

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**Avaliação da integridade de ácaros de *Demodex* spp. coletados por impressão por
fita adesiva**

Márcia Düster Corrêa

PORTO ALEGRE

2015/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

Avaliação da integridade de ácaros de *Demodex* spp. coletados por impressão por fita adesiva

Autor: Márcia Düster Corrêa

**Trabalho apresentado como requisito parcial
para graduação em Medicina Veterinária**

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães Gerardi

Coorientadora: M. V. Daniela Flores Fernandes

PORTO ALEGRE

2015/2

RESUMO

A demodicidose é uma das doenças mais frequentemente diagnosticadas na clínica de pequenos animais. Ela ocorre quando a população de ácaros residentes nos folículos pilosos e glândulas sebáceas aumenta de forma exacerbada. Possui duas formas de apresentação clínica: localizada e generalizada. A primeira é mais frequente em animais entre três e seis meses de idade, e na maioria dos casos a remissão é espontânea. A segunda acomete principalmente animais entre três e 18 meses de idade, e requer tratamento. O diagnóstico é feito por meio de exame parasitológico de pele no qual observam-se grande número de ácaros adultos ou uma maior proporção de formas imaturas. Dentre as possíveis formas de realização deste exame, a fita adesiva destaca-se pela facilidade na execução, ser atraumática, e poder ser realizada em locais mais delicados. Muitas vezes a rotina clínica não permite que as amostras sejam analisadas imediatamente após colheita, por isso o presente estudo teve como objetivo avaliar a integridade de ácaros de *Demodex* spp., coletados por meio de impressão por fita adesiva, em intervalos de 24 horas pós-colheita por cinco dias. Foram analisadas 25 amostras positivas provenientes da rotina de atendimento do DERMATOVET/ HCV-UFRGS, sendo que 15 (n=60%) eram de animais que estavam em tratamento, e 10 (n=40%) de animais que foram diagnosticados no momento da consulta. Quando considerada como positiva a amostra com no mínimo um ácaro classificado como “íntegro”, a durabilidade média das amostras foi de 0,96 dias. Já quando considerado como positiva a presença de no mínimo um ácaro classificado como “degradado”, a durabilidade média das amostras foi de 2,6 dias. As amostras positivas de ácaros “íntegros” do grupo que não estava em tratamento tiveram durabilidade média de dois dias, enquanto nas amostras positivas de ácaros “degradados” do mesmo grupo foi de 3,9 dias. No grupo que estava em tratamento, a durabilidade média dos ácaros “íntegros” foi de 0,26 dias, enquanto a dos ácaros “degradados” foi de 1,73 dias. Portanto, os ácaros classificados como “íntegros” tem uma maior (e mais rápida) degradação do que aqueles classificados como “degradados”, especialmente se a amostra for oriunda de um cão em tratamento. Por fim, pode-se concluir que é possível haver um prazo na avaliação das amostras após a colheita, desde que esse tempo não seja superior a 48 horas para amostras oriundas de animais sem tratamento acaricida e 24 horas para amostras provenientes de animais sob terapia acaricida. Após estes

períodos, os ácaros já não estão mais em condições íntegras, levando a uma dificuldade de visualização do parasito, e maior chance de resultados falso-negativos.

Palavras-chave: demodicidose, exame parasitológico, dermatite parasitária

ABSTRACT

*Demodicosis is one of the most frequently diagnosed disease in the small animal clinic. It occurs when the population of mites living in hair follicles and sebaceous glands increases in an exacerbated form. It has two clinical forms: localized and generalized. The first one is most common in animals between three and six months old, and in most cases has spontaneous remission. The second one affects mainly animals between three and 18 months of age, and requires treatment. The diagnosis is made either by demonstrating large numbers of adult mites or by finding an increased ratio of immature forms. Among the different ways to perform the diagnosis, the acetate tape impression is distinguished by being easy to perform, atraumatic, and possible to be performed in most delicate places. Many times in the clinical routine is not possible to analyze the samples right away, so this paper aimed to evaluate the integrity of *Demodex* spp. mites, collected through acetate tape impression at intervals of 24 hours post collection for five days. Twenty five positive samples from routine care of DERMATOVET / HCV-UFRGS were analyzed, 15 (n = 60%) were from animals that were treated, and 10 (n = 40%) from animals that have been diagnosed at the time of the appointment. During the five days, the mites were classified as "integrate" and "degraded," and the average durability of the first positive samples was 0.96 days, and the second was 2.6 days. By affecting different forms cell membranes, causing increased fragility in the parasite samples from animals that were not in treatment were compared with those from animals that were in treatment. Positive samples of mites "integrate" from the group that was not treated had an average durability of two days, while positive samples of mites "degraded" from the same group had an average durability of 3.9 days. In the group that was treated, the average durability of the "integrate" mites was 0.26 days, while that of "degraded" mites was 1.73 days. Therefore, mites classified as "integrate" has greater (and more rapid) degradation than those classified as "degraded", especially if the sample is derived from a dog being treated. Finally, we can conclude that it is possible to be a "delay" in the evaluation of samples after collection, if this time do not exceed more than 48 hours for samples from animals without acaricide treatment, and 24 hours for samples from animals under acaricide therapy. After these periods, the mites are no longer in intact conditions, making difficult the parasite observation, and a higher chance of false-negative results.*

Key-words: demodicosis, parasitological examination, parasitic dermatitis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração dos quatro estágios evolutivos de <i>Demodex</i> spp. que podem ser visualizados nos exames parasitológicos de pele	10
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro”.....	16
Tabela 2: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”.....	17
Tabela 3: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro”, oriundas de animais que não estavam em tratamento.....	18
Tabela 4: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”, oriundas de animais que não estavam em tratamento.....	18
Tabela 5: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro”, oriundas de animais que estavam em tratamento.....	19
Tabela 6: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”, oriundas de animais que estavam em tratamento.....	19
Tabela 7: análise quantitativa das amostras positivas provenientes de animais que não estavam em tratamento.....	20
Tabela 8: análise quantitativa das amostras positivas provenientes de animais que estavam em tratamento.....	20

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4 CONCLUSÃO.....	22
REFERÊNCIAS.....	23

1 INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, há pouca informação sobre a prevalência de distúrbios cutâneos em cães e gatos. Estima-se que entre 20 a 75% de todos os animais examinados na prática clínica apresentam problemas de pele como queixa principal ou concomitante. Dentre as afecções cutâneas frequentemente diagnosticadas em cães, a demodicidose encontra-se entre as dez principais (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). No Setor de Dermatologia do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (DERMATOVET/ HCV-UFRGS), esta enfermidade representou cerca de 10% da casuística, segundo dados de um levantamento interno realizado em 2014.

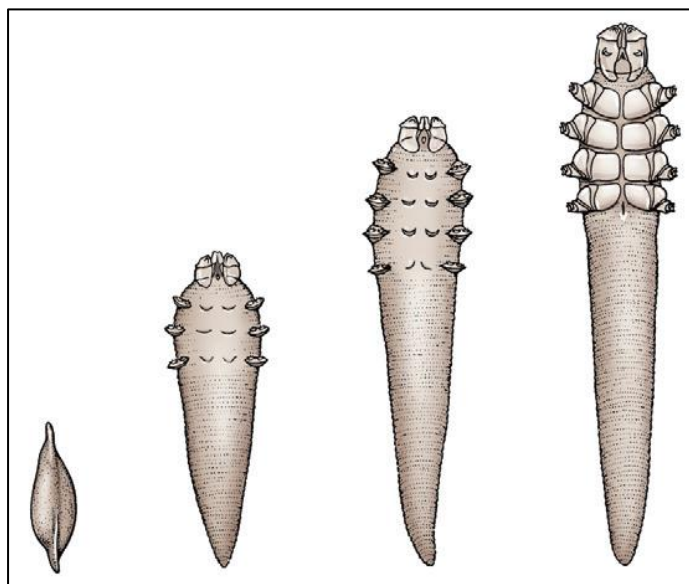
A demodicidose é uma doença inflamatória parasitária de cães caracterizada pela presença de um número maior de ácaros de *Demodex* spp. que o normal (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). A doença ocorre quando a população de ácaros residentes nos folículos pilosos e glândulas sebáceas aumenta de forma exacerbada, superando a tolerância do sistema imune do hospedeiro e levando à foliculite, furunculose e piodermite profunda (RHODES, 2004; PATEL & FORSYTHE, 2010).

Animais jovens são seguidamente acometidos por afecções que causam imunocomprometimento, tais como endoparasitismo e desnutrição. Essa debilidade favorece a proliferação de ácaros de *Demodex* spp. e, por consequência, pode funcionar como um gatilho para desenvolvimento da doença clínica. Em animais adultos, também há supressão do sistema imune, como em animais que são submetidos à quimioterapia, ou possuem desordens metabólicas como hipotireoidismo ou hiperadrenocorticismo. No entanto, esta relação de causa-efeito ainda não está completamente elucidada, visto que há cães imunossuprimidos que nunca desenvolvem a doença e outros com quadro clínico em que nenhuma causa de base é identificada (MUELLER *et al.*, 2011).

Duas espécies de *Demodex* spp. podem ser encontradas nos cães: *Demodex injai* e *Demodex canis*. Sastre *et al.* (2012) demonstraram, por meio de técnicas moleculares, que o ácaro de corpo curto extraoficialmente denominado *Demodex cornei* parece ser, em realidade, uma variante morfológica do ácaro *D. canis*.

D. canis é considerado residente normal da microbiota da pele e do conduto auditivo do cão, tipicamente presente em pequeno número nos folículos pilosos e glândulas sebáceas. A transmissão ocorre a partir do contato direto da fêmea com os filhotes durante os primeiros dois ou três dias de vida neonatal. Todo o ciclo de vida do ácaro ocorre na pele do hospedeiro e se caracteriza por quatro estágios: ovos fusiformes, que eclodem em pequenas larvas hexápodes, que mudam para ninfas de oito pernas e então para adultos também octópodes (**Figura 1**) (SCOTT; MILLER; GRIFFIN,2001; RHODES, 2004; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Figura 1 – Ilustração dos quatro estágios evolutivos de *Demodex* spp. que podem ser visualizados nos exames parasitológicos de pele.



Fonte: MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013.

O *Demodex canis* é um artrópode aracnídeo da Família *Demodicidae* e, embora seja um ácaro escavador, difere em forma e comportamento dos sarcoptídeos. Seu corpo é vermiforme, e dividido em três regiões, como nos insetos: cabeça, tórax e abdome. A região anterior denominada gnatossoma, é onde está localizada a peça bucal formada por quelíceras em estilete, acopladas a palpos triarticulados; uma região intermediária, denominada podossomo, onde estão os quatro pares de pernas curtas e grossas triarticuladas; por fim o opistosoma, parte caudal alongada, com estriações transversais (URQUHART *et al.*, 1998; FORTES, E., 2004)

Duas apresentações clínicas de demodicidose são geralmente reconhecidas: localizada (DL) e generalizada (DG). O curso e o prognóstico das duas formas são muito diferentes.

A DL é mais comum em cães jovens, entre três a seis meses de idade. As lesões consistem em até cinco áreas multifocais, assimétricas, de descamação circunscrita, rarefação pilosa ou alopecia, e eritema. A pele pode ter uma cor acinzentada, comedões e foliculite. Prurido não é comum a menos que haja infecção secundária. As áreas comumente afetadas são a face, cabeça, pescoço, membros torácicos e tronco. Em um pequeno número de casos, a proliferação localizada de ácaros ocorre apenas no conduto auditivo. Estes cães tem uma otite externa ceruminosa, que pode ser pruriginosa, e o tratamento geralmente é necessário (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Infecção bacteriana secundária ou por *Malassezia* spp. não é comum, mas pode causar pápulas, pústulas, crostas, seborreia, prurido e dor (NUTTAL; HARVEY; McKEEVER, 2009).

O prognóstico da DL é bom, com a maioria dos casos resolvendo espontaneamente sem tratamento acaricida. Terapia antisséptica tópica pode ser recomendada para prevenir ou tratar uma infecção bacteriana secundária na pele (MEDLEAU & HNILICA, 2007; NUTTAL; HARVEY; McKEEVER, 2009; MUELLER *et al.*, 2011;).

A forma generalizada da doença é mais frequente em animais de três a 18 meses de idade, e está associada a mais de 12 lesões, uma região do corpo inteiro ou uma a mais extremidades de membros afetadas (pododemodicidose). Os sinais clínicos incluem alopecia multifocal à generalizada com descamação, hiperpigmentação, comedões e foliculite. Infecções secundárias bacterianas, com pápulas, pústulas, furunculose, fístulas, crostas, prurido e dor são comuns. Quadros graves podem estar associados à linfadenomegalia, pirexia, depressão, septicemia e morte (MEDLEAU & HNILICA, 2007; NUTTAL; HARVEY; McKEEVER, 2009).

O tratamento da DG geralmente é necessário e deve ser multifatorial. As doenças de base e fatores imunossupressivos, bem como infecções bacterianas secundárias, devem ser controlados para garantir o sucesso da terapia. O prognóstico

nesta forma é reservado a grave, pois em alguns casos o tratamento pode ser refratário, especialmente quando a causa de base não puder ser identificada e controlada (MUELLER *et al.*, 2011)

O diagnóstico é feito por meio de exame parasitológico de pele (EPP), no qual observam-se grande número de ácaros adultos ou uma maior proporção de formas imaturas em relação a adultas (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

O raspado cutâneo profundo é considerado a técnica padrão ouro para o diagnóstico de demodicidose, no entanto, outras técnicas também podem ser utilizadas na rotina clínica, como o tricograma, a avaliação de exsudato de lesões e a impressão por fita adesiva (SARIDOMICHELAKIS *et al.*, 2007). Esta possui sensibilidade e especificidade equivalentes ao raspado, com as vantagens de ser facilmente executável e atraumática, tornando-se interessante para pacientes agitados, e/ou áreas de difícil execução do raspado, tais como periocular ou perilabial. O exame é realizado por meio do posicionamento de um pedaço de fita adesiva de acetato sobre a área a ser coletada, seguido de realização de pressão entre os dedos polegar e indicador do examinador (“espremer”) para que ocorra a expulsão dos parasitas do folículo. A fita é então fixada em lâmina de vidro e avaliada no microscópio sob magnificação de 10 vezes (PEREIRA *et al.*, 2012). O ato de apertar a pele faz com que os parasitas sejam expulsos do folículo piloso, aumentando o número de ácaros nas amostras positivas (BECO *et al.*, 2007).

Dentre os fármacos mais utilizados, a única droga aprovada para o tratamento da demodicidose pelo *Food and Drug Administration* (FDA) é o amitraz. No entanto, outras drogas já foram avaliadas e também são utilizadas, como as pertencentes ao grupo das lactonas macrocíclicas: moxidectina, doramectina, ivermectina e milbemicina oxima. Novos fármacos, como o fluralaner, são alvo de estudos para utilização no tratamento da demodicidose (DELAYTE *et al.*, 2006; MUELLER *et al.*, 2011; WALTHER *et al.*, 2014a; WALTHER *et al.*, 2014b; ARSENOVIC *et al.*, 2015; FOURIE *et al.*, 2015)

O monitoramento do tratamento deve ser feito mediante resposta clínica e parasitológica. O EPP deve ser repetido em duas a quatro semanas após o início da terapia e deve demonstrar uma menor população de ácaros imaturos, e maior proporção de ácaros mortos. A cura parasitológica ocorre quando dois exames consecutivos são

negativos para ácaros em qualquer estágio, inclusive mortos, em no mínimo quatro áreas anteriormente afetadas. O tratamento deve ser continuado por pelo menos 30 dias após o segundo EPP negativo. O paciente só poderá ser considerado curado quando não houver recidivas em 12 meses após o fim da terapia. Contudo, alguns cães podem nunca atingir a cura plena, especialmente casos em que as causas subjacentes não sejam identificadas e controladas, necessitando de terapia de manutenção para o controle da população de ácaros (RHODES, 2004; GORTEL, 2006; NUTTAL; HARVEY; McKEEVER, 2009).

A demodicidose possui sinais clínicos muito semelhantes a outras dermatopatias, como piodermite e dermatofitose, sendo crucial o correto diagnóstico para instituição de terapia adequada. Embora a observação dos parasitas em EPP possa ser realizada no momento da consulta, muitos estabelecimentos não dispõem de microscópio para tal avaliação imediatamente após a colheita e por isso necessitam encaminhar as amostras para laboratórios externos. Não foram encontrados, na literatura consultada, dados referentes à durabilidade de amostras positivas para *Demodex* spp. em fita adesiva e nem se esta demora na avaliação poderia inferir em resultados falso-negativos.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a integridade de ácaros de *Demodex* spp., coletados por meio de impressão por fita adesiva, em intervalos de 24 horas pós-colheita por cinco dias.

2 MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisadas 25 amostras positivas para o ácaro *Demodex* spp. provenientes de exames parasitológicos de pele feitos por impressão por fita adesiva ao longo do período de 18 de agosto a 21 de novembro de 2015. Estas amostras foram oriundas de 16 cães que ao longo deste período foram trazidos por seus tutores para consulta no DERMATOVET/ HCV-UFRGS e receberam diagnóstico de demodicidose, ou já estavam em tratamento e retornaram para revisões de acompanhamento da terapia.

A colheita foi realizada utilizando um pedaço de aproximadamente 10cm de fita adesiva de acetato limpa posicionada na área a ser coletada, seguido de delicado “apertar” da pele entre os dedos polegar e indicador do examinador.

O diagnóstico parasitológico foi feito no momento da consulta (dia 0) observando-se, imediatamente após a colheita, a presença do ácaro *Demodex* spp. em seus diferentes estágios evolutivos no microscópio sob magnificação de dez vezes. Estas amostras, que normalmente seriam descartadas, foram aproveitadas para a realização do presente estudo, sendo todos os ácaros encontrados assinalados com caneta hidrográfica permanente de ponta fina (0.4 mm) para posterior análise.

Devido à carência de estudos semelhantes, foi utilizada uma amostra como projeto-piloto para observação do comportamento do ácaro na fita adesiva ao longo dos cinco dias de observação, e a partir daí foram feitas as seguintes classificações:

- ácaro “íntegro”: presença de gnatossoma (com quelíceras e palpos triarticulados), região intermediária (com pernas curtas e grossas triarticuladas) e opistosoma perfeitamente delimitados, sendo possível a sua diferenciação nos diferentes estágios evolutivos;

- ácaro “degradado”: manutenção da integridade geral do ácaro; delimitação do gnatossoma e região intermediária características do ácaro, porém poderiam estar menos delimitadas, de forma que a sua classificação em diferentes estágios poderia não ser possível; opistosoma com perda de delimitação ou ausente;

- ácaro “não passível de identificação”: perda de estrutura geral do ácaro ou ausência deste na região da lâmina previamente assinalada; ácaro sem sua delimitação

de bordos, quelíceras, palpos triarticulados, e região intermediária (pernas) ausente, ou com aspecto vacuolizado, sendo impossível caracterizar seu estágio evolutivo e podendo ser confundido com debris celulares, incorrendo em erro de diagnóstico.

Embora o diagnóstico de demodicidose possa ser feito por meio da identificação de ovos do parasita, esses não foram considerados no estudo, pois no projeto-piloto sua degradação ficou com estreita semelhança aos debris celulares na microscopia em menos de doze horas, o que dificultava sua avaliação posterior.

As formas larval, ninfa e adulta foram marcadas no dia 0 para análise durante cinco dias, com intervalos de 24 horas:

- dia 1: 24 horas após a análise no dia 0;
- dia 2: 48 horas após a análise do dia 0;
- dia 3: 72 horas após a análise do dia 0;
- dia 4: 96 horas após análise do dia 0;
- dia 5: 120 horas após análise do dia 0.

A cada avaliação os ácaros eram classificados segundo os critérios acima descritos, e os considerados íntegros ou degradados eram contabilizados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A média de intervalo entre as observações realizadas durante os cinco dias de análise foi de 25,94 horas (com desvio padrão de 2,35 horas).

Os resultados foram classificados de duas formas: na primeira considerou-se como amostra positiva aquela em que restou, no mínimo, a presença de um único ácaro “íntegro”; e na segunda forma, considerou-se positiva a amostra com, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”.

Considerando apenas a presença de ácaros classificados como “íntegros” na amostra, se observou os resultados contidos na **Tabela 1**.

Tabela 1: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro”.

Dia da Avaliação	Nº Amostras Positivas
0	25
1	10
2	7
3	4
4	2
5	1

Fonte: a própria autora

Desta forma, a durabilidade média de amostras positivas para presença do ácaro de *Demodex* spp. foi de 0,96 dias (com desvio padrão de 1,46 dias). Considerar como positivas as amostras com, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro” seria o mais indicado para observadores com menor experiência, pois são ácaros que mantiveram sua estrutura igual à observada no dia 0, ou seja, não houve modificações significativas em sua estrutura física, a forma encontrada é igual a observada se a análise fosse feita imediatamente após a colheita.

A segunda forma de classificação foi feita ampliando os resultados, de forma a considerar até qual dia no mínimo um ácaro manteve-se “degradado” na amostra. Os resultados obtidos podem ser visualizados na **Tabela 2**.

Tabela 2: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”.

Dia da Avaliação	Nº Amostras Positivas
0	8
1	18
2	13
3	10
4	10
5	10

Fonte: a própria autora

A durabilidade média de amostras positivas para presença do ácaro de *Demodex* spp., considerando-se a presença mínima de um ácaro classificado como “degradado”, foi de 2,6 dias (com desvio padrão de 2,08 dias). O aumento do número de amostras positivas do dia 0 para o dia 1 ocorreu devido à degradação de ácaros antes considerados como íntegros. Esta classificação foi mais abrangente, e mostrou o tempo em que há a manutenção da forma física geral do ácaro, com as partes morfológicas que o caracterizam permanecendo reconhecíveis por um período maior. Contudo, para observadores menos experientes a leitura de amostras com a presença de ácaros nesse estado pode ser um desafio, de forma que maior atenção deve ser dada ao exame para que não haja confusão com debris celular, resultando em um falso negativo.

Manigot (2004) avaliou diferentes ácaros de interesse veterinário e observou maior sobrevivência dos ácaros *Sarcoptes* spp. e *Otodectes* spp. do que a observada no presente estudo, o que poderia ser explicado pelo comportamento dos ácaros *Demodex* spp., que penetram muito mais profundamente na pele do que os sarcoptídeos.

Como foram utilizadas amostras provenientes de pacientes da rotina do DERMATOVET/ HCV-UFRGS, é importante salientar que alguns pacientes já estavam em tratamento. Estes pacientes estavam recendo três diferentes protocolos terapêuticos com Ivermectina (n= 4 [26,6%]), banhos com Peróxido de Benzoíla (n=3 [20%]), e um tratamento experimental utilizando Afoxolaner (n=8 [53,3%]).

A ivermectina atua nos canais de cloro aumentando a permeabilidade da membrana aos íons cloro, e como consequência há uma redução na resistência da membrana celular. O peróxido de benzoíla possui alto poder oxidante, sendo capaz de

romper a membrana celular de inúmeros agentes patogênicos (SPINOSA, H. S; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M., 2011). E por fim, o Afoxolaner, também atua nos canais de cloro, mas bloqueando a passagem destes íons através da membrana celular (NEXGARD). Desta forma, todos, ainda que por mecanismos diferentes, afetam a integridade da membrana celular dos parasitos e, por isso, uma análise complementar foi realizada comparando as amostras provenientes de cães em tratamento (n=15 [60%]), com aquelas provenientes de cães que foram diagnosticados no momento da consulta (n=10 [40%]). Os resultados podem ser vistos nas tabelas a seguir:

Tabela 3: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegros”, oriundas de animais que não estavam em tratamento.

Amostras provenientes de animais sem tratamento	
dia da avaliação	nº amostras positivas para ácaros "íntegros"
0	25
1	7
2	6
3	4
4	2
5	1

Fonte: a própria autora

A durabilidade média de amostras positivas para presença do ácaro de *Demodex* spp., considerando-se a presença mínima de um ácaro classificado como “íntegro”, provenientes dos animais que não estavam recebendo nenhum tipo de tratamento foi de dois dias (com desvio padrão de 1,76 dias).

Tabela 4: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”, oriundas de animais que não estavam em tratamento.

Amostras provenientes de animais sem tratamento	
dia da avaliação	nº amostras positivas para ácaros "degradados"
0	0
1	8
2	7
3	7
4	7
5	7

Fonte: a própria autora

A durabilidade média de amostras positivas para presença do ácaro de *Demodex* spp., considerando-se a presença mínima de um ácaro classificado como “degradado”, provenientes dos animais que não estavam recebendo nenhum tipo de tratamento foi de 3,9 dias (com desvio padrão de 1,79 dias).

Tabela 5: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “íntegro”, oriundas de animais que estavam em tratamento.

Amostras provenientes de animais em tratamento	
dia da avaliação	nº amostras positivas para ácaros "íntegros"
0	22
1	3
2	1
3	0
4	0
5	0

Fonte: a própria autora

A durabilidade média das amostras positivas, considerando somente ácaros classificados como “íntegros” (provenientes de cães em tratamento), foi de 0,26 dias (com desvio padrão de 0,59 dias), sendo significativamente menor que a durabilidade média dos mesmos quando oriundos de animais que não estavam sob tratamento.

Tabela 6: número de amostras positivas ao longo dos cinco dias observados considerando-se a presença de, no mínimo, um ácaro classificado como “degradado”, oriundas de animais que estavam em tratamento

Amostras provenientes de animais em tratamento	
dia da avaliação	nº amostras positivas para ácaros "degradados"
0	3
1	10
2	6
3	3
4	3
5	3

Fonte: a própria autora

A durabilidade média das amostras positivas considerando ácaros classificados como “degradados”, provenientes de animais em tratamento, foi de 1,73 dias (com desvio padrão de 1,83).

Portanto, o fato de todos os protocolos de tratamento utilizados afetarem a integridade da membrana celular dos parasitos, aliado à sua rápida morte por dessecação

quando fora do hospedeiro (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013), pode explicar a menor taxa de manutenção de integridade nas amostras provenientes de animais em tratamento. Esta observação é de crucial importância, pois uma longa espera entre a colheita e o exame da amostra, quando oriundas de animais que estão sendo tratados, pode acabar originando falsos negativos, e por consequência uma suspensão do tratamento antes do recomendado. Este fato é fortemente associado a falhas no tratamento, e, portanto, a menor taxa de cura dos animais, o que pode levar a recidivas e comprometimento da saúde geral do paciente, visto que a demodicidose, quando generalizada, é uma doença grave e potencialmente fatal (GORTTEL, 2006; MUELLER *et al.*, 2011).

A análise quantitativa, visando avaliar quanto era a degradação diária dos ácaros de *Demodex* spp. nos intervalos de observação a partir do dia 1 até o dia 5, também foi realizada, e os resultados obtidos estão expressos nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7: Número médio de ácaros nas amostras positivas provenientes de animais que não estavam em tratamento

Amostras oriundas de animais sem tratamento - N° médio de ácaros:		
dia da avaliação	"íntegros"	"degradados"
1	1,16	1,48
2	0,56	1,28
3	0,32	0,96
4	0,08	0,72
5	0,04	0,6

Fonte: a própria autora

Tabela 8: Número médio de ácaros nas amostras positivas provenientes de animais que estavam em tratamento.

Amostras oriundas de animais em tratamento - N° médio de ácaros:		
dia da avaliação	"íntegros"	"degradados"
1	1,12	1,16
2	0,08	0,92
3	0	0,44
4	0	0,4
5	0	0,4

Fonte: a própria autora

Os ácaros classificados como “íntegros” tem uma maior (e mais rápida) degradação do que aqueles classificados como “degradados”, sendo que a maior taxa foi observada entre os dias um e dois. Devido a sua posição profunda na pele, e ausência de estádios fora do hospedeiro, é esperado que estes ácaros não possuam grande resistência

física aos fatores ambientais, no entanto, é curioso o fato de que sua morfologia mantém-se muito semelhante a do ácaro vivo por longos períodos quando não estão sob efeito de nenhum fármaco acaricida. Este fato é mostrado pela relativa estabilidade das amostras a partir do dia três, em que a maioria dos ácaros que não se degradaram anteriormente mantém-se no mesmo estado até o fim da avaliação no dia cinco.

Pelos acaricidas afetarem a membrana celular do parasito, já era esperado que estes possuísem uma menor durabilidade quando comparados ao grupo que não estava em tratamento, o que pôde ser observado pelos resultados da **Tabela 8**, na qual a partir do dia três já não havia mais ácaros “íntegros” nas amostras, além de uma menor quantidade média de ácaros “degradados” por amostra, quando comparados ao mesmo grupo que não estava sob efeito de nenhum fármaco.

4 CONCLUSÃO

Apesar da rápida morte dos ácaros de *Demodex* spp. por dessecação fora do hospedeiro, é possível haver um prazo na avaliação das amostras após a colheita, desde que esse tempo não seja superior a 48 horas para amostras oriundas de animais sem tratamento acaricida e 24 horas para amostras provenientes de animais sob terapia acaricida.

Após estes períodos citados, os ácaros já não estão mais em condições íntegras, levando a uma dificuldade de visualização do parasito, e maior chance de resultados falso-negativos.

É necessário um número maior de amostras para determinar definitivamente qual o tempo máximo entre a colheita e a leitura da amostra em que o ácaro permanecerá passível de diagnóstico, porém estes resultados preliminares podem auxiliar no correto manejo das amostras e diminuição de resultados falso-negativos por lise do parasito.

REFERÊNCIAS

- ARSENOVIC, M. et al. The main factors influencing canine demodicosis treatment outcome and determination of optimal therapy. **Parasitol Res**, (2015) 114:2415–2426, 2015.
- BECO, L. *et al.* Comparison of skin scrapes and hair plucks for detecting *Demodex* mites in canine demodicosis, a multicenter, prospective study. **Veterinary Dermatology**, v.18 (Abstract), p.281, 2007.
- DELAYTE, E. H. et al. Eficácia das lactonas macrocíclicas sistêmicas (ivermectina e moxidectina) na terapia da demodicidose canina generalizada. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.1, p.31-38, 2006.
- FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 4.ed. São Paulo: Ícone, 2004.
- FOURIE, J. J. et al. Efficacy of orally administered fluralaner (Bravecto™) or topically applied imidacloprid/ moxidectin (Advocate®) against generalized demodicosis in dogs. **Parasites & Vectors** (2015) 8:187.
- GORTEL, K. Update on Canine Demodicosis. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, 36 (2006) 229–241.
- MANIGOT, G. A. Mites of interest in canine and feline dermatology: evaluation of their survival and structural integrity in oil preparations for microscopy. **Veterinary Dermatology** 2004, 15 (Suppl. 1), 41–69
- MEDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatología de pequeños animales – atlas em color y guía terapêutica**. 2 .ed. Espanha: Elsevier, 2007.
- MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. Muller & Kirk. **Small Animal Dermatology**. 7. ed. Missouri: Elsevier, 2013.

- MUELLER, R. S. *et al.* Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice guidelines. **Veterinary Dermatology**, v.23(2), p. 86-e21, 2012.
- NUTTAL, T.; HARVEY, R.G.; McKEEVER, P. J. **A Colour Handbook of Skin Diseases of the Dog and Cat**. 2. ed. London: Manson Publishing, 2009.
- PATEL, A.; FORSYTHE, P. **Soluções Saunders em la prática veterinária – dermatologia de pequenos animais**. Espanha: Elsevier, 2010, 390p.
- PEREIRA, A. V. *et al.* Comparison of acetate tape impression with squeezing versus skin scraping for the diagnosis of canine demodicosis. **Australian Veterinary Journal**, Volume 90, No 11, November 2012.
- RHODES, K. H. **The 5 – Minute Veterinary Consulting Clinical Companion: Small Animal Dermatology**. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2004.
- SARIDOMICHELAKIS, M.N. *et al.* Relative sensitivity of hair pluckings and exudate microcopy for the diagnosis of canine demodicosis. **Veterinary Dermatology**, v.18(2), p.138-141, 2007.
- SASTRE, N. *et al.* Phylogenetic relationships in three species of canine Demodex mite based on partial sequences of mitochondrial 16S rDNA. **Veterinary Dermatology**, 23: 509–e101, 2012.
- NEXGARD. Responsável técnico Patrícia Schwarz. São Paulo: Merial Saúde Animal Ltda, 2014. Bula de remédio.
- SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Muller & Kirk. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996.
- SPINOSA, H. S; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

URQUHART, G. M. *et al.*. **Parasitologia Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 273p.

WALTHER, F. M. *et al.* Safety of concurrent treatment of dogs with fluralaner (Bravecto™) and milbemycin oxime – praziquantel. *al. Parasites & Vectors* 2014a, 7:481.

WALTHER, F. M. *et al.* Safety of fluralaner, a novel systemic antiparasitic drug, in MDR1(-/-) Collies after oral administration. **Parasites & Vectors** 2014b, 7:86.