresenta dados climáticos e geográficos da região sul do estado de Mato Grosso do Sul. Disponível em: <<http://www.cpao.embrapa.br>>. Acesso em: 06 mar. 2003.

LONDERO, A. T. O grupo dos dermatófitos: atualização. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v.65, n. 1, p. 9-10, 1990.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Ocorrência de dermatófitos “geofílicos” no solo do Rio Grande do Sul (Brasil). *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, v. 3, p. 75-77, 1961.

LONDERO, A. T.; RAMOS, C. D. Agentes de dermatofitoses humanas no interior do estado do Rio Grande do Sul no período 1960-1987. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 3, p. 161-164, 1989.

MARIAT, F.; TAPIA G. Observations on a case of *Microsporium cookei* parasitic on a dog-faced baboon (*Papio papio*). *Sabouraudia*, Edinburgh, v. 5, n. 1, p. 43-45, 1966.

McGINNIS, M. R.; RINALDI, M. G. Antifungal drugs mechanisms of action, drug resistance, susceptibility testing, and assays of activity in biological fluids. In: LORIAN, V. *Antibiotics in laboratory medicine*. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. p. 198-239.

MEINHOF, W. Kinetics and spectrum of activity of oral antifungals: the therapeutic implications. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 29, p. S37-S41, 1993.

MELETIADIS, J. et al. Comparison of NCCLS and 3-(4,5-dimethyl-2-thiazyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) methods of in vitro susceptibility testing of filamentous fungi and development of a new simplified method. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, n. 8, p. 2949-2954, 2000.

MITRA, S. K.; SIKDAR, A.; DAS, P. Dermatophytes isolated from selected ruminants in India. *Mycopathologia*, The Hague, v. 142, p. 13-16, 1998.

MONTERO-GEI, F.; PERERA, A. Therapy with fluconazole for tinea corporis, tinea cruris and tinea pedis. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 14, n. 1, p. 577-581, 1992.

MORETTI, A. et al. Epidemiological aspects of dermatophyte infections in horses and cattle. *J. Vet. Med. B*, München, v. 45, n. 4, p. 205-208, 1998.

MS – CLIMA. Coordenação deDesenvolvido pela Universidade para o Desenvolvimento Econômico da Região Pantaneira em Campo Grande-MS. Apresenta dados climáticos e geográficos da região sul do estado de Mato Grosso do Sul. Disponível em: <<http://www.uniderp.br/atlas>>. Acesso em: 06 mar. 2003.

MURRAY, P. R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7. ed. Washington: ASM PRESS, 1999. p. 1773.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard document M27-A*. Wayne, 1997. p. 27.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi: proposed standard M38-P*. Wayne, 1998. p. 29.

NICOLETTI, J. L. et al. Prevalência de lesões podais e graus de claudicação em vacas leiteiras mantidas em confinamento permanente ("free-stall" e "tie-stall"). *Rev. Educ. Contin. CRMV-SP*, São Paulo, v. 4, n. 2, p. 24-32, 2001.

NORRIS, H.; ELEWSKI, B.; GHANNOUM, M. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. *J. Am. Acad. Dermatol.*, St. Louis, v. 40, n. 5, p. S9-S13, 1999.

ODDS, F. C. Sabouraud's agar. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v. 29, p. 355-359, 1991.

ODDS, F. C. et al. Evaluation of possible correlations between antifungal susceptibilities of filamentous fungi in vitro and antifungal treatment outcomes in animal infection models. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v. 42, p. 282-288, 1998.

PADILHA GONÇALVES, A. Presença do *Microsporum gypseum* no solo como saprófita. Seu isolamento no solo brasileiro. *Hospital*, Rio de Janeiro, v. 60, p. 413-424, 1961.

PELCZAR, M. Microbiologia do solo e do ar. In: _____. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2. ed. São Paulo: Makron, 1996, cap. 28, p. 306-330.

PFALLER, M.; MESSER, S. A.; COFFMANN, S. Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoints determinations by using broth microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 33, n. 5, p. 1094-1097, 1995.

PFALLER, M.; REX, J. H.; RINALDI, M. G. antifungal testing: technical advances and potential clinical applications. *Clin. Infect. Dis.*, Chicago, v. 24, p. 776-784, 1997.

PFALLER, M. et al. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: comparison of Etest and reference microdilution methods for determining itraconazole MICs. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 38, n. 9, p. 3359-3361, 2000.

PIER, A. C. et al. Animal ringworm - its aetiology, public health significance and control. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v. 32, Suppl. 1, p. 133-150, 1994.

POLONELLI, L.; MORACE, G. A microautomated dilution method for susceptibility testing with antifungal drugs. *Mycopathologia*, The Hague, v. 86, p. 21-28, 1984.

PORRO, A. M. et al. Disseminated dermatophytosis caused by *Microsporum gypseum* in two patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Mycopathologia*, The Hague, v. 137, p. 9-12, 1997.

PRAZAK, G. et al. Treatment of tinea pedis with griseofulvin. *Arch. Dermatol.*, New York, v. 81, p. 821-826, 1960.

PUJOL, I. et al. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 40, n. 7, p. 2618-2621, 2002.

PURCHIO, A. et al. *Scopulariopsis brevicaulis*: a possible etiologic agent of Pityriasis rosea in piglets. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE MYCOSES, 1980, Washington. *Scientific publications*, Washington: OPAS, 1980. p. 104-111.

PVP-I: Complexo de polovinilpirrolidona-iodo. São Paulo: GAF do Brasil. s. d. 26p. Catálogo.

RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S. A. *Microsporum gypseum* complex in Mandras, India. *Mycoses*, Emmendingen, v. 43, p. 177-180, 2000.

RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S. A.; RAJA, S. M. A survey of dermatophytosis in animals in Mandras, India. *Mycopathologia*, The Hague, v. 140, p. 137-140, 1998.

REYNOLDS, J. E. F.; PRASAD, A. B. *Martindale the extra pharmacopolia*. 30. ed. London: The Pharmaceutical Press, 1993. p. 2363.

RICHARD, J.L. et al. Advances in veterinary mycology. *J. Med. Vet. Mycol.*, Abingdon, v. 32, Suppl. 1, p. 169-187, 1994.

RIPPON, J. W. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*, 2. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1982. p. 587.

RIPPON, J. W. The changing epidemiology and emerging patterns of dermatophyte species. *Curr. Top. Med. Mycol.*, New York, v. 1, p. 209-234, 1985.

RIPPON, J. W. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. p. 797.

ROMANO, C. et al. Case reports. Six cases of infection due to *Trichophyton verrucosum*. *Mycoses*, Emmendingen, v. 44, p. 334-337, 2001.

- RUBIO, M. C. et al. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. *Rev. Iberoam. Micol.*, Bilbao, v. 16, p. 16-22, 1999.
- RUSTÂN, M. E. et al. Susceptibilidad *in vitro* de cepas de dermatófitos frente a drogas utilizadas em Micoterapia: método cuantitativo para hongos filamentosos. *Rev. Arg. Micol.*, Córdoba, v. 10, n. 2, p. 8-11, 1987.
- SCOTT, D. B. Mycoses. In: COETZER, J. A. W.; THOMSON, G. R.; TUSTIN, R. C. *Infectious diseases of livestock with special reference to South Africa*. Cape Town: Oxford University Press, 1994. v. 2., p. 1521-1533.
- SEVERO, L. C.; CONCI, L. M. A.; AMARAL, A. A. *Microsporium gypseum* – Relato de surto de infecção e isolamento do solo. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 64, n. 2, p. 119-120, 1989.
- SHANKAR, S. G. et al. Did earthworms contribute to the parasitic evolution of dermatophytes? *Mycoses*, Emmendingen, v. 45, p. 399-401, 2002.
- SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. p. 287.
- SOARES, C. O. et al. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1, p. 1-19, 2000.
- SOARES, M. M. R. S. *Tinea pedis e agentes etiológicos: avaliação terapêutica e antibiograma dos dermatófitos isolados*. 1998. 191 f. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. Atividade de alguns antimicóticos contra fungos isolados de diferentes classes de pacientes. *Rev. Bras. An. Clin.*, Rio de Janeiro, v. 27, n. 1, p. 3-11, 1995.

SOARES, M. M. S. R.; CURY, A. E. *In vitro* activity of antifungal and antiseptic agents against dermatophyte isolates from patients with tinea pedis. *Bras. J. Microbiol.*, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 130-134, 2001.

TORNATORE, M. A. et al. Effects of incubation time and buffer concentration on *in vitro* activities of antifungal agents against *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v. 35, n. 6, p. 1473-1476, 1997.

TRABULSI, L. R.; TOLEDO, M. R. F. *Microbiologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 249-251.

VALENTIN, A. et al. Comparative resistance of *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole and itraconazole *in vitro* and *in vivo* in a murine model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.40, n.6, p. 1342-1345, 1996.

van CUTSEM, J.; ROCHETTE, F. *Mycoses in domestic animals*. [S.l.]: Janssen Research Foundation, 1991. p. 226.

WABACHA, J. K. et al. Occurrence of dermatomycosis (ringworm) due to *Trichophyton verrucosum* in dairy calves and its spread to animal attendants. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, Nairobi, v. 69, n. 4, p. 172-173, 1998.

WANKE, N. C. F. et al. Dermatofitoses no Rio de Janeiro: estudo dos fatores de risco em população adulta. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 66, n. 4, p. 171-174, 1991.

WEBER, A. Mykozoonosen unter besonderer Berücksichtigung der Rindertrichophytie. *Mycoses*, Emmendingen, v. 43, p. 20-22, 2000.

WEITZMAN, I. ; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, Washington, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

ZAITS, C. Os caminhos da investigação de novos antifúngicos. *An. Bras. Dermatol.*, Rio de Janeiro, v. 67, n. 4, p. 184-186, 1992.

ZAITS, C. Dermatofitoses. In: ZAITS, C. et al. *Compêndio de Micologia Médica*. Rio de Janeiro: Medsi, 1998. p. 81-98.

ZAROR, L.; ALIAGA, X. Dermatophytes in healthy Chilians. *Mycoses*, Emmendingen, v. 33, n. 2, p. 95-98, 1990.

ZAROR, L.; BUSTAMANTE, X. Viabilidad de dermatofitos en muestras clinicas almacenadas. *Bol. Micol.*, Valparaíso, v. 13, p. 23-27, 1998.

ZAROR, L. et al. The role of cats and dogs in the epidemiological cycle of *Microsporum canis*. *Mykosen*, Berlin, v. 29, p. 185-188, 1986.

APÊNDICES

Apêndice A Procedência dos reagentes, meios de cultura, sais, carboidratos e corantes.

<i>Seletive agar for pathogenic fungi</i>	Merck
Ágar Sabouraud	Vetec
NaCl	Reagen
Peptona	Inlab
Ágar	Vetec
Dextrose	Synth
Vermelho de fenol	Merck
HCl	Merck
Fosfato de potássio monobásico	Reagen
MOPS	UBS
RPMI-1640	Gibco BRL
Ágar <i>Trichophyton</i> 3	Difco
Ágar <i>Trichophyton</i> 4	Difco
DMSO	Merck
Cetoconazol	Galena Química e Farmacêutica Ltda
Ittraconazol	Galena Química e Farmacêutica Ltda
Fluconazol	Galena Química e Farmacêutica Ltda
Terbinafina	Novartis
Etanol	Merck

Apêndice B: Mapa do estado de São Paulo com a localização de São Carlos.



Apêndice C: Mapa do estado de Mato Grosso do Sul com a localização da região sul.



Apêndice D: Formulação dos medicamentos de uso veterinário avaliados.

Lepecid® (Dow AgroSciences): larvacida (inseticida), repelente, germicida.

Clorpirifós*	2,50g
Violeta de genciana	0,27g
Óleo de pinho	4,46g
Veículo qsp	100,0mL
* Organofosforado	

UNGÜENTO® spray (Vansil): cicatrizante, larvicida, repelente.

Permetrina*	0,5g
Óxido de Zinco	25,0g
Excipiente / propelente Butano	100,0g
* Inseticida piretróide	

Iodo 10% (Pinus):

Iodo	10,0g
Veículo qsp	100,0mL

Apêndice E: Características climáticas e geográficas das duas regiões pesquisadas.

	Região de São Carlos – SP (Fazenda Canchim) *	Região sul do estado de Mato Grosso do Sul **
Altitude	854m	430-655m
Tipo de solo	latossolo vermelho-amarelo fase arenosa (predominante), latossolo vermelho-escuro e areia quartzosa distrófica.	latossolo vermelho-escuro de textura argilosa à média, em sua maioria álicos.
Clima	subtropical com inverno seco e verão quente/úmido (clima Cw na classificação de Köppen).	úmido a sub-úmido com inverno seco e verão quente/chuvoso (clima Aw na classificação de Köppen).
Índice pluviométrico (média anual)	1500mm	1750 a 2000mm
Temperatura (média anual)	22°C	21 a 28°C

* Fonte: A UNIDADE, 2003; ** Fonte: LOCALIZAÇÃO, 2003, e MS – CLIMA, 2003.