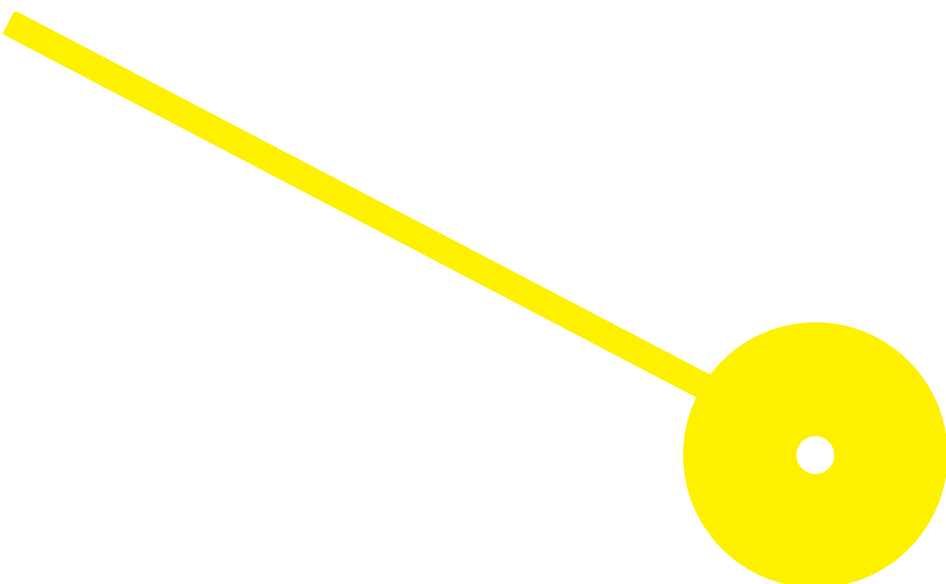


Frequência de fungos Dermatófitos em Animais de Companhia num Laboratório em Portugal

Cláudia Cunha

10/2024





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



Frequência de fungos Dermatófitos em Animais de Companhia num Laboratório em Portugal

Autor

Cláudia Cunha

Orientador

Prof. Doutora Sandra Marlene Mota/REQUIMTE/LAQV, Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em **Análises Clínicas e Saúde Pública – Ramo de Microbiologia e Saúde Pública** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

A realização deste projeto foi possível graças ao apoio e incentivo de várias pessoas a quem gostaria de expressar a minha mais profunda gratidão.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Dra Sandra Marlene Mota e Maria Inês Barros, pela orientação, paciência e ensinamentos ao longo deste percurso. O vosso conhecimento e dedicação foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, e o vosso apoio constante fez toda a diferença.

Agradeço também aos meus colegas de trabalho da Inno, pelo companheirismo, pela troca de ideias e pela ajuda ao longo deste caminho. Foi um privilégio poder partilhar este desafio convosco, e o vosso contributo foi essencial para a concretização deste trabalho.

À minha família, pelo apoio incondicional e compreensão nos momentos mais desafiantes. Um agradecimento especial à minha irmã, Ana Sofia, pelo incentivo constante e pelas palavras de conforto, e ao meu namorado, Joel, pela paciência, apoio inabalável e por me motivar a nunca desistir.

A todos, o meu sincero obrigado!

Resumo

Os dermatófitos são fungos que infetam tecidos queratinizados como pele, cabelo e unhas, causando sintomas como queda de cabelo, prurido, rubor e lesões circulares, atingindo especialmente animais de estimação como cães e gatos.

As infeções por dermatófitos são altamente contagiosas, podendo ser transmitidas por contacto direto com animais infetados ou objetos contaminados, tais como o material de limpeza e escovagem.

Este estudo, realizado no âmbito de um estágio, teve como objetivo determinar a frequência e distribuição de dermatófitos encontrados em amostras animais analisadas num laboratório em Portugal.

A frequência de dermatófitos na nossa amostra foi de 12% (n=237). De entre as diferentes espécies de dermatófitos identificadas destaca-se *Microsporum canis* sendo encontrado em 60,76% das amostras positivas, seguindo-se *Tricophyton tonsurans* com 12,24%.

Os resultados obtidos encontram-se de acordo com o descrito na literatura, com maior frequência do *Microsporum canis*, seguindo-se os géneros *Tricophyton*, e *Nannizzia*. Foi comprovada a predominância da presença de dermatófitos na espécie felina, conforme descrito na literatura. Embora se observe a presença de mais casos de infeções nos animais mais novos, contrariamente ao descrito na literatura, esta diferença não é estatisticamente significativa.

Através da realização destes estudos compreendemos a importância da prevenção, diagnóstico e monitorização deste tipo de infeções que afetam animais, mas que também podem afetar os seus cuidadores.

Palavras-chave: *Microsporum*; *Tricophyton*; *Nannizzia*; micose; animais de companhia.

Abstract

Dermatophytes are fungi that infect keratinized tissues like the skin, hair and nails, causing symptoms such as hair loss, itching, redness, and circular lesions, especially affecting pets such as cats and dogs.

Dermatophyte infections are highly contagious and can be transmitted by direct contact with infected animals or contaminated objects, such as cleaning and brushing supplies.

The research carried out within the scope of an internship aimed to determine the frequency and distribution of dermatophytes found in animal samples analyzed in a laboratory in Portugal.

The frequency of dermatophytes in our sample was 12% (n=237). Among the different species of dermatophytes identified, *Microsporum canis* stands out, being found in 60.76% of the positive samples, followed by *Tricophyton tonsurans* with 12.24%.

The results obtained are in accordance with what is described in the literature, with the highest frequency of *Microsporum canis*, followed by the genus *Tricophyton*, and *Nannizzia*. The predominance of the presence of dermatophytes in the feline species was proven, as described in the literature. Although there are more cases of infections in younger animals, contrary to what is described in the literature, this difference is not statistically significant.

By conducting these studies we understand the importance of preventing, diagnosing and monitoring this type of infections that affect animals, but can also affect their caregivers.

Keywords: *Microsporum*; *Tricophyton*; *Nannizzia*; ringworm; pets.

Índice

Capítulo 1 – Estágio no laboratório INNO.....	1
1. Contextualização do estágio.....	1
2. Objetivos.....	1
3. Caracterização da instituição.....	1
4. Análises Clínicas Veterinárias: INNO Laboratório Veterinário.....	1
4.1. Receção de Amostras.....	2
4.2. Acondicionamento de Amostras.....	2
4.3. Laboratório Central INNO.....	5
4.3.1. Bioquímica.....	5
4.3.2. Endocrinologia.....	6
4.3.3. Imunologia.....	6
4.3.4. Hematologia.....	8
4.3.5. Citologia.....	9
4.3.6. Coagulação.....	11
4.3.7. Análise Urina.....	11
4.3.8. Análise de Fezes.....	11
4.4. Laboratório 2 INNO – Microbiologia.....	15
4.4.1. Processamento de Amostras.....	15
4.4.2. Coloração de Gram.....	20
4.4.3. Identificação de Microrganismos.....	21
4.4.4. Equipamentos Vitek®.....	22
Capítulo 2 – Frequência de fungos Dermatófitos em Animais de Companhia num Laboratório em Portugal.....	25
1. Introdução.....	25
1.1. Objetivo.....	28
1.2. Métodos.....	28
1.3. Resultados.....	29
1.4. Discussão.....	36
1.5. Conclusão.....	41
Referências Bibliográficas.....	42

Índice de Figuras

Figura 1 Técnica do Esfregaço Sanguíneo	8
Figura 2 Microhematócrito e tabela de leitura	9
Figura 3 Resultado positivo de uma prova de sangue oculto	15
Figura 4 Esquema do Método de Esgotamento do Inóculo	16
Figura 5 Técnica de dispersão	18
Figura 6 Sistema de Hemocultura – Signal Blood Culture System	19
Figura 7 Procedimento do Equipamento Vitek MS PRIME	22
Figura 8 Exemplo de slide do Vitek MS PRIME	22
Figura 9 Demonstração de Macroconídios e Microconídios dos géneros de dermatófitos	26

Índice de Tabelas

Tabela 1	Resumo dos materiais rececionados no laboratório e as suas características	2
Tabela 2	Kits para pesquisa de antígeno ou anticorpo utilizados no laboratório INNO.	7
Tabela 3	Tabela resumida dos tipos de amostras e sementeiras protocolados pela INNO	20
Tabela 4	Número de colónias formadas e respetivo resultado em UFC/mL	21
Tabela 5	Lista de antibióticos e respetivos halos de inibição a testar	24
Tabela 6	Nomenclatura dos dermatófitos atualizada	29
Tabela 7	Distribuição dos resultados obtidos a partir das culturas de fungos filamentosos	30
Tabela 8	Distribuição dos resultados por espécie e sexo dos animais.	30
Tabela 9	Distribuição dos resultados por idade	30
Tabela 10	Frequência dos géneros de dermatófitos presentes nas culturas positivas.	30
Tabela 11	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e espécie de animal	31
Tabela 12	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e sexo de animal	31
Tabela 13	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e idade de animal	32
Tabela 14	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e sexo de caninos	32
Tabela 15	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e idade de caninos	33
Tabela 16	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e sexo de felinos	33
Tabela 17	Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e idade de felinos	33
Tabela 18	Número de isolamentos por espécie do dermatófito e espécie do animal	35
Tabela 19	Distribuição dos casos felinos por idade e microrganismo	35
Tabela 20	Distribuição dos casos caninos por idade e microrganismo	35

Lista de Abreviaturas

Ac. – Anticorpo
Ag. – Antigénio
ALP – Fosfatase alcalina
ALT – Alanina aminotransferase
APTT – Tempo de Tromboplastina Parcial ativado
AST – Aspartato aminotransferase
CAMP – Agar Sólido Gelose *Campyloset*
CAN2/SGC2 – Chromid® Candida/Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar
CDT – Transferrina Deficiente em Carboidratos
CNA – Agar Sólido Columbia CNA + 5% *Sheep Blood*
COS – Agar Sólido Columbia COS + 5% *Sheep Blood*
CPSE – ChromIDTM CPS® Elite
DERM – Dermatophyte Agar
EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA – Ensaio imunoenzimático ligado a enzimas
Fêmea – F
GN – Gram-Negativo
GP – Gram-positivo
HEKT – Agar Sólido Chrom ID® Hektoen
Macho – M
MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*
MCK – Agar Sólido MacConkey
Microsporum canis – *M. canis*
Microsporum spp. – *M. spp.*
Nannizzia gypsea – *N. gypsea*
Nannizzia nana – *N. Nana*
OPG – Ovos por grama de fezes
PIF – Peritonite Infeciosa Felina
PLT – Plaquetas
PVX – Gelose chocolate Poly Vítex
RBC – Eritrócitos
RET – Reticulócitos
SALM – Agar Sólido Chrom ID® Salmonella
SCS – Schaedler Agar + 5% Sheep Blood
SPS – Polianetol Sulfonato de Sódio
TLI – Trypsin like immunoreactivity
TP – Tempo de Protrombina
Tricophyton equinum – *T. equinum*
Tricophyton mentagrophytes – *T. menta.*
Tricophyton rubrum – *T. rubrum*
Tricophyton spp. – *T. spp.*
Tricophyton tonsurans – *T. tonsurans*
TSH – Hormona estimulante da tiróide
UFC – Unidade Formadora de Colónia
WBC – Leucócitos
YER – Agar Sólido Yersinia CIN

Capítulo 1 – Estágio no laboratório INNO

1. Contextualização do estágio

O estágio e respectivo projeto foram desenvolvidos no âmbito da unidade curricular de Estágio do Mestrado de Análises Clínicas e Saúde Pública do ramo de Microbiologia e Saúde Pública, e foi realizado no laboratório veterinário INNO. O estágio decorreu de 1 de outubro a 13 de Março de 2024, tendo uma duração de 454 horas.

Este relatório pretende descrever as atividades desenvolvidas ao longo de todo período de estágio, na área das análises clínicas e descrever a frequência das infeções por dermatófitos nos animais de estimação.

2. Objetivos

O estágio realizado teve como objetivos consolidar conhecimentos e desenvolver competências na área das Análises Clínicas Veterinárias, nomeadamente, nas valências de bioquímica, imunologia, endocrinologia, microbiologia, hematologia, citologia e coagulação, acompanhar e efetuar a rotina laboratorial das diferentes valências; conhecer e compreender os princípios das diferentes metodologias utilizadas bem como interpretar e avaliar os resultados obtidos.

3. Caracterização da instituição

O INNO Laboratório Veterinário, fundado em 2007, pretende melhorar a qualidade de vida animal, prestando suporte veterinário e serviços laboratoriais diversos(1). É constituído por 2 locais, divididos por setores. O laboratório principal contempla os setores de bioquímica, imunologia, hematologia, citologia, endocrinologia e coagulação, e o laboratório secundário, os setores de microbiologia, anatomia patológica e biologia molecular.

4. Análises Clínicas Veterinárias: INNO Laboratório Veterinário

Os laboratórios veterinários tornaram-se cada vez mais importantes devido ao seu papel no diagnóstico precoce de doenças, na monitorização de doenças infecciosas e no fornecimento de testes especializados. Este ramo é de grande importância para a saúde pública, especialmente na investigação de doenças zoonóticas, uma vez que estes laboratórios realizam testes que permitem detetar agentes patogénicos em animais, rastrear a disseminação de infeções e estudar como estas podem ser transmitidas aos seres humanos. Esta investigação é

fundamental na prevenção e controlo de surtos, protegendo populações animais e humanas. Os avanços na tecnologia de diagnóstico, o aumento da posse de animais de estimação e a importância económica da pecuária saudável impulsionaram o seu crescimento. Além disso, os laboratórios veterinários são vitais na resposta a ameaças emergentes, como epidemias e os impactos das alterações climáticas na saúde animal(2,3).

4.1. Receção de Amostras


A receção das amostras é realizada ao longo de todo o dia, uma vez que chegam ao laboratório amostras enviadas de diferentes regiões do país. As amostras da região norte do país são transportadas pelos estafetas da INNO, enquanto as amostras das restantes zonas são enviadas pelos próprios através de diferentes serviços de entrega. As amostras devem chegar sempre acompanhadas pela ficha de requisição (disponibilizada pelo laboratório) na qual são indicadas todas as informações do animal, do tutor, da clínica de origem, do médico veterinário responsável, do(s) pedido(s) requisitado(s) e do historial clínico, se necessário.



Após a receção das amostras, estas são conferidas e inseridas na base de dados CliniData®. Após a inserção, as amostras são divididas por setores, sendo que todas as amostras de microbiologia, anatomia patológica e biologia molecular, são separadas para posterior envio para o laboratório secundário da INNO.

4.2. Acondicionamento de Amostras


Todos os estafetas da INNO encarregam-se de transportar as amostras nas suas condições protocoladas. Na tabela 1 encontram-se exemplificados os diferentes tipos de tubos e recipientes utilizados para a colheita das diferentes amostras que chegam ao laboratório.

Tabela 1 Resumo dos materiais rececionados no laboratório e as suas características(4–6)

Material para Envio	Características	Valências em qual são utilizadas
 <p>Tubo de tampa amarela com gel separador</p>	<p>Tubos sem anticoagulante, com ou sem gel separador, que permitem separar o soro para análise. A parede interna destes tubos é revestida com partículas microscópicas de sílica que ativam a coagulação, obtendo assim o soro, após a centrifugação, para posterior análise.</p>	<p>Bioquímica, Endocrinologia e Imunologia</p>

Material para Envio	Características	Valências em qual são utilizadas
 <p>Tubo de tampa vermelha sem gel separador</p>	<p>Mesmas características que o anterior</p>	<p>Bioquímica, Endocrinologia e Imunologia</p>
 <p>Tubo de Citrato de Sódio</p>	<p>O citrato de sódio evita a coagulação sanguínea nas amostras, através da formação de pontes iônicas com o cálcio (Ca²⁺)</p>	<p>Coagulação</p>
 <p>Tubo de EDTA</p>	<p>Tubos com paredes revestidas de anticoagulante o EDTA, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>. Este estabelece ligação com o cálcio, inibindo a cascata de coagulação. Deste modo, os eritrócitos, leucócitos e plaquetas mantêm-se preservados.</p>	<p>Hematologia</p>
 <p>Tubo de Heparina Lítio</p>	<p>A heparina atua como um anticoagulante criando um complexo com a antitrombina III, este complexo inibe a trombina e o fator X ativado e, portanto, evita a coagulação. Utilizado no INNO, para a colheita de sangue a aves e animais exóticos, uma vez que estes tem acessos venosos difíceis. Deste modo pretende-se realizar apenas uma colheita de um tubo de sangue para todas as análises necessárias.</p>	<p>Bioquímica e Hematologia</p>
 <p>Porta – lâminas</p>	<p>Transporte de lâminas</p>	<p>Citologia</p>

Material para Envio	Características	Valências em qual são utilizadas
 <p>Frasco Estéril</p>	<p>Material estéril para posteriores análises microbiológicas</p> <p>Também utilizado para amostra de fezes</p>	<p>Microbiologia (Urina e Fezes)</p> <p>Análise de Fezes</p>
 <p>Tubos com manitol para contagem e cultura de urina (CCM) (cima) e tubos de transporte de urina (baixo)</p>	<p>Mantém as bactérias estáveis até 48 horas, à temperatura ambiente.</p> <p>Tubo sem aditivos, apenas para transporte de urina</p>	<p>Microbiologia (Urina)</p> <p>Análises bioquímicas de urina</p>
 <p>Frasco para Hemocultura</p>	<p>Possui um meio especial que permite detetar o crescimento de microrganismos aeróbios, anaeróbios e microaerófilos no sangue</p>	<p>Microbiologia</p>
 <p>Zaragoas com Meio Amies</p>	<p>Adequado para transporte de amostras com suspeita de bactérias anaeróbias</p>	
 <p>Zaragatoa com Meio Stuart</p>	<p>Os organismos mais instáveis permanecem viáveis entre 24 horas até vários dias</p>	<p>Microbiologia (exsudados)</p>
 <p>Zaragatoa com Meio Amies com Carvão</p>	<p>O carvão vegetal absorve toxinas produzidas por microrganismos</p>	

Material para Envio	Características	Valências em qual são utilizadas
 <p>Zaragatoa com Meio Cary-Blair</p>	Indicado para amostras de fezes	Microbiologia (fezes)

4.3. Laboratório Central INNO

No laboratório central INNO, estão localizadas as valências de bioquímica, endocrinologia, imunologia, hematologia, citologia e coagulação. Todas as amostras para bioquímica, imunologia, coagulação e endocrinologia são centrifugadas a 2330g por 5 min e depois são divididas para os respectivos setores.

4.3.1. Bioquímica

A bioquímica fornece a base para compreender os processos fisiológicos, vias metabólicas e mecanismos moleculares subjacentes à saúde e à doença em animais. Ela desempenha um papel central na medicina veterinária, no diagnóstico, tratamento e estratégias de monitorização para uma ampla gama de condições que afetam animais de estimação, gado e vida selvagem(7). Neste setor existem diferentes equipamentos que permitem a realização das análises bioquímicas, são de referir o Roche Cobas® c501, Sebia Minicap e o Vcheck® V200.

Roche Cobas® c501

O equipamento Roche Cobas® c501 utiliza métodos turbidimétricos, colorimétricos e imunoenzimáticos e apresenta um módulo que permite quantificar elétrodos seletivos de iões sódio, potássio e cloreto. Alguns dos parâmetros bioquímicos quantificados pelo Cobas c501 são: ácidos biliares, albumina, fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina (direta e total), cálcio total, colesterol, creatinina, fructosamina, glicose, triglicéridos, entre outros. (5)

Sebia Minicap

O Sebia Minicap é um equipamento de eletroforese capilar multi-paramétrico, compacto e automatizado que oferece um leque variado de testes para amostras de soro e sangue total,

como testes de eletroforese de proteínas séricas, Imunotipagem, HbA1c, Hemoglobina e Transferrina Deficiente em Carboidratos (CDT) do inglês *Carbohydrate Deficient Transferrin* (6). No entanto, no laboratório INNO é apenas utilizado para proteinogramas.

Vcheck® V200

O analisador Vcheck V200 é um equipamento de medicina veterinária, que realiza ensaios de fluorescência, utilizando o európio como marcador fluorescente, para medir quantitativamente biomarcadores no soro, plasma e sangue total. O európio tem comprimentos de onda de excitação e de emissão distintos, pelo que não ocorre sobreposição das curvas de leitura, o que contribui para resultados mais precisos. Estão disponíveis vários tipos de tiras de testes para biomarcadores inflamatórios, pancreáticos, hormonais, cardíacos e de coagulação (7).

Ao longo do período de estágio apenas foram realizadas tiras de teste para medição da concentração de lipase específica do pâncreas felino e canino, úteis para o diagnóstico de pancreatite em ambas as espécies.

4.3.2. Endocrinologia

A endocrinologia veterinária é uma área da medicina veterinária que se concentra no estudo e tratamento das glândulas endócrinas e dos distúrbios hormonais em animais. As glândulas endócrinas são responsáveis pela produção e libertação de hormonas que regulam uma ampla variedade de funções corporais, como metabolismo, crescimento, reprodução, desenvolvimento e resposta ao stress(8).

O equipamento IMMULITE® 2000 *Immunoassay System* além de ter capacidade para realizar análises bioquímicas, é principalmente utilizado, no laboratório INNO, para processar as amostras direcionadas para endocrinologia (T4 total felina ou canina, TSH, T4 livre, Cortisol, Folato, Cobalamina, Progesterona, Digoxina, Estradiol, TLI felina ou canina e Troponina). Tem na sua base a tecnologia de imunoensaio por quimioluminescência, com capacidade de realizar até 200 testes por hora em amostras de soro, plasma ou urina (dependendo do teste a realizar)(9).

4.3.3. Imunologia

A imunologia veterinária desempenha um papel fundamental na compreensão e no tratamento das doenças infecciosas em animais. Os ensaios imunoenzimáticos ligado a enzimas (ELISA), do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, são uma ferramenta valiosa na deteção e quantificação de anticorpos específicos em amostras biológicas de animais(10).

O laboratório INNO dispõe de um vasto conjunto de kits para pesquisa de antígenos ou anticorpos pelas técnicas de ELISA e imunofluorescência. O método ELISA é um teste imunoenzimático baseado na interação antígeno-anticorpo, permitindo detectar Antígenos (Ag) ou Anticorpos (Ac). É uma das tecnologias de diagnóstico disponíveis mais sensíveis e reprodutíveis, com ensaios rápidos e de execução simples(11).

Estes kits podem ser realizados manualmente e de modo automático no equipamento Dynex Ds2. O tipo de amostra pode ser soro, plasma ou sangue total, dependendo sempre do tipo de teste, como apresentado na tabela 2.

Tabela 2 Kits para pesquisa de antígeno ou anticorpo utilizados no laboratório INNO.

Kit	Pesquisa	Espécies	Amostras
Leiscan®	Ac. anti <i>Leishmania infantum</i>	Cão	Soro ou Plasma
Ehrlichia ELISA	Ac. anti- <i>Ehrlichia canis</i>	Cão	Soro ou Plasma
ImmunoComb® Antibody Test Kit Canine	Ac. para o Parvovírus Canino e o vírus da Esgana	Cão	Soro, Plasma ou Sangue Total
VetLine Leptospira ELISA	Ac. contra a Leptospira	Cão	Soro
Distemper IgM Ab ELISA	Ac. (IgM) para o vírus da Esgana	Cão	Soro ou Plasma
FeLV Ag ELISA	Ag. do vírus da Leucemia Felina (FeLV)	Gato	Soro ou Plasma
FIV ELISA	Ac. para o vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)	Gato	Soro, Plasma ou Sangue Total
FCoV Ab ELISA	Ac. para o Coronavírus Felino	Gato	Soro, Plasma ou Sangue Total
ImmunoComb® Feline VacciCheck	Ac. para o vírus da Panleucopenia Felina, Herpes Vírus Felino e Calicivírus Felino	Gato	Soro, Plasma ou Sangue Total
VetLine Babesia	Ac. contra Babesia	Mamíferos	Soro

A imunofluorescência é uma técnica laboratorial usada para detectar proteínas ou antígenos específicos em amostras biológicas, como tecidos, células ou fluidos. Este método utiliza anticorpos que estão conjugados com fluoróforos para visualizar a presença e localização do antígeno alvo sob um microscópio de fluorescência(12). Os kits utilizados no laboratório são

para a *Babesia Canis*, *Ehrlichia Canis*, *Rickettsia conorii*, *Neospora Caninum*, *Ana Hep2*, *Anaplasma Phagocitophilum* e *Leishmania*.

4.3.4. Hematologia

Na hematologia veterinária é realizado o estudo das células sanguíneas e seus componentes em animais. Inclui o estudo dos eritrócitos, dos leucócitos e das plaquetas, bem como a avaliação de outros parâmetros hematológicos, como hemoglobina e hematócrito (4). Para o estudo dos parâmetros hematológicos é utilizado o equipamento Sysmex XN-V.

Sysmex XN-V

O Sysmex XN-V utiliza a técnica de citometria de fluxo fluorescente para análise de leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC), reticulócitos (RET), fração de reticulócitos imaturos (IRF), plaquetas (PLT) e fração de plaquetas imaturas (IPF). A principal vantagem deste equipamento passa por permitir diferenciar com elevada sensibilidade as populações normais de WBC, RBC e PLT das populações anormais, diminuindo assim o número de revisões manuais. (13)

Esfregaços Sanguíneos e Coloração

Os esfregaços sanguíneos são efetuados quando pedidos pelo cliente ou quando existe uma alteração nos parâmetros do hemograma realizado previamente.

Começa-se por posicionar a lâmina previamente identificada numa superfície lisa e plana; com um capilar contendo amostra homogeneizada, coloca-se uma gota de sangue próxima do lado fosco da lâmina; de seguida, sobrepõem-se uma outra lâmina limpa sobre a gota de sangue, num ângulo de aproximadamente 45º e desliza-se a lâmina para que o sangue se espalhe na lâmina de forma homogénea (Figura 1). Resta secar a lâmina e proceder com a sua coloração(14).

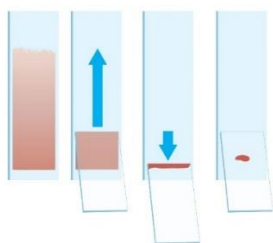


Figura 1 Técnica do Esfregaço Sanguíneo (15)

A coloração utilizada no laboratório INNO é do tipo Romanowsky Diff- Quik: trata-se de uma coloração simples e rápida, aplicada em esfregaços secos ao ar. Envolve apenas três soluções: um fixador, o metanol, um corante vermelho, a eosina (corante ácido) e um corante azul,

o azul de metileno (corante básico). Posteriormente as lâminas são lavadas em água corrente e secas(16)

Estes esfregaços são corados automaticamente no Equipamento RAL Stainer, cuja programação contém todos os passos da coloração de Romanowsky (17). As lâminas após coloração são entregues aos veterinários para posterior avaliação.

Microhematócrito

O microhematócrito é um exame complementar ao hemograma e permite determinar a percentagem de eritrócitos no volume de sangue total (7). Este é realizado manualmente quando pedido diretamente pelo cliente ou veterinário, ou quando é pedido apenas esfregaço pelo cliente e este serve como auxílio no diagnóstico.

Para a sua realização, começa-se por encher $\frac{3}{4}$ de um capilar com sangue e uma das extremidades é depois fechada com plasticina, por fim, o capilar é centrifugado durante 5 minutos a 101g. Após a centrifugação, os constituintes sanguíneos ficam separados de acordo com a sua densidade. Os eritrócitos depositam-se no fundo do capilar. Na camada intermédia, os leucócitos e as plaquetas. Na camada superior, o plasma. Com o auxílio de um gráfico de leitura específico realiza-se a leitura do hematócrito (camada depositada no fundo do capilar)(18) (Figura 2).

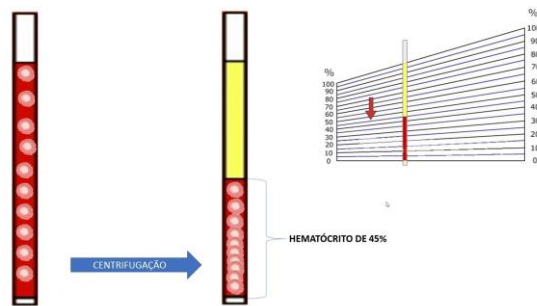


Figura 2 Microhematócrito e tabela de leitura (19)

4.3.5. Citologia

A citologia veterinária é uma área da medicina veterinária que se concentra no estudo das células dos animais. Envolve a análise microscópica das células para diagnosticar doenças, identificar células cancerígenas e avaliar a saúde geral dos tecidos e fluidos corporais dos animais. Sendo assim, a citologia desempenha um papel importante na prática veterinária, fornecendo informações valiosas para o diagnóstico, tratamento e monitorização de uma variedade de condições médicas em animais(20).

As amostras citológicas que chegam ao laboratório INNO, podem ser efusões em tubos de EDTA, amostras semilíquidas ou mucosas em seringas ou tubos secos, ou lâminas já prontas a corar.

De acordo com o protocolo da INNO, as lâminas prontas a corar são identificadas com o número citológico e é registado na requisição o número de lâminas e se contem gordura, uma vez que a sua presença interfere na coloração. Nas citologias líquidas, regista-se a opacidade e cor na requisição e de seguida realizam-se 2 lâminas pelo método *Squash* e uma pelo método de *Cytospin*. Nas efusões realiza-se o mesmo que nas citologias líquidas, com a adição da prova de Rivalta, se for uma amostra felina, e uma contagem celular no Sysmex-XN. Amostra de efusão também é analisada na bioquímica para a contagem de proteínas totais.

A prova de Rivalta tem como objetivo auxiliar o diagnóstico de Peritonite Infecciosa Felina (PIF) em efusões de gatos(20). Este inicia-se por colocar num tubo de fundo cónico 8 mL de água destilada e adicionar 1 gota (20-30 µL) de ácido acético (98-100%). De seguida homogeneizar a solução e com o auxílio de uma pipeta, adicionar uma gota da efusão e colocá-la na superfície da solução. Se a gota aderir à superfície e mantiver a sua forma ou flutue lentamente para o fundo da solução o teste é considerado positivo, pois indica-nos que existe uma alta concentração de proteínas presente no líquido cavitário de animais com PIF. Já em casos negativos a gota dilui-se rapidamente na solução.(21)

Para a realização da lâmina *squash*, é colocada uma gota do material na extremidade de uma lâmina de vidro (próximo da extremidade fosca) e uma segunda lâmina, alinhada perpendicularmente à primeira, é pousada sobre ela e deslizada ao longo do seu comprimento até se separarem. O método do *Cytospin* é um método rápido, eficiente e económico que permite aumentar o rendimento celular em amostras pouco concentradas de elementos celulares, preservando a morfologia celular(22). Este método consiste na centrifugação da amostra líquida (90g, durante 5 minutos), num suporte apropriado, de forma a formar uma fina camada de células na superfície da lâmina.

Depois de tratadas todas as lâminas seguem para o equipamento RAL Stainer, onde são coradas pelo método de Romanowsky.

Após a coloração, procede-se à montagem das lâminas, onde são "lavadas" com xilol, depois deposita-se uma gota de meio de montagem e coloca-se a lamela por cima, de modo a facilitar a visualização ao microscópio. De seguida as lâminas são observadas e analisadas pelos veterinários.

4.3.6. Coagulação

O estudo da coagulação em medicina veterinária é fundamental para diagnosticar e tratar distúrbios hemorrágicos e trombóticos em animais. A coagulação sanguínea é um processo complexo que envolve uma série de fatores e mecanismos que interagem para garantir que o sangue permaneça líquido quando circula no corpo, mas forme um coágulo quando ocorre uma lesão para evitar a perda excessiva de sangue(23).

No laboratório INNO as provas de coagulação são realizadas no equipamento Sysmex® CA-540.

Sysmex® CA-540

O Sysmex® CA-540 permite a realização de medições imunológicas (método turbidimétrico - 575nm), de coagulação (métodos de detecção por dispersão de luz) e cromogénicas (método colorimétrico, 405 nm), sendo capaz de realizar até 50 testes por hora(24).

Neste equipamento são realizadas a determinação do Tempo de Protrombina (TP), Tempo de Tromboplastina Parcial ativado (APTT) e Fibrinogénio.

4.3.7. Análise Urina

Urina Tipo I

A análise tipo I ou urianálise, consiste na avaliação dos parâmetros bioquímicos e da densidade através de tiras-teste reativas. Começa-se por avaliar a Cor e a Turbidez da amostra e determinar o valor da Densidade, com auxílio do refratómetro ótico portátil. Seguidamente, utilizando o equipamento Siemens Clinitek Status®+, através de tiras-teste são realizados os seguintes parâmetros: glicose, bilirrubina, cetonas, sangue, pH, proteínas, urobilinogénio, nitritos e leucócitos(25)(16).

Urina Tipo II

A urina tipo II ou urina de sedimento, corresponde à avaliação microscópica do sedimento urinário. A amostra de urina é transferida para um tubo de falcon (cerca de 5ml de amostra) e esta é centrifugada a 90g durante 5 minutos. Depois da centrifugação, é rejeitado o sobrenadante, deixando no tubo cerca de 0,5ml de amostra, para posterior ressuspensão e visualização ao microscópio, para identificação de elementos que podem ser visualizados no sedimento – células epiteliais, cristais, cilindros, bactérias, fungos, eritrócitos, leucócitos.

4.3.8. Análise de Fezes

Exame Macroscópico Fecal

O primeiro passo da análise fecal passa pelo registo macroscópico do aspeto das fezes. É registada a consistência - Moldadas, Moldadas Ligeiramente Pastosas, Pastosas, Diarreia Pastosa, Diarreia Líquida ou Disenteria - e a presença de elementos anormais (Muco, Sangue, Parasitas, Ervas, Objetos, Linhas, Papel, Borracha, Plástico, Ossos e/ou Pelos).

As técnicas para os exames fecais utilizadas no laboratório INNO, são: a técnica de flutuação fecal, a técnica de Baermann, técnica e McMaster e a pesquisa de sangue oculto nas fezes. Também é realizada a Identificação de *Cryptosporidium* spp. utilizando o método de coloração de Ziehl-Neelsen Modificado, mas não abordei este tema, nem realizei esta técnica no meu período de estágio.

Técnica de Flutuação Fecal

A técnica de flutuação fecal é um método utilizado em medicina veterinária para detetar e identificar parasitas intestinais em amostras de fezes de animais. Esta técnica é especialmente útil na deteção de ovos de parasitas que podem estar presentes no trato gastrointestinal dos animais. O processo de flutuação fecal envolve o uso de uma solução concentrada de sulfato de zinco, que é adicionada à amostra de fezes. Esta solução possui uma densidade específica que é maior do que a densidade dos ovos de parasitas, fazendo com que eles flutuem para a superfície da solução quando a amostra é centrifugada. Isso permite que os ovos de parasitas sejam concentrados e facilmente visualizados sob um microscópio(26).

Uma vez que os ovos de parasitas estão concentrados na superfície da solução de flutuação, eles podem ser colhidos e examinados microscopicamente para identificar o tipo de parasita presente. Isso é importante para o diagnóstico e tratamento adequado das infeções parasitárias em animais(27)25).

Para a realização desta técnica dissolve-se uma pequena quantidade de fezes, correspondente ao tamanho de uma avelã, num gobelé com 20 mL de sulfato de zinco a 45%. Quando bem homogeneizado, o conteúdo do gobelé é filtrado e transferido para um tubo de fundo cónico, através de uma compressa aberta num funil. Os tubos com as amostras são então centrifugados a 430g, durante 5 minutos. Posteriormente, é necessário perfazer o volume total de cada tubo, com sulfato de zinco a 45%, até se formar uma superfície convexa, colocando-se sobre esta superfície uma lamela. Passados 15 a 20 minutos, as lamelas são cuidadosamente transferidas para lâminas previamente identificadas e com uma gota de lugol. A amostra fica

assim pronta para observação microscópica. É importante referir que a visualização microscópica de ovos é considerada um resultado positivo apenas em espécies não ruminantes e equinas, uma vez que para estas espécies utiliza-se a técnica de McMaster (18,22).

Técnica de Baermann

A técnica de Baermann é um método utilizado em parasitologia veterinária para o diagnóstico de larvas de nematóides (vermes redondos) que podem estar presentes em amostras de fezes de animais. Esta técnica é especialmente útil na deteção de larvas de nematóides que vivem em ambiente aquático ou húmido, como é o caso de alguns parasitas pulmonares(28).

Nesta técnica, coloca-se uma quantidade de cerca de 10-15 gr de fezes no centro da gaze e com a ajuda de um elástico, embrulham-se as fezes na gaze formando uma bolsa. Coloca-se esta bolsa no funil que está acoplado a um tubo longo de borracha. No final deste tubo “tranca-se” com um clampeador. Enche-se então o funil com água a 37°C até ao topo e deixa-se repousar durante 8 a 24 horas, de preferência durante a noite. Passado este tempo, retira-se cautelosamente o clampeador e drena-se 5ml do líquido que está no tubo de borracha para um tubo de fundo cónico, este tubo vai centrifugar a 430g durante 5min. Por fim, rejeita-se o sobrenadante sem tocar no sedimento e ressuspende-se o sedimento. Colocar-se 2 gotas na lâmina com uma lamela e observa-se ao microscópio.

Técnica de McMaster

A técnica de McMaster é uma técnica de flutuação comumente utilizada na rotina laboratorial para diagnóstico de parasitas gastrointestinais de ruminantes e equídeos. Estas espécies contêm naturalmente nas suas fezes ovos, ao contrário de outros animais, por isso, esta técnica e a sua contagem de ovos por grama de fezes (OPG), classificada assim como técnica quantitativa, permite um diagnóstico correto para uma infeção parasitológica(29).

No laboratório INNO, O OPG é obtido somando-se a quantidade de ovos observados na área esquerda da câmara com a quantidade na área direita, e multiplicando o resultado por 25. Nesta técnica pesa-se 4g de fezes que são de seguida transferidas para um gobelé. Seguidamente, junta-se cerca de 26 ml de sulfato de zinco a 45% e dissolve-se completamente as fezes com a ajuda da vareta. Depois, passa-se o conteúdo do gobelé através da compressa aberta no funil, para reter os detritos, para o tubo de fundo cónico. Para finalizar, completa-se o

volume total do tubo de fundo cónico com sulfato de zinco a 45%, enche-se por capilaridade a câmara de McMaster e deixa-se repousar durante 5 minutos(29,30). Dependendo do animal, temos diferentes interpretações como indicado a seguir:

Parasitologia ruminantes

Interpretação para ovos de strongilídeos gastro-intestinais:

- Infeção fraca 100- 200 OPG
- Infeção moderada 300 -500 OPG
- Infeção forte 600- 800 OPG
- Infeção maciça \geq 900 OPG

Parasitologia cavalos

Interpretação para ovos de strongilídeos para espécie equina:

- Infeção fraca: 0 - 99 OPG
- Infeção moderada: 100 - 499 OPG
- Infeção forte: $>$ 500 OPG

Pesquisa de Sangue Oculto em Amostras de Fezes

A pesquisa de sangue oculto em amostras de fezes é um exame utilizado na medicina veterinária para detetar a presença de pequenas quantidades de sangue nas fezes, que podem não ser visíveis a olho nu. Esta deteção é importante porque o sangue nas fezes pode ser um sinal de diversas condições médicas, como parasitoses intestinais, lesões no trato gastrointestinal, inflamações, úlceras, tumores ou distúrbios de coagulação. O teste de pesquisa de sangue oculto é frequentemente realizado em animais quando há suspeita de sangramento gastrointestinal, mesmo que não haja sinais visíveis de sangue nas fezes. O teste pode ajudar a diagnosticar problemas gastrointestinais que não são facilmente detetados por meio de exames clínicos ou de imagem(28).

No laboratório INNO, a pesquisa de sangue oculto em amostras fecais é realizada a partir de um kit rápido designado por "*Stool Blood Test Single Slide*". Que engloba o seguinte procedimento:

1. Homogeneizar as fezes com a ajuda de uma vareta de vidro;
2. Com o aplicador de madeira retirar um pouco de fezes e aplicar no teste A;
3. Com o mesmo aplicador de madeira retirar um pouco de fezes de um local diferente e aplicar no teste B;

4. Fechar a tampa frontal e abrir a tampa posterior;
5. Adicionar 2 gotas de "*Developing Solution*" diretamente em cada área do teste, aguardar 30 segundos;
6. Adicionar uma gota de "*Developing Solution*" nas áreas de controlo (positivo e negativo);
7. Aguardar um minuto e fazer a leitura do teste como descrito na bula do Kit pesquisa de sangue oculto – Cenogenics.

Qualquer vestígio de cor azul ou azul-verde indica a presença de sangue, ou seja, um resultado positivo. Para a validação do teste a áreas de controlos tem de apresentar uma cor azul/rosa (controlo positivo) e cor amarela (controlo negativo)(31). A figura 3 demonstra um resultado positivo.



Figura 3 Resultado positivo de uma prova de sangue oculto (Fonte: fotografia tirada em contexto de estágio laboratorial)

4.4. Laboratório 2 INNO – Microbiologia

Microbiologia é uma disciplina científica dedicada ao estudo de microrganismos unicelulares, multicelulares ou acelulares. Pode ser subdividida em bacteriologia, micologia, parasitologia e virologia.(32)

4.4.1. Processamento de Amostras

No laboratório INNO, são rececionadas amostras, enviadas pelo laboratório central. Como referido anteriormente na tabela 1, as amostras rececionadas pela área da microbiologia englobam: exsudados, urinas, fezes, pelos/crosta, unhas e hemoculturas.

Processamento de Exsudados

Um exsudado é uma acumulação de líquido numa área do corpo em resposta a uma inflamação ou infeção. Geralmente, é composto por plasma sanguíneo, proteínas, células inflamatórias e detritos celulares(33,32). Este líquido pode acumular-se em tecidos ou cavidades

do corpo, como nos pulmões, pleura, articulações, entre outros. Assim, chegam ao laboratório várias origens de exsudados como auriculares, oculares, cutâneos, nasais, abscessos, etc.

Para o envio destas amostras são frequentemente utilizados tubos com meio de transporte Amies, o que permite preservar os microrganismos presentes na amostra até que seja realizada a sementeira.

De forma a isolar o(s) agente(s) patogénico(s) presente(s) nas amostras provenientes de exsudados, são realizadas sementeiras em três tipos de meio:

- Agar Sólido MacConkey (MCK) – meio sólido diferencial e seletivo permite o isolamento seletivo de bactérias Gram-Negativo (GN), pois na sua composição contém sais biliares e cristal violeta, que inibem o crescimento de bactérias Gram-positivo (GP), conferindo-lhe a sua seletividade, e a presença de lactose permite distinguir as bactérias GN que utilizam lactose (colónias rosa), das que não utilizam (34,33).
- Agar Sólido Columbia CNA + 5% *Sheep Blood* (CNA) – meio seletivo e diferencial, permite o isolamento seletivo de GM, é constituído pelos antibióticos colistina e ácido nalidíxico, que inibem o crescimento de bactérias GN, e o sangue torna possível diferenciação de organismos GP com base na reação hemolítica(34);
- Agar Sólido Columbia COS + 5% *Sheep Blood* (COS) – meio de enriquecimento sólido e diferencial, uma vez que suporta o crescimento de muitas bactérias fastidiosas e diferencia com base na capacidade da hemólise nos microrganismos(34);

Na Inno, também está protocolado que certos tipos de exsudados são semeados em gelose chocolate Poly Vitex (PVX) – para bactérias fastidiosas, este contém um suplemento de ácidos nucleicos e aminoácidos para favorecer o crescimento das espécies *Neisseria* e fornecer os fatores sanguíneos X e V exigidos pelas espécies *Haemophilus* (35,34).

Estes exsudados são semeados pelo método de Esgotamento do Inóculo, como demonstrado na figura 4.

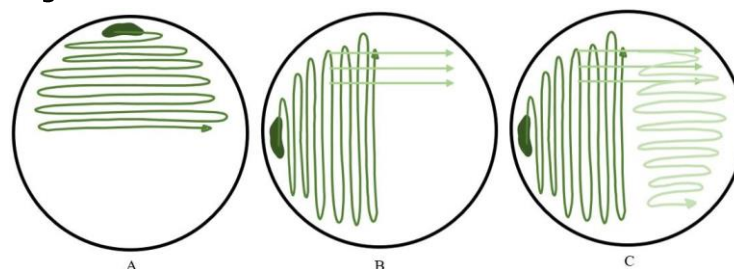


Figura 4 Esquema do Método de Esgotamento do Inóculo - (A) A partir do inóculo, realizar estrias até metade da placa, em movimentos de ziguezague. (B) Rodar a placa de Petri e realizar três estrias a partir das anteriores. (C) Em ziguezague, realizar mais estrias(34)

As placas semeadas são incubadas na estufa a 37°C, durante 24 a 48 horas. Simultaneamente à sementeira, também é realizada uma lâmina para cada amostra, para posteriormente corar por Gram e observar ao microscópio.

Isolamento de Leveduras

Por vezes, nos exsudados também é solicitada a pesquisa de leveduras. Nestes casos, a sementeira, pelo método de esgotamento, é feita no meio Chromid® Candida/Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol 2 agar (CAN2/SGC2). Este é um meio sólido cromogénico, que permite a identificação direta de algumas espécies de *Candida*, através da alteração da mudança de cor: *C. albicans* (verde), *C. tropicalis* (azul), *C. parapsilosis* (branca) e *C. glabrata* (malva). A gentamicina e coloranfenicol irão inibir as bactérias Gram-negativo e Gram-positivo, promovendo assim a seletividade do meio(36).

As placas semeadas são incubadas na estufa a 37°C, durante ou até 10 dias.

Isolamento de Microrganismos Anaeróbios

Nos pedidos de exsudados, também poderá ser adicionado ou pedido somente, a pesquisa de microrganismos anaeróbios. No laboratório, o meio de cultura utilizado para o isolamento de bactérias anaeróbias é designado por SCS (Schaedler Agar + 5% Sheep Blood), este é um meio seletivo que contém os componentes do meio CNA, mas com pouco oxigénio na sua composição. Acresce ainda a vitamina K1, que aumenta a recuperação de certos anaeróbios e a colistina e ácido nalidíxico que são agentes seletivos que inibem as bactérias Gram-negativo, especialmente as *Enterobacteriaceae*(37).

Posteriormente, as placas são incubadas na Jarra de Anaerobiose (Thermo Scientific Oxoid™ AnaeroJar™ 2,5L), a 37°C, durante 24 a 48 horas, juntamente com uma saqueta de anaerobiose.

Processamento de Urinas

A urina e os exsudados são o tipo de amostras mais recebidas no laboratório de microbiologia da INNO. Sempre que possível, a urina e os exsudados devem ser colhidos por cistocentese, pois é o método com maior assepsia em comparação com a micção espontânea ou a algaliação(38). Idealmente, estas amostras devem ser enviadas em tubos de urina (VACUETTE® Urine CCM), que contém ácido bórico, tetraborato de sódio, formiato de sódio e manitol para preservação da amostra(39).

A urocultura é realizada em meio CPSE (chromIDTM CPS® Elite), com o auxílio de uma ansa estéril calibrada para 1µL, segundo a Técnica de dispersão (figura 6). Este meio cromogénico permite o isolamento e enumeração dos microrganismos mais comuns do trato urinário, e as colónias são bem isoladas e fáceis de identificar com cores diferenciadoras(40).

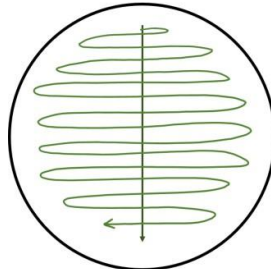


Figura 5 Técnica de dispersão – Com a ansa previamente mergulhada na amostra, fazer uma primeira estria ao longo do diâmetro da placa. Uma segunda estria em ziguezague é realizada a partir do início da estria anterior(34).

As placas semeadas são incubadas na estufa a 37°C, durante 24 a 48 horas.

Processamento de Fezes

As amostras de fezes podem chegar ao laboratório em frascos estéreis ou em zaragatoas em meio de Cary Blair, este último é o mais indicado pois preserva a amostra e os microrganismos contidos nesta. O processamento deste tipo de amostras destina-se à pesquisa e isolamento de agentes causadores de enterites, ou outras doenças do sistema digestivo, causadas por *Salmonella* spp., *Echerichia coli* Enterohemorrágica, *Campylobacter* spp., *Sighella* spp., *Yersinia* spp(41).

Os quatro meios utilizados para semear uma amostra de fezes são:

- Agar Sólido Yersinia CIN (YER)– um meio seletivo para o isolamento de *Yersinia* spp
- Agar Sólido Chrom ID® Salmonella (SALM)– meio cromogénico para o isolamento seletivo e identificação de *Salmonella* spp.
- Agar Sólido Chrom ID® Hektoen (HEKT) – meio seletivo de *Salmonella* spp. e *Shighella* spp.
- Agar Sólido Gelose *Campyloset* (CAMP)– meio seletivo para o isolamento de *Campylobacter* spp

As placas semeadas são incubadas na estufa em atmosfera de aerobiose a 37°C, durante 24 a 48 horas, com exceção dos meios CAMP – que devem ser colocados em microaerobiose, na Jarra de Anaerobiose.

Processamento de pelos/unhas

O objetivo deste processamento é isolar fungos filamentosos (Dermatófitos, *Aspergillus*, *Alternaria*, entre outros) de amostras como pelos, unhas e crostas.

O meio de cultura utilizado é o *Dermatophyte Agar* (DERM), pois é um meio seletivo, onde as peptonas fornecem azoto e são a fonte de produtos alcalinos, produzidos por dermatófitos. Quando as peptonas são metabolizadas em produtos alcalinos, ocorre uma alteração no indicador vermelho de fenol, de amarelo para vermelho. A cicloheximida, presente no meio, é um inibidor para bolores e leveduras não-patogénicas, enquanto a gentamicina e a tetraciclina são inibidores bacterianos(42).

Com a ajuda de uma pinça estéril, espalha-se os pelos/unhas/crostas pelo meio de cultura e vai incubar em atmosfera de aerobiose a 25°C, durante um período que pode ir até 21 dias.

Processamento de Hemoculturas

Os frascos de hemocultura distinguem-se por possuírem um meio nutritivo para todos os tipos de microrganismos, incluindo anaeróbios, microaerófilos e aeróbios. Este meio de cultura, que contem SPS (Polianetol Sulfonato de Sódio) na sua composição, previne a coagulação, neutraliza o efeito bactericida do soro, previne a fagocitose e inativa parcialmente alguns antibióticos(43).

O sangue chega ao laboratório sempre no frasco de hemocultura, onde após a receção é colocada a câmara indicadora de crescimento, e vai a incubar na estufa a 37°C, como indicado na figura 6.

Os gases libertados do crescimento microbiano provocam um aumento de pressão, sendo que a câmara indicadora de crescimento recebe parte da mistura amostra/meio, e é a presença dessa mistura no indicador de crescimento que determina a positividade da amostra(43). Dessa mistura são realizadas as sementeiras de aerobiose e anaerobiose.



Figura 6 Sistema de Hemocultura – Signal Blood Culture System(43)

Aquando da realização de cada sementeira dos diferentes produtos que chegam ao laboratório, são também efetuadas lâminas para posteriormente corar por Gram e observar ao microscópio, exceto no caso das urinas e das amostras de pelo/unhas.

Na tabela 3 pode-se verificar resumidamente o processamento das amostras que chegam ao laboratório de microbiologia.

Tabela 3 Tabela resumida dos tipos de amostras e sementeiras protocolados pela INNO

Amostras	Meios	Técnica
Urinas	CPSE	Sementeira por dispersão
Efusões Abscessos Líquidos Encapsulados Líquidos Purulentos Exs. Nasal/Traqueia LBA Exs. Vaginal	PVX COS CNA MCK	Sementeira por esgotamento
Exs. Auricular Exs. Ocular Exs. Prostático Exs. Cutâneo Outros	COS CAN MCK	Sementeira por esgotamento
Anaeróbios	SCS CPSE	Sementeira por esgotamento
Fezes	SALM HEKT YER CAMP	Sementeira por esgotamento
Cultura Fúngica de Leveduras	SGC2	Sementeira por dispersão
Cultura Fúngica de Pelos e Unhas	DERM	Estender pêlos pela placa toda com ajuda da pinça

4.4.2. Coloração de Gram

A coloração de Gram é uma técnica de coloração diferencial realizada quando há suspeita de infecção bacteriana. A técnica classifica as bactérias em dois grandes grupos: bactérias Gram-negativo e Gram-positivo. A coloração de Gram diferencia as bactérias com base nas propriedades de coloração diferencial da parede celular bacteriana. Bactérias com camada espessa de peptidoglicanos coram de azul a roxo e são identificadas como Gram-positivo, enquanto bactérias com camada fina de peptidoglicano coram de vermelho a rosa e são identificadas como Gram-negativo. As principais etapas da coloração de Gram incluem a coloração com violeta de cristal (cor roxa), a fixação do corante com lugol, (mordente), a descoloração com etanol (solvente) e a contra-coloração com safranina (cor vermelha) (44).

No laboratório de Microbiologia do INNO, este procedimento é realizado no equipamento Previ® Color, um equipamento de coloração automatizada, que permite realizar a coloração de Gram, até 12 lâminas ao mesmo tempo, de uma forma mais precisa, rápida e amigável ao ambiente(45).

4.4.3. Identificação de Microrganismos

Uma amostra para pesquisa de microrganismos é considerada positiva se se verificar crescimento ao longo do período de incubação previsto e negativa se não existir aparecimento de colónias após o término do período de incubação previsto, sendo que para as amostras, exceto leveduras e fungos filamentosos, é um período de incubação de 48h, e para estes é de 10 e 21 dias respetivamente.

Ao observar as placas é determinado o número de Unidade Formadora de Colónia (UFC) (Tabela 2). UFC é a unidade utilizada em microbiologia para estimar o número de microrganismos viáveis numa amostra(46). O número de colónias visíveis presentes numa placa pode ser multiplicado pelo fator de diluição para fornecer o resultado em UFC/mL(47).

Tabela 4 Número de colónias formadas e respetivo resultado em UFC/mL (tabela adaptada dos protocolos práticos de microbiologia da INNO).

De 1 a 9 colónias	10^3 UFC/mL
De 10 a 99 colónias	10^4 UFC/mL
Acima de 100 colónias	10^5 UFC/mL

Para as placas positivas (exceto fungos filamentosos), é realizada a identificação no equipamento Vitek®MS PRIME e repicam-se colónias para uma lâmina de vidro para posterior coloração de Gram.

Para as placas positivas de fungos filamentosos: deve-se descrever a cor, textura, superfície e pigmento difusível no meio de cultura. De seguida colocar um pedaço de fita transparente na superfície da colónia com o auxílio de uma pinça e fazer alguma pressão para as estruturas aderirem à superfície da fita cola. Cola-se a fita cola na superfície de uma lâmina, à qual é adicionada uma gota de azul de lactofenol. A lâmina fica pronta para observação ao microscópio. Com auxílio do atlas de fungos identifica-se a forma e o arranjo característicos dos esporos para a identificação do género e eventualmente a espécie, em conjunto com as características da colónia observadas anteriormente.

4.4.4. Equipamentos Vitek®

O procedimento do Vitek®MS PRIME baseia-se em picar com uma caneta específica do equipamento, uma colônia e espalhar a colônia num “poço” do slide de identificação, depois coloca-se uma gota da matriz (reagente de absorção de energia, geralmente uma mistura de moléculas orgânicas como o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico), sobre a amostra e o slide é inserido no equipamento, como representado na figura 3. Cada slide é composto por 3 quadrantes e cada um desses contem 16 “poços” (figura 4)(48)



Figura 7 Procedimento do Equipamento Vitek MS PRIME (48)

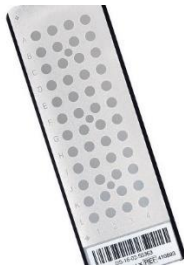


Figura 8 Exemplo de slide do Vitek MS PRIME (48)

Este equipamento utiliza o método de MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) que é uma técnica de espectrometria de massa amplamente utilizada para identificação rápida e precisa de microrganismos, incluindo bactérias e fungos(49). Este consiste em expor a amostra a pulsos curtos de laser ultravioleta que ionizam as moléculas na matriz e no microrganismo. Isso resulta na formação de iões carregados positivamente. Os iões produzidos são então acelerados através de um campo elétrico em direção a um detetor. Como os iões têm massas diferentes, eles viajam a velocidades diferentes (de acordo com a equação de TOF), o que permite determinar as suas massas. Com base no tempo de voo dos iões, um espectro de massa é gerado. Este espectro é único para cada microrganismo devido à sua composição proteica única. O espectro de massa é então comparado com um banco de dados que contém perfis de espectros de massa de microrganismos conhecidos. A identificação do microrganismo é realizada comparando o espectro obtido com os espectros de referência no banco de dados. A identificação é então fornecida pelo equipamento como uma pontuação de confiança ou uma lista de possíveis identificações(50).

Após esta identificação, as culturas são separadas conforme os seus microrganismos, ou sejam as placas são separadas por bactérias GP e GN, ou ainda leveduras e são então, realizados os antibiogramas no equipamento VITEK® 2 Compact, que utiliza cartas de testes de sensibilidade aos antibióticos (AST). Estas cartas são preparadas de acordo com o protocolo do equipamento:

1. Transferir 3,0mL de solução salina estéril (0,45% NaCl, pH 4,5 a 7,0) para um tubo de poliestireno utilizando o dispensador que já se encontra ajustado para esta quantidade.
2. Transferir com uma zaragatoa ou ansa o número suficiente de colónias de uma cultura pura para o tubo com a solução salina.
3. Agitar o tubo no vortex para obter uma suspensão homogénea
4. Medir a turvação no DensiChek™ seguindo as indicações nas cartas.
5. Num segundo tubo contendo 3,0mL de solução salina estéril (0,45% NaCl, pH 4,5 a 7,0), transferir 145µl da suspensão preparada anteriormente para as cartas AST-GN ou 280µl da suspensão preparada anteriormente para as cartas AST-GP. Utilizar as pipetas já calibradas.
6. Colocar os tubos no carrossel, acoplar as cartas aos respetivos tubos e correr no equipamento.

É de salientar que o equipamento também realiza a identificação de microrganismos, mas com a utilização do MS Prime, o laboratório não as realiza.

O VITEK® 2 Compact tem na base do seu funcionamento a tecnologia colorimétrica - o sistema lê as cartas VITEK® (compostas por 64 poços com provas bioquímicas liofilizadas, sem necessidade de adição de reagentes) utilizando 3 comprimentos de onda diferentes. Todo o processo é mais rápido e seguro uma vez que as cartas constituem um sistema fechado e descartável(51).

O densitómetro (DensiCHEK™ Plus) é utilizado para medir a densidade ótica da suspensão de microrganismos. Apresenta valores em unidade de McFarland, com um intervalo de leitura variando de 0,0 a 4,0 McFarland. O equipamento determina a razão entre a luz difusa e a luz transmitida, sendo essa razão diretamente proporcional à densidade de células em suspensão(52).

Antibiogramas Manuais

Por vezes há necessidade de se realizar antibiograma manualmente pelo método da

difusão de discos (Kirby-Bauer). Este exame consiste na inoculação de uma placa com uma solução padronizada dos microrganismos a serem testados e, em seguida, colocar discos com diferentes tipos de antibióticos para avaliar a suscetibilidade do microrganismo aos antibióticos presentes nos discos(53). A determinação da sensibilidade bacteriana manual é realizada apenas nos casos em que não é possível a sua realização de forma automatizada no equipamento VITEK® 2 Compact, como por exemplo, algumas espécies de anaeróbios e *Bacillus* spp.

Os meios de cultura a utilizar são o Agar Mueller Hinton: para *Bacillus* spp. e Bactérias Não Hemolíticas e o Agar Mueller Hinton Sangue: para Anaeróbios e Bactérias Hemolíticas (Exemplos: *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*).

O procedimento para realizar o antibiograma manual envolve a realização de uma suspensão de microrganismos na concentração de 0,5 da escala de McFarland, semear, com uma zaragatoa estéril, a placa em todas as direções (5 direções) – de forma a abranger toda a superfície. De seguida, com uma pinça, são colocados os discos sobre a superfície do meio inoculado, exercendo uma leve pressão com a ponta da pinça de forma a permitir uma melhor adesão dos discos. Cada placa pode ter até 6 discos, sendo colocadas a incubar na estufa a 36º C, durante 24 horas. Por fim, para determinar se a bactéria testada é sensível ou resistente aos discos antibióticos, é necessário medir o halo inibitório potencial para cada disco e consultar as tabelas com os valores esperados de halos inibitórios – CLSI (Tabela 3).

Tabela 5 Lista de antibióticos e respetivos halos de inibição a testar (tabela adaptada dos protocolos práticos de microbiologia da INNO, com base nas tabelas CLSI).

Antibióticos	Sensível ≥	Resistente <
Ampicilina	17 mm	13 mm
Amoxicilina – Ácido Clavulânico	18 mm	13 mm
Cloranfenicol	08 mm	8 mm
Polimixina B	12 mm	12 mm
Trimetoprim – Sulfametoxazol	16 mm	10 mm
Amicacina	18 mm	15 mm
Gentamicina	17 mm	14 mm
Tobramicina	17 mm	14 mm
Canamicina	16 mm	64 mm
Enrofloxacina	23 mm	16 mm
Tetraciclina	15 mm	11 mm
Doxiciclina	14 mm	10 mm
Clindamicina	21 mm	14 mm

Capítulo 2 – Frequência de fungos Dermatófitos em Animais de Companhia num Laboratório em Portugal

1. Introdução

A dermatofitose é uma micose cutânea que afeta o epitélio queratinizado e é a infeção fúngica mais comum numa ampla gama de animais domésticos (54). Os agentes etiológicos destas infeções, denominados de dermatófitos, pertenciam inicialmente a três géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*. Contudo, mais recentemente com a aplicação de técnicas moleculares verificou-se que a classificação anterior, baseada essencialmente em características morfológicas e de crescimento, não refletia a variação genética existente entre espécies. Assim, atualmente os dermatófitos encontram-se agrupados em 7 géneros: *Epidermophyton*, *Microsporum*, *Trichophyton*, *Arthroderma*, *Paraphyton*, *Nannizzia*, *Lophophyton* (55). A palavra dermatófito é derivada do grego *derma* "pele" e *phyton* "planta". Os dermatófitos são fungos filamentosos hialinos, septados, queratinofílicos e queratinolíticos que causam danos na queratina das unhas, pele e pelos(56).

Estes fungos podem ser classificados de acordo com o seu habitat natural em: geofílicos, quando são isolados habitualmente do solo, zoofílicos, quando vivem em animais e antropofílicos quando vivem nos seres humanos, sendo este o seu único hospedeiro. O clima quente e húmido favorece o crescimento de dermatófitos. Os animais geralmente apresentam uma combinação de sinais e sintomas como queda de cabelo com lesões na pele irregulares ou circulares, rubor na pele ou pele escura, prurido, entre outros, que afetam a sua qualidade de vida, e em casos graves podem ocorrer infeções secundárias(57).

Os dermatófitos produzem colónias que diferem em textura, cor e taxa de crescimento. Existem três formas de colónias, incluindo a forma membranosa, a forma filamentosa e a forma granular-pulverulenta(58). Na forma membranosa as colónias são glabras, cerosas, húmidas e faviformes. Na forma filamentosa as colónias são algodoadas com micélio aéreo, como exemplo, temos as colónias de *Microsporum canis*, *Nannizzia nana*, *Trichophyton rubrum*, e *Epidermophyton floccosum* (2).

A estrutura microscópica dos dermatófitos expõe uma série de características únicas que auxiliam na sua classificação e identificação. Os dermatófitos são examinados ao microscópio com especial atenção às características das suas hifas, conídios (esporos assexuados) e outros componentes reprodutivos(58).

As hifas são hialinas, septadas e frequentemente exibem ramificações em ângulos agudos. Os cónidios podem ser divididos em macro e microcónidios (Figura 9). Os macrocónidios são grandes, multicelulares que podem ser fusiformes, em forma de trevo ou em forma de charuto. Eles contêm vários septos e são frequentemente segmentados. Podem ser lisos ou rugosos, dependendo da espécie e são tipicamente suportados, isoladamente ou em pequenos aglomerados, por hifas especializadas designadas por conidióforos. Os microcónidios são esporos menores e unicelulares que geralmente são redondos, ovais ou piriformes (em forma de pera), muitas vezes são suportados individualmente ao longo das hifas ou em cachos semelhantes a uvas(2,58). No género *Trichophyton* os macrocónidios são raros, em forma de fuso (fusiforme) ou em forma de charuto e de paredes finas e lisas. Os microcónidios são numerosos, variando em formato (redondo, oval ou piriforme) e normalmente encontram-se localizados ao longo das laterais das hifas. O género *Microsporum* apresenta macrocónidios abundantes, fusiformes, de paredes espessas e com cristas superficiais distintas. Quando apresenta microcónidios, são poucos, pequenos e variando de redondos a piriformes. O género *Epidermophyton* apresenta macrocónidios em forma de trevo (clavados), de paredes lisas e frequentemente agrupados, este género não apresenta microcónidios(2,59,60).

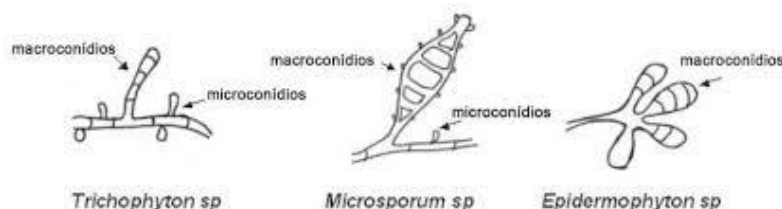


Figura 9 Demonstração de Macrocónidios e Microcónidios dos géneros de dermatófitos(61)

As hifas dos dermatófitos podem-se fragmentar dando origem a artrocónidios. Estes desempenham um importante papel na infeção do cabelo em crescimento ou do estrato córneo. A infeção é seguida pela penetração na haste do cabelo e leva à inflamação e, finalmente, à perda de cabelo. Na fase madura, aglomerados de artrocónidios desenvolvem-se na superfície externa das hastes capilares. Os artroconídios são a principal fonte de recorrência da doença e são altamente resistentes, podendo sobreviver em ambiente seco por mais de 12 meses (54,62)

Durante a interação com o hospedeiro, os dermatófitos também produzem múltiplas enzimas, incluindo poliquetídeos sintetases, peptídeos não ribossómicos sintetases, LysM do inglês *Lysin Motif*, proteases, quinases e pseudoquinases. Estas enzimas aumentam a interação e patogenicidade dos fungos com o hospedeiro. Outros mecanismos patogénicos podem ser

descritos como alteração na resposta imune do hospedeiro, adaptabilidade ao pH cutâneo, adesão fúngica e adaptação à superfície e tecidos do hospedeiro (63).

As principais espécies de dermatófitos de interesse veterinário são: 1) *Microsporum canis*, principal agente causador de dermatofitose em cães e gatos, sendo também transmissível a humanos (zoonose) e produz esporos altamente resistentes às condições ambientais; 2) *Tricophyton mentagrophytes*, que afeta cães, gatos, cavalos, roedores e seres humanos (zoonose); 3) *Nannizzia gypsea*, dermatófito geofílico, encontrado no solo e que pode infectar animais por contato com solo contaminado. Embora menos comum que o *M. canis*, ainda assim causa dermatofitose em cães e gatos, principalmente em áreas com contato direto com a terra; 4) *Tricophyton verrucosum* é um microrganismo presente principalmente nos ruminantes, como bovinos e ovinos, este fungo causa lesões espessas, irregulares e com crostas, muitas vezes em áreas como a cabeça e o pescoço dos animais. Pode ser transmitido a humanos, especialmente aqueles que trabalham com animais na agricultura; 5) *Tricophyton equinum*, afeta a pele, o cabelo e os cascos dos cavalos, mas também é capaz de afetar outros animais, como cães, e humanos que entram em contato próximo com animais infectados, principalmente os cuidadores e os cavaleiros (64,65).

Os animais de estimação como cães e gatos, podem ser afetados por estes agentes, contudo os felinos podem transportar *M. canis* de forma assintomática, e por isso, a sua presença não é indicativa de infecção. A convivência com outros animais, acesso às ruas e fatores socioeconômicos podem favorecer esta condição(66). A transmissão ocorre pelo contato direto do animal suscetível com os esporos, no meio ambiente, com objetos contaminados, em contato direto com outros animais ou com humanos afetados. É de salientar que este agente pode ser transmitido de animais para humanos, o que o torna um problema de saúde pública, especialmente para veterinários, donos de animais e agricultores(67).

Com a falta de diagnóstico adequado, o tratamento da dermatofitose é por vezes difícil. Assim, é fundamental um diagnóstico preciso de forma a identificar o agente e realizar o tratamento adequado. Para este diagnóstico, são enviadas amostras de pelo, por escovação ou raspagem da área afetada para cultura fúngica. Um teste de rastreio que poderá ser realizado é o teste da luz UV, onde se utiliza uma lâmpada portátil que emite radiações ultravioletas através dos filtros constituídos por níquel ou vidro de cobalto. É utilizado para rastrear *M. canis* que, em contato com a pele do animal, emite uma coloração azul. Nas áreas infectadas será observada uma coloração verde-azulada ou amarelada. Como nem todas as espécies de dermatófitos florescem

à luz UV, este método não pode descartar um diagnóstico de dermatofitose. O seu tratamento inclui o uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos, além da descontaminação ambiental, pois os esporos podem sobreviver no ambiente por longos períodos (2,68).

Devido à apresentação variada de sinais clínicos, à natureza infectocontagiosa e potencial zoonótico, as dermatofitoses são infecções relevantes na medicina de pequenos animais. O tratamento é recomendado com o objetivo de reduzir o curso da doença e de forma a prevenir a propagação para outros animais e pessoas. Grupos como crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos são mais vulneráveis a contrair infecções por dermatófitos. Portanto, monitorizar a frequência de dermatófitos em animais de companhia é crucial para proteger a saúde humana, principalmente em ambientes domésticos (57,69,70).

Ao compreender a frequência e a distribuição de dermatófitos em animais de companhia, é possível adotar medidas preventivas eficazes, como o controlo do contato entre animais infetados e humanos, além de também adotar práticas de higiene rigorosas. Em locais como abrigos de animais, clínicas veterinárias e lojas de animais, a identificação precoce e o tratamento de dermatofitose ajudam a prevenir surtos, que podem afetar tanto os animais quanto as pessoas que interagem com eles. Profissionais de saúde animal, como veterinários, técnicos e cuidadores, estão expostos a maior risco de contrair dermatofitoses. O estudo da frequência dos dermatófitos auxilia no desenvolvimento de práticas seguras para minimizar a transmissão de doenças e promover higiene e segurança ocupacional (58,64,67).

1.1. Objetivo

O objetivo deste estudo foram:

- Calcular a frequência de dermatófitos em animais de companhia no período em estudo, avaliando a distribuição destes fungos pelo sexo, idade e espécie de animal;
- Verificar a existência de alguma associação entre os dermatófitos presentes e outras variáveis estudadas, nomeadamente sexo, idade e espécie de animal;
- Determinar a frequência das diferentes espécies de dermatófitos isolados.

1.2. Métodos

Foi realizado um estudo observacional analítico transversal. Para tal recorreu-se ao sistema informático CliniData®, para consulta e recolha dos registos dos resultados das amostras com pedidos de cultura de fungos filamentosos. Foram incluídos neste estudo os

resultados de todas as amostras com este pedido que chegaram ao laboratório entre 01-01-2020 a 31-12-2023.

Dos registos com resultado positivo para pesquisa de dermatófitos foi recolhida a espécie de dermatófito identificada, a espécie do animal de companhia, a sua idade e sexo. Estes dados foram compilados numa base Excel, criada para o efeito. Os resultados da identificação da espécie foram obtidos através dos procedimentos implementados no laboratório INNO e descritos anteriormente no capítulo 1. Sucintamente, as amostras são enviadas para o laboratório de microbiologia onde são semeadas em meio de agar DERM, incubadas até 21 dias a 25°C. Nas placas com crescimento, realiza-se uma lâmina para observação microscópica e a identificação é feita através da observação das características microscópicas presentes.

Relativamente às espécies de dermatófitos, no laboratório encontravam-se registadas com a nomenclatura anterior, pelo que foi necessário converter as anteriores designações nas novas designações das espécies conforme a tabela 6.

Tabela 6 Nomenclatura dos dermatófitos atualizada

Nomenclatura anterior	Nomenclatura atualizada
<i>Microsporum nanum</i>	<i>Nannizzia nana</i>
<i>Microsporum gypseum</i>	<i>Nannizzia gypsea</i>

Posteriormente foi realizada uma análise estatística descritiva dos dados em Excel® e SPSS®. Para facilidade de interpretação, foi criada uma variável para a idade em grupos etários, de acordo com a literatura(71). Assim, foi definido o grupo etário entre os 0 e os 6 meses, denominados de crias, o grupo entre 6 meses e 2 anos, denominados jovens adultos, o grupo entre os 2 e 8 anos, denominados de adultos, e o grupo acima de 8 anos denominados seniores.

De forma a podermos analisar a existência de relação entre os géneros de dermatófitos e as variáveis: sexo, grupos etários e tipo de animal recorreremos ao teste do Qui-Quadrado, ou ao teste Exato de Fisher, quando as frequências esperadas eram menores que 5. Para esta análise foi considerado um $\alpha=0,05$.

1.3. Resultados

No período de janeiro de 2020 a dezembro de 2023 foram rececionadas no laboratório 1957 amostras para cultura de fungos filamentosos. Destas obteve-se 237 (12%) isolamentos de

dermatófitos (Tabela 7). Em 1065 (54%) amostras observou-se contaminação, ou seja, obteve-se crescimento bacteriano e/ou de fungos saprófitas.

Tabela 7 Distribuição dos resultados obtidos a partir das culturas de fungos filamentosos.

	n (%)
Positivos	237 (12%)
Negativos	655 (34%)
Contaminantes	1065 (54%)

Das 237 amostras positivas para dermatófitos 78 (33%) eram amostras caninas, 154 (65%) amostras felinas e 5 (2%) de outros tipos de animais (duas amostras equinas, uma ovina, uma caprina e uma roedora, porquinho-da-índia). Quanto ao sexo, obteve-se 127 (54%) isolamentos em machos e 110 (46%) em fêmeas, como pode ser observado na Tabela 8. Verificava-se um maior número de isolados em felinos (n=154; 65%).

Na tabela 9 encontra-se a distribuição do número de isolamentos por faixa etária, destacando-se com maior número de isolados nas faixas etárias mais baixas: a partir dos 6 meses e até os 2 anos com 59 (25%) isolados e com idades entre o dia de nascimento e 6 meses, com 57(24%) isolados.

Tabela 8 Distribuição dos resultados por espécie e sexo dos animais.

Espécie/Sexo	M n(%)	F n(%)	Total n(%)
Canina	37 (29%)	41 (37%)	78 (33%)
Felina	86 (68%)	68 (62%)	154 (65%)
Outros	4 (3%)	1 (1%)	5 (2%)
Total	127 (54%)	110(46%)	237 (100%)

Tabela 9 Distribuição dos resultados por idade

Idade	n (%)
Crias (0-6M)	57 (24%)
Jovens Adultos (> 6M – 2A)	59 (25%)
Adultos (> 2A – 8A)	55 (23%)
Seniores (> 8A)	32 (14%)
Indeterminado	34 (14%)
Total	237 (100%)

Na tabela 10, podemos observar a frequência dos gêneros dos dermatófitos encontrados neste estudo. Observou-se maior frequência de *Microsporum*, 61% (n=145), seguido do *Tricophyton* com 24% (n=56) e *Nannizzia* com 15% (n=36). Não foram encontrados casos dos restantes gêneros.

Tabela 10 Frequência dos gêneros de dermatófitos presentes nas culturas positivas.

<i>Microsporum</i> n(%)	<i>Tricophyton</i> n(%)	<i>Nannizzia</i> n(%)
145 (61%)	56 (24%)	36 (15%)

De forma a estudar a existência de associação entre os dermatófitos presentes e outras variáveis estudadas, nomeadamente sexo, grupo etário e espécie de animal, foi realizado o teste de qui quadrado. Os resultados encontram-se nas tabelas 11, 12 e 13. Apenas foi confirmada a existência de associação entre o género de dermatófitos e a espécie de animal, onde se verifica uma maior frequência nos gatos, como descrito na tabela 11. Observa-se uma predominância de isolamentos na idade jovem, nomeadamente nas crias (0-6 meses) e nos jovens adultos (6 meses a 2 anos), respetivamente, sendo o menor número de casos nos seniores, contudo não é estatisticamente significativa. É de registar que não houve um número elevado de casos seniores em nenhuma espécie de dermatófito.

Tabela 11 Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e espécie de animal

		Canino	Felino	Total
Género	<i>Tricophyton</i>	29	24	53
	<i>Microsporum</i>	29	115	144
	<i>Nannizzia</i>	20	15	35
Total		78	154	232
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		30,975
		Significância		<0,001
		Assintótica (Bilateral)		

Tabela 12 Teste qui-quadrado entre as variáveis: género de dermatófitos e sexo de animal

		Feminino	Masculino	Total
Género	<i>Tricophyton</i>	29	27	56
	<i>Microsporum</i>	62	82	144
	<i>Nannizzia</i>	19	18	37
Total		110	127	237
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		1,665
		Significância		0,435
		Assintótica (Bilateral)		

Tabela 13 Teste qui-quadrado entre as variáveis: gênero de dermatófitos e idade de animal

		0-6M	6M-2A	2A-8A	>8A	Total
Gênero	<i>Tricophyton</i>	10	17	17	5	49
	<i>Microsporum</i>	43	31	28	20	122
	<i>Nannizzia</i>	5	10	10	7	32
Total		58	58	55	32	203
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		9,844		
		Significância		0,131		
		Assintótica (Bilateral)				

Estudamos ainda a existência destas mesmas associações, mas separando por espécie de animal. Assim, nas tabelas 14 e 15, 16 e 17 encontramos esses resultados, nos quais não foi possível comprovar a existência de uma associação significativa entre os gêneros de dermatófitos e o sexo e os grupos etários nem nos caninos e nem nos felinos. Nos caninos observa-se uma maior frequência de casos positivos nos jovens adultos e adultos. Através da análise dos dados não existe uma distinção muito predominante entre fêmeas e machos.

Tabela 14 Teste qui-quadrado entre as variáveis: gênero de dermatófitos e sexo de caninos

Caninos		Feminino	Masculino	Total
Gênero	<i>Tricophyton</i>	15	14	29
	<i>Microsporum</i>	14	15	29
	<i>Nannizzia</i>	12	8	20
Total		41	37	78
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		0,666
		Significância		0,717
		Assintótica (Bilateral)		

Tabela 15 Teste qui-quadrado entre as variáveis: gênero de dermatófitos e idade de caninos

Caninos		0-6M	6M-2A	2A-8A	>8A	Total
Gênero	<i>Tricophyton</i>	2	11	10	3	26
	<i>Microsporum</i>	6	8	7	6	27
	<i>Nannizzia</i>	3	4	7	6	20
Total		11	23	24	15	73
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		6,294		
		Significância		0,391		
		Assintótica (Bilateral)				

Tabela 16 Teste qui-quadrado entre as variáveis: gênero de dermatófitos e sexo de felinos

Felinos		Feminino	Masculino	Total
Gênero	<i>Tricophyton</i>	14	10	24
	<i>Microsporum</i>	48	67	115
	<i>Nannizzia</i>	6	9	15
Total		68	86	154
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		2,334
		Significância		0,311
		Assintótica (Bilateral)		

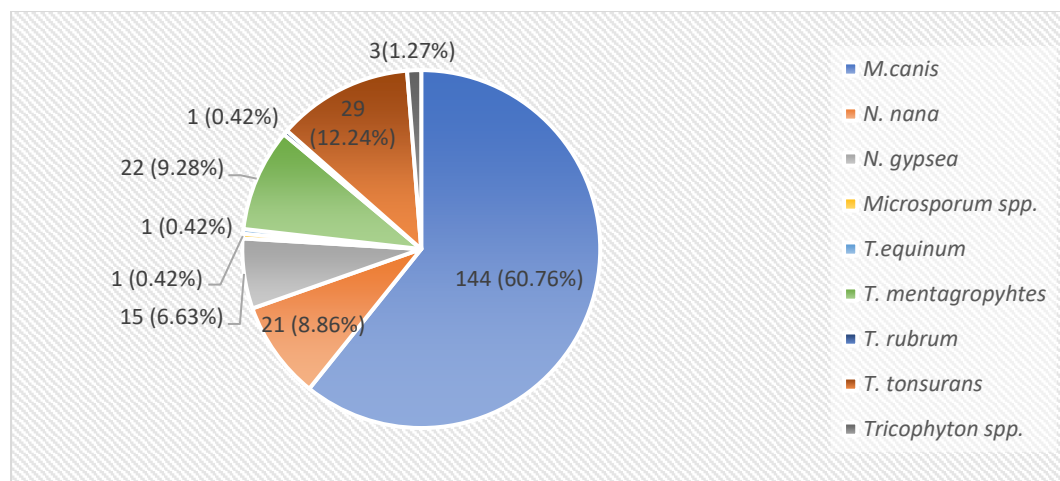
Tabela 17 Teste qui-quadrado entre as variáveis: gênero de dermatófitos e idade de felinos

Felinos		0-6M	6M-2A	2A-8A	>8A	Total
Gênero	<i>Tricophyton</i>	8	5	6	2	21
	<i>Microsporum</i>	37	23	21	14	95
	<i>Nannizzia</i>	2	6	3	1	12
Total		47	34	30	17	128
Qui-quadrado de Pearson		Valor do teste		5,109		
		Significância		0,530		
		Assintótica (Bilateral)				

No gráfico 1 podemos observar a frequência das diferentes espécies de dermatófitos isoladas das 237 amostras positivas. Conforme os dados obtidos podemos afirmar que 60,76% (n=144), ou seja a maioria das amostras correspondem a *Microsporum canis*. A segunda espécie

de dermatófito mais frequente foi *Trichophyton tonsurans* com 12,24% (n=29). Com resultados semelhantes foram isoladas as espécies *Trichophyton mentagrophytes*, 9,28% (n=22), e *Nannizzia nana*, 8,86% (n=21). Foi apenas isolado 1 caso das espécies de dermatófitos: *Trichophyton equinum* e *Trichophyton rubrum*. Houve um total de 4 casos onde não se identificou a espécie, ficando-se apenas pela identificação do género (1 caso de *Microsporium spp.* e os outros 3 de *Trichophyton spp.*).

Gráfico 1 número e percentagem de isolados por género de dermatófito



Na tabela 18, cruzamos a espécie de dermatófito com a espécie do animal de companhia.

Tanto para os caninos como para os felinos, o dermatófito mais frequente foi *M. canis*, com 37% (n=29) e 75% (n=115), respetivamente, seguindo-se *T. tonsurans* com 19% e 8%, respetivamente. O terceiro mais frequente já difere entre as espécies de animais. A terceira espécie mais frequente na espécie canina foi *T. mentagrophytes* (17%), enquanto na espécie felina foi *Nannizzia nana* (6%). Nos caninos, ambas as espécies do género *Nannizzia* obtiveram a mesma frequência, 13% (n=10). Observou-se uma baixa percentagem de casos identificados de *T. equinum* e *T. rubrum* em ambas as espécies. Foram ainda isolados dermatófitos noutros animais: uma amostra de ovelha positiva para *N. nana*, uma amostra de uma cabra na qual foi identificado *T. mentagrophytes*, duas amostras de cavalos nas quais foram isolados *N. gypsea* e *T. tonsurans* e uma amostra de porco da índia onde foi isolado *Trichophyton spp.*

Tabela 18 Número de isolamentos por espécie do dermatófito e espécie do animal

<i>Espécie de dermatófito/Espécie de animal</i>	Canina n, %	Felina n, %	Outros n, %
<i>Microsporum canis</i>	29 (37%)	115 (75%)	0 (0%)
<i>Nannizzia nana</i>	10 (13%)	10 (6%)	1 (20%)
<i>Nannizzia gypsea</i>	10 (13%)	4 (3%)	1 (20%)
<i>Microsporum spp.</i>	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)
<i>Trichophyton equinum</i>	1 (1%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	13 (17%)	8 (5%)	1 (20%)
<i>Trichophyton rubrum</i>	0 (0%)	1 (1%)	0 (0%)
<i>Trichophyton tonsurans</i>	15 (19%)	13 (8%)	1 (20%)
<i>Trichophyton spp</i>	0 (0%)	2 (1%)	1 (20%)

Nas tabelas seguintes, podemos observar a distribuição das espécies de dermatófitos por grupos etários e sexo nos felinos (tabela 19) e nos caninos (tabela 20).

Tabela 19 Distribuição dos casos felinos por idade e microrganismo

Felinos	<i>M. canis</i>		<i>N. nana</i>		<i>N. gypsea</i>		<i>Microsporum SPP</i>		<i>T. equinum</i>		<i>T. ment.</i>		<i>T. rubrum</i>		<i>T. tonsurans</i>		<i>Tricophyton SPP</i>		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
0-6M	18	18	1	0	1	0	0	1	0	0	0	2	0	0	3	2	0	1	47
> 6M - 2ª	16	8	1	3	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	3	1	0	34
> 2ª - 8ª	14	7	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	2	0	0	30
> 8ª	5	9	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	17
ind.	14	6	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	26
Total	67	48	5	5	4	0	0	1	0	0	3	5	1	0	5	8	1	1	154

Tabela 20 Distribuição dos casos caninos por idade e microrganismo

Cães	<i>M. canis</i>		<i>N. nana</i>		<i>N. gypsea</i>		<i>Microsporum SP P</i>		<i>T. equinum</i>		<i>T. ment.</i>		<i>T. rubrum</i>		<i>T. tonsurans</i>		<i>Tricophyton spp</i>		Total
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
0-6M	4	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	10
> 6M - 2ª	4	4	0	1	2	1	0	0	0	0	5	1	0	0	1	5	0	0	24
> 2A - 8ª	4	3	0	3	1	3	0	0	1	0	2	1	0	0	2	4	0	0	24
> 8ª	2	4	3	1	0	2	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	15
ind.	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	5
Total	15	14	4	6	4	6	0	0	1	0	9	4	0	0	4	11	0	0	78

1.4. Discussão

Ao longo da recolha dos dados referente a 3 anos de estudo, 12% (n=237) das amostras com pedido de cultura de fungos filamentosos foram positivas para dermatófitos, enquanto 54% (n=1065) foram contaminantes e 34% (n=655) foram negativos. Este valor de positividade encontra-se de acordo com a literatura do estudo português de 2023, cuja taxa de casos positivos também ronda os 12%. Noutro estudo, realizado no Irão, foram observados 31% de amostras positivas (72). Estes dados indicam a existência de um número elevado de amostras negativas para dermatófitos, no entanto, de acordo com o descrito na literatura era espectável uma frequência mais reduzida de contaminações.

A contaminação pode dever-se a vários fatores, como a colheita e manipulação inadequada da amostra, colheita após início da terapia antifúngica, a concorrência dos fungos contaminantes, a inibição de crescimento de dermatófitos e o tempo de crescimento fúngico(73). A colheita deverá ser realizada, antes do início da terapia específica e nas áreas ativas da lesão, geralmente na periferia, onde os fungos se encontram em maior abundância. No caso de a colheita ter sido realizada num local diferente pode não existir concentração suficiente de dermatófitos para se obter um resultado cultural positivo (73). Durante a colheita e manipulação das amostras estas podem ser contaminadas por fungos presentes no ambiente. Também durante o transporte as amostras poderão ser expostas a diferenças de temperatura, humidade ou contaminação, que pode comprometer a viabilidade dos fungos na amostra. Uma vez que as amostras são contaminadas, especialmente por fungos ambientais, como leveduras ou fungos do solo, que crescem mais rapidamente que os dermatófitos em meios de cultura, eles podem dificultar a identificação e o crescimento dos dermatófitos, competindo pelos nutrientes no meio de cultura e dificultando ou inibindo o crescimento do fungo patogénico. Uma das causas para a percentagem de contaminantes e negativos ser mais elevada que a percentagem de positivos neste estudo, será o tratamento com antifúngico prévio à colheita, que inibe o crescimento do fungo, assim como o uso prévio de desinfetantes ou produtos de higiene que, pode, de forma semelhante, inibir o crescimento dos fungos. O tempo de crescimento dos dermatófitos também é um fator determinante, uma vez que os fungos contaminantes crescem mais rapidamente que os dermatófitos, podem acontecer erros onde o meio de cultura é interrompido pelo crescimento de contaminantes ou descartado prematuramente, perdendo-se assim, a oportunidade de observar o crescimento tardio dos dermatófitos(73,74).

Através da observação dos dados, compreende-se que não há uma diferença considerável entre sexos, nomeadamente masculino e feminino das espécies caninas e felinas apresentando percentagens pouco discrepantes, respetivamente 54% e 46%. O teste do qui-quadrado permitiu também verificar a inexistência de associação de dermatófitos com o sexo. Estes dados vão de encontro ao estudo português de Lopes e colaboradores (75) que obteve resultados idênticos.

Na amostra em estudo existe uma maior percentagem de gatos em comparação com os cães, sendo 65% e 33% respetivamente. Esta discrepância pode ser justificada pelo facto de os gatos serem portadores de dermatófitos, e por serem mais propensos a contrair esporos devido aos seus hábitos de higiene (lamber o pelo) e à proximidade de áreas poluídas, como evidenciado no estudo de Lopes e colaboradores em Portugal(75). Isto é comprovado pelo teste de qui quadrado cuja resultado comprova uma diferença estatisticamente significativa.

Apesar de não existir uma associação estatisticamente significativa no teste do qui quadrado quanto à idade dos animais, observa-se que as crias e os jovens adultos são mais afetados com 24% e 25% respetivamente, diminuindo a percentagem de isolamentos com o aumento da idade. Estes resultados encontram-se de acordo com os resultados obtidos por Lopes e colaboradores, em Portugal. Contudo, num estudo realizado no Irão, nos gatos obteve um número maior de isolamentos positivos em idades inferiores a 1 ano ou entre 1 e 2 anos, mas nos cães observaram mais isolamentos dos 7 aos 8 anos de idade(72,75). De acordo com a literatura, os animais entre os 0 e 24 meses são mais suscetíveis de desenvolver dermatofitoses, devido a vários fatores. Um dos fatores é a imaturidade do seu sistema imunitário, o que os torna mais vulneráveis e menos eficazes no combate a infeções fúngicas(71). Em animais adultos, o sistema imunitário encontra-se completamente desenvolvido e é geralmente capaz de se defender contra agentes patogénicos como fungos. Outro fator baseia-se no subdesenvolvimento da sua pele, uma vez que os animais entre os 0 e 6 meses apresentam pele mais macia, fina e sensível em comparação com animais adultos. A pele atua como uma barreira natural contra fungos e outros agente patogénicos, contudo em animais mais jovens, essa barreira pode não estar totalmente desenvolvida, facilitando a penetração dos fungos e o desenvolvimento de uma infeção. O contacto entre crias numa ninhada, ou então a permanência em ambientes propícios a infeções fúngicas, bem como uma má higiene são também fatores de risco para a contaminação fúngica(73,75,76).

O dermatófito mais frequentemente encontrado na nossa amostra foi *M. canis*, com 61%, especialmente em gatos, tal como no estudo português (63%). No estudo iraniano a percentagem foi mais baixa (38%) devido a outro dermatófito prevalente no país, *Tricophyton verrucosum* (32%)(72,75).

A espécie *M. canis* apresenta uma elevada percentagem de casos devido à sua adaptabilidade a animais de companhia como hospedeiros, à sua estabilidade ambiental, à sua fácil transmissão entre espécies, e nos gatos, conforme referido anteriormente, devido a estes serem portadores assintomáticos deste dermatófito. Nestes casos, a valorização clínica de uma positividade de *M. canis* nos gatos fica ao critério do veterinário, pois a infeção dependerá da história clínica. Este resultado encontra-se de acordo com o descrito na literatura onde nesta espécie é o dermatófito mais comum, especialmente em lares com vários animais de estimação ou em ambientes de alta densidade, como abrigos e gatis. A oportunidade de exposição a *M. canis* é maior em comparação com outros dermatófitos, pois a sua presença em animais assintomáticos e sintomáticos garante que circule amplamente entre as populações de animais de estimação(2,65,75).

O segundo dermatófito com maior número de casos foi *T. tonsurans*, com um total de 29 casos, cujo número de cães e gatos afetados é muito semelhante. Este dermatófito é semelhante a *M. canis*, na medida que os humanos são portadores e transmitem aos animais, e também por persistir no ambiente e ter alta adaptabilidade. Estes aspetos podem justificar o caso positivo num cavalo, que lida com o ambiente e com os cuidadores. A espécie *T. tonsurans* tornou-se mais difundido em certas regiões devido a vários fatores sociais, tais como sobrelotação, saneamento inadequado e aumento da interação homem-animal em certas comunidades, isto contribuiu para a sua ascensão como um dos dermatófitos mais comuns(60,77). De seguida temos *T. mentagrophytes* com 22 casos, com uma maior frequência canina, o que contraria o descrito na literatura, uma vez que este dermatófito é normalmente mais identificado em gatos devido a estes caçarem os roedores afetados, que são a fonte original deste dermatófito. Outra fonte é o solo, o que poderá eventualmente ser o caso destes cães, uma vez que é hábito do cão se esfregar, correr e lambe o solo. Outra justificação será, como indicado num estudo suíço(78), o dermatófito ser encontrado em mais gatos vadios que em gatos domésticos, e a amostragem do nosso estudo ser em animais domésticos. A combinação da sua natureza zoofílica, ampla gama de hospedeiros, persistência ambiental e facilidade de transmissão entre espécies faz de *T. mentagrophytes* um agente patogénico significativo na dermatologia veterinária e

humana(63,67). No estudo português apenas reportam os resultados do género *Tricophyton spp*, que também foi o segundo mais predominante com 20%(75).

Com 21 casos temos *N. nana*, cuja dispersão foi exatamente a mesma para caninos e felinos (10 isolados cada), e 1 caso de uma ovelha. Este dermatófito é geofílico, logo é proveniente do solo e é encontrado habitualmente em porcos. Pode infetar outros animais e o Homem, especialmente agricultores ou trabalhadores que tenham contato próximo com animais infetados ou solo contaminado(29,55,67). Para *N. gypsea*, foram identificados 15 casos, onde existe uma maior frequência canina do que felina, e existe um caso de um cavalo. *N. gypsea* é um fungo geofílico com distribuição mundial que pode causar infeções em animais e humanos, em zonas rurais durante climas quentes e húmidos, razão pela qual as atividades e comportamentos ao ar livre dos cães oferecerem mais oportunidades de contato com solo contaminado (29,55,67). De salientar que foi encontrado apenas um caso positivo de *T. equinum* num cão, o que é raro, uma vez que é um dermatófito muito comum em cavalos, mas não em cães. Este caso positivo, muito provavelmente, vive em proximidade com a espécie equina. Também foi registado apenas um caso de *T. rubrum* num gato. Este dermatófito é antropofílico, o que significa que é comum em humanos, mas não em animais. Felinos imunossuprimidos podem ser infetados por dermatófitos que normalmente não são encontrados na sua espécie(55,64,67). Foram analisados um total de 4 casos que apenas foi possível identificar o género, sendo 1 caso apenas identificado por *Microsporum spp* e 3 como *Tricophyton spp*. Estas identificações não completas, podem surgir por vários motivos como, as semelhanças morfológicas entre dermatófitos, as limitações do diagnóstico laboratorial, avaliando apenas características macro e microscópicas, erros humanos no diagnóstico, apresentações atípicas dos fungos e infeções mistas. Em muitos casos, a identificação do fungo ao nível do género (*Microsporum spp*. ou *Trichophyton spp*.) é suficiente para diagnóstico e tratamento. A identificação ao nível da espécie pode exigir técnicas mais avançadas e especializadas que nem sempre estão disponíveis em todos os laboratórios, como é o caso do diagnóstico molecular (2,67).

As infeções por dermatófitos em animais de estimação, embora geralmente tratáveis, podem causar desconforto significativo, danos na pele e risco de infeções secundárias. Estas infeções são altamente contagiosas, com potencial para se transmitirem para outros animais e seres humanos, exigindo uma gestão cuidadosa e tratamento muitas vezes prolongado para garantir a recuperação total. Em alguns casos, os efeitos na saúde geral e na qualidade de vida do animal de companhia podem ser substanciais, especialmente se a infeção se tornar crónica ou

afetar animais vulneráveis, de modo que afetam e alteram o seu comportamento. Os animais ficam mais irritados, ansiosos e com pouca atividade física. Para além destes aspetos, existe também o fator estético do animal, que é muito importante para os criadores e que podem ficar cronicamente alterados. Também o fator de isolamento, que existe quando o tratamento é mais prolongado, induz mais stress no animal(67,73).

A educação dos tutores de animais de companhia é essencial para prevenir, diagnosticar e controlar infeções por dermatófitos, tanto nos seus animais quanto em si mesmos, devido ao potencial zoonótico dessas infeções. Cuidados adequados são essenciais para reduzir a transmissão e recorrência de infeções fúngicas, melhorando o bem-estar animal e protegendo a saúde humana. É importante informar os donos e cuidadores sobre os sinais clínicos nos animais, a transmissão entre humanos e outros animais, e métodos de prevenção, como boa higiene, limitar o contato entre animais infetados e garantir ambientes limpos e secos. Animais infetados devem ser isolados, e o ambiente limpo e desinfetado. Grupos de risco devem ser educados sobre a prevenção e tratamento com antifúngicos tópicos ou sistémicos, seguindo as orientações veterinárias e monitorando o animal durante e após o tratamento. Se houver múltiplos animais, todos devem ser avaliados e tratados(73,79).

Esta educação dos tutores é assim indispensável para prevenir a disseminação de dermatófitos nos animais e em humanos. O isolamento adequado, a higiene rigorosa e o tratamento apropriado são fundamentais para proteger a saúde pública e garantir o bem-estar animal. Além disso, os cuidados com a limpeza do ambiente e a higiene pessoal são medidas indispensáveis para interromper o ciclo de transmissão(67,73).

O tratamento mais comumente recomendado por veterinários, é uma terapia tópica, de aplicações de corpo inteiro duas vezes por semana de miconazol, clotrimazol ou terbinafina em cremes ou shampoos. A terapia tópica pode ser usada em conjunto com a terapia sistémica, e esta última consiste em usar fluconazol, griseofulvina, itraconazol ou terbinafina (oral). Sendo que o clotrimazol é descrito como o agente antifúngico mais eficaz e o fluconazol o menos eficaz (73,79).

1.5. Conclusão

Este estudo demonstra que a espécie *Microsporium canis* é o dermatófito mais predominante, com maior frequência em crias, indicando que possivelmente animais jovens são mais suscetíveis à infecção em comparação com adultos, o que se encontra de acordo com o descrito na literatura existente. Esta enfatiza a relação entre dermatófitos, especialmente o *Microsporium canis*, e seu impacto nos animais. A consciencialização dos donos ou cuidadores dos animais para este tipo de infecções é fundamental de forma que procurem os serviços veterinários aos primeiros sinais de infecção, realizem uma higiene adequada e regularizada levando em atenção a limpeza dos utensílios e locais contaminados e o isolamento do animal infetado para este não se tornar um meio de propagação.

Através destas medidas proativas poderá haver uma melhoria na frequência destas infecções, sobretudo em locais como canis ou moradias com vários animais de estimação, diminuindo as possibilidades de contágio, protegendo tanto o bem-estar do animal como o do seu cuidador.

Seria benéfico a realização de mais estudos na área da micologia veterinária de modo a abordar lacunas na compreensão das infecções por dermatófitos, estudar a sua frequência e melhorar a prevenção, diagnóstico e tratamento destas infecções. Com especial destaque deveria ser prestada mais atenção nas áreas do diagnóstico molecular, da resistência antifúngica, da resposta imunitária do hospedeiro e no controlo ambiental. Deste modo a micologia veterinária pode avançar no fornecimento de ferramentas de diagnóstico, protocolos de tratamento e estratégias preventivas mais eficientes, alcançando assim melhores resultados para a ciência e para a saúde geral, quer seja animal ou humana.

Referências Bibliográficas

1. INNO. INNO – Making the difference in animal care [Internet]. 2024. Available from: <https://www.inno.pt/>
2. Kumar Gupta V, Tuohy MG. Fungal Diseases in Animals From Infections to Prevention [Internet]. 2021. Available from: <http://www.springer.com/series/11224>
3. Sperandio Porto A, Amaral De Souza EB, Sperandio Porto A, De Freitas M, Majadas F, Porto AS. Estudo clínico e terapêutico das dermatofitoses: Revisão de literatura. 2021; Available from: <https://doi.org/10.51161/rem/1146>
4. Bowen, Sattayapiwat A, Gounden V, Remaley AT. Blood collection tube-related alterations in analyte concentrations in quality control material and serum specimens. *Clin Biochem*. 2014 Feb;47(3):150–7.
5. Cornes M, Van Dongen-Lases E, Grankvist K, Ibarz M, Kristensen G, Lippi G, et al. Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). Vol. 55, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. Walter de Gruyter GmbH; 2017. p. 27–31.
6. Giavarina D, Lippi G. Blood venous sample collection: Recommendations overview and a checklist to improve quality. *Clin Biochem* [Internet]. 2017;50(10):568–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009912017300905>
7. Thrall MA. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. Editora Roca; 2007.
8. McDonald LE. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 1969;
9. Siemens Healthineers. IMMULITE 2000 XPi Immunoassay System. 2022.
10. Helio PSP, Helio ERP. Programa teórico da disciplina de imunologia verterinária. *Genetica*. 2019;2:26.
11. Wiederschain GY. *The ELISA guidebook*. Springer Nature BV; 2009.
12. Odell ID, Cook D. Immunofluorescence techniques. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013 Jan;133(1).
13. Hematology Analyzers M. XN-V SERIES™ Accelerate your Multispecies Research Laboratory [Internet]. 2019. Available from: www.sysmex.com/us
14. Bristol University. Blood Smear. 2017.
15. KASVI. Hematologia: Como é realizada a técnica de esfregaço de sangue? [Internet]. 2016. Available from: <https://kasvi.com.br/esfregaco-de-sangue-hematologia/>
16. Jörundsson E, Lumsden JH, Jacobs RM. Rapid Staining Techniques in Cytopathology: A Review and Comparison of Modified Protocols for Hematoxylin and Eosin, Papanicolaou and Romanowsky Stains. *Vet Clin Pathol*. 1999;28(3):100–8.
17. De Utilização M, Stainer R. Aparelho de coloração da RAL [Internet]. 2013. Available from: www.ral-diagnostics.fr
18. Goldenfarb PB, Bowyer FP, Hall E, Brosious E. Reproducibility in the Hematology Laboratory: The Microhematocrit Determination. *Am J Clin Pathol* [Internet]. 1971 Jul 1;56(1):35–9. Available from: <https://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
19. da Silva PH, Alves HB, Comar SR, Henneberg R, Merlin JC, Stinghen ST. *Hematologia laboratorial: teoria e procedimentos*. Artmed Editora; 2015.

20. Silva SA, Lima KR de, Martins DS, Silva LF da, Bezerril JE. Exame citopatológico na medicina veterinária. *Brazilian Journal of Development*. 2020;6(6):39519–23.
21. Barker E, Tasker S. Update on feline infectious peritonitis. *In Pract*. 2020 Sep 1;42(7):372–83.
22. Koh CM. Chapter Sixteen – Preparation of Cells for Microscopy using Cytospin. In: Lorsch J, editor. *Methods in Enzymology* [Internet]. Academic Press; 2013. p. 235–40. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124200678000167>
23. Gentry PA. Comparative aspects of blood coagulation. *The Veterinary Journal* [Internet]. 2004;168(3):238–51. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023303001771>
24. Sysmex. Sysmex CA540 Coagulation Analyzer [Internet]. 2022. Available from: <https://www.diamonddiagnostics.com/products/Sysmex-CA540-Coagulation-Analyzer>
25. Siemens. CLINITEK Status®+ Analyzer [Internet]. 2010. Available from: https://marketing.webassets.siemens-healthineers.com/1800000000005834/b090d8645486/Clinitek-Status-Rev02_1800000000005834.pdf
26. Mattos De Souza-Dantas L, Pereira O, Bastos M, Brener B, Márcia II, Ili S, et al. Zinc sulfate centrifugal flotation technique on the diagnosis of gastrointestinal helminthes of domestic cats. 2007;(3):904–6. Available from: www.cfmv.org.br
27. Ballweber LR, Beugnet F, Marchiondo AA, Payne PA. American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use—Is there really one best technique? *Vet Parasitol* [Internet]. 2014;204(1):73–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171400288X>
28. Kassa D, Mengestie A, Ayalew N, Belaynew A, Mebrie Z, Metadel T. A Review on Diagnostic Techniques in Veterinary Helminthology. *Nat Sci (East Lansing)* [Internet]. 2016;14(7):109–18. Available from: <http://www.sciencepub.net/natureonline>
29. Romário J, Carvalho DE, Barbosa JM. Tópicos especiais em ciência animal V [Internet]. 2016. Available from: www.alegre.ufes.br/ccae
30. Vadlejch J, Petrtyl M, Zaichenko I, Čadková Z, Jankovská I, Langrová I, et al. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol Res* [Internet]. 2011;109(5):1387–94. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2385-5>
31. Cenogenics Corporation. Stool Blood Test Kits [Internet]. 2020. Available from: <http://www.cenogenics.net/stool-occult-blood.html>
32. University of Pittsburgh. Microbiology: Department of Biological Sciences [Internet]. 2024. Available from: <https://www.biology.pitt.edu/undergraduate/academic-programs/microbiology>
33. Cutting KF. Wound exudate: composition and functions. *Br J Community Nurs*. 2003;8(Sup3):S4–9.
34. Hall GS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 13th Edn. *Lab Med* [Internet]. 2013 Nov 1;44(4):e138–9. Available from: <https://doi.org/10.1309/LM5JCOPHOOGGBSZZ>

35. bioMérieux SA. Chocolate agar PolyViteX [Internet]. 2023. Available from: <http://www.biomerieux-culturemedia.com/product/27-chocolate-agar-polyvitex>
36. Agar BDSG. BD™ Sabouraud Glucose Agar· BD Sabouraud Agar with Chloramphenicol· BD Sabouraud Agar with Gentamicin and Chloramphenicol· BD Sabouraud Agar with Penicillin and Streptomycin·. 2020;
37. LIOFILCHEM® S.r.l. Schaedler CNA Agar (Sheep Blood 5%). Technical Sheet. 2016;
38. Ford RB, Mazzaferro EM. Laboratory Diagnosis and Test Protocols. 2012.
39. Greiner Bio-One. Urine CCM tubes [Internet]. 2015. Available from: <https://shop.gbo.com/en/row/products/preanalytics/urine-collection/vacurette-urine-tubes/urine-ccm-tubes/>
40. Biomérieux. CHROMID® CPS® ELITE [Internet]. 2018. Available from: www.biomerieuxDIRECT.com
41. Rodríguez-Hernández P, Cardador MJ, Arce L, Rodríguez-Estévez V. Analytical Tools for Disease Diagnosis in Animals via Fecal Volatilome. *Crit Rev Anal Chem* [Internet]. 2022 Jul 4;52(5):917–32. Available from: <https://doi.org/10.1080/10408347.2020.1843130>
42. Becton Dickinson. BD Dermatophyte Agar. 2012.
43. Thermo Scientific™. Signal™ Blood Culture System [Internet]. 2024. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/BC0100M>
44. Matheson M. Gram stain. Vol. 12, *Journal of Community Eye Health*. 1999. p. 24.
45. bioMérieux S.A. Previ Color Gram [Internet]. 2009. Available from: <http://www.biomerieux.com>
46. Sieuwerts S, De Bok FAM, Mols E, De Vos WM, Van Hylckama Vlieg JET. A simple and fast method for determining colony forming units. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2008 Oct 1;47(4):275–8. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
47. McDonnell G, Baseman H, Cordie-Bancroft L. Words matter: a commentary and glossary of definitions for microbiological quality. *Biomed Instrum Technol*. 2021;55(4):143–64.
48. Biomerieux. VITEK® MS PRIME [Internet]. 2021. Available from: www.biomerieux.com
49. Grohs P, Remaud E, Lath C, Vuong K, Parolini ML, Dannaoui E, et al. Comparison of the New VITEK MS PRIME System with the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Biotyper Microflex LT for the Identification of Microorganisms. *Ann Lab Med*. 2023 Nov 1;43(6):574–84.
50. Lay Jr JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev*. 2001;20(4):172–94.
51. bioMérieux. VITEK® 2 Compact [Internet]. 2022. Available from: <http://www.biomerieux.com>
52. Manual U. VITEK® DensiCHEK. 2018.
53. Carter GR. *Essentials of veterinary bacteriology and mycology*. Lea & Febiger; 1986.
54. Gupta A, Singh NP. *Fungal Diseases in Animals: From Infections to Prevention*. Springer Nature; 2021.
55. The University of Adelaide. *Dermatophytes: A recent multilocus phylogenetic study the has reviewed the taxonomy of the dermatophytes*. 2024.

56. Sperandio Porto A, Amaral De Souza EB, Sperandio Porto A, De Freitas M, Majadas F, Porto AS. Estudo clínico e terapêutico das dermatofitoses: revisão de literatura. 2021; Available from: <https://doi.org/10.51161/remis/1146>
57. Moriello KA, Coyner K, Paterson S, Mignon B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats. *Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology*. *Vet Dermatol*. 2017;28(3):266–e68.
58. Refai M, Abo El-Yazid H, El-Hariri M. Monograph On Dermatophytes A guide for isolation and identification of dermatophytes, diseases and treatment. 2013.
59. Weitzman I, Padhye AA. Dermatophytes: Gross and Microscopic. *Dermatol Clin* [Internet]. 1996;14(1):9–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073386350570320X>
60. Dos Santos JI, Coelho MPP, Nappi BP. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses Dermatophytosis' laboratorial diagnosis. Vol. 34, 3 RBAC. 2002.
61. CIBELE FLORIANO FRAGA. Dermatofitos em gatos sem dermatopatias na região metropolitana de Florianópolis. 2017.
62. Moskaluk AE, VandeWoude S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. Vol. 11, Pathogens. MDPI; 2022.
63. White TC, Findley K, Dawson TL, Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, et al. Fungi on the Skin: Dermatophytes and Malassezia [Internet]. 2024. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/>
64. Seyedmousavi S, Bosco S, De Hoog S, Ebel F, Elad D, Gomes RR, et al. Fungal infections in animals: A patchwork of different situations. Vol. 56, Medical Mycology. Oxford University Press; 2018. p. S165–87.
65. García M, Blanco J. Mycoses in domestic animals. *Rev Iberoam Micol*. 2000 Apr 1;17:S2–7.
66. Chanyachailert P, Leeyaphan C, Bunyaratavej S. Cutaneous Fungal Infections Caused by Dermatophytes and Non-Dermatophytes: An Updated Comprehensive Review of Epidemiology, Clinical Presentations, and Diagnostic Testing. Vol. 9, Journal of Fungi. MDPI; 2023.
67. Seyedmousavi S, de Hoog SGS, Guillot J, Verweij PE. Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals. *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals*. Springer International Publishing; 2018. 1–406 p.
68. Moriello KA, Coyner K, Paterson S, Mignon B. Diagnosis and treatment of dermatophytosis in dogs and cats.: *Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology*. Vol. 28, *Veterinary Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 266–8.
69. Soares S de OC, Sérvio da S. Dermatofitose em cães e gatos e sua importância na saúde pública. *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*. 2022 Nov 19;8(10):4431–51.
70. Araújo G dos S, Fonseca. Atualidades em micologia médica. *Atualidades em micologia médica*. Editora In Vivo; 2022.
71. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Kobayashi S, Yamazaki K, et al. Cat and dog ownership in early life and infant development: A prospective birth cohort study of Japan environment and children's study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Jan 1;17(1).
72. Khosravi AR, Mahmoudi M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran.

73. Durdu M, Ilkit M. Strategies to improve the diagnosis and clinical treatment of dermatophyte infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* [Internet]. 2023 Jan 2;21(1):29–40. Available from: <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2144232>
74. Dubljanin E, Zunic J, Vujcic I, Colovic Calovski I, Sipetic Grujicic S, Mijatovic S, et al. Host–Pathogen Interaction and Resistance Mechanisms in Dermatophytes. Vol. 13, *Pathogens*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
75. Lopes R, Garcês A, Silva A, Brilhante–Simões P, Martins Â, Cardoso L, et al. Dermatophytosis in Companion Animals in Portugal: A Comprehensive Epidemiological Retrospective Study of 12 Years (2012–2023). *Microorganisms*. 2024 Aug 1;12(8).
76. Bernardo FMA, Lança A, Guerra MMM, Martins HML. Dermatophytes isolated from pet , dogs and cats , in Lisbon , Portugal (2000–2004). In. Available from: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:27949500>
77. Moskaluk AE, VandeWoude S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. Vol. 11, *Pathogens*. MDPI; 2022.
78. Fratti M, Bontems O, Salamin K, Guenova E, Monod M. Survey on Dermatophytes Isolated from Animals in Switzerland in the Context of the Prevention of Zoonotic Dermatophytosis. *Journal of Fungi*. 2023 Feb 1;9(2).
79. Moriello KA. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. Vol. 15, *Veterinary Dermatology*. 2004.