

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

JÉSSICA NUNES SILVA

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS E
DA CARGA FÚNGICA DURANTE O TRATAMENTO COM
ITRACONAZOL NA ESPOROTRICOSE FELINA**

PORTO ALEGRE

2016

FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO

JÉSSICA NUNES SILVA

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Subárea: Microbiologia

Especialidade: Micologia

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Co-orientador: **DR. SANDRO ANTONIO PEREIRA**

PORTO ALEGRE

2016

CIP - Catalogação na Publicação

Nunes Silva, Jéssica

Avaliação da sensibilidade de métodos diagnósticos e da carga fúngica durante o tratamento com itraconazol na esporotricose felina / Jéssica Nunes Silva. -- 2016.
109 f.

Orientador: Laerte Ferreiro.

Coorientador: Sandro Antonio Pereira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Esporotricose. 2. gatos. 3. diagnóstico. I. Ferreiro, Laerte, orient. II. Pereira, Sandro Antonio, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dr. Flávio de Mattos Oliveira (LAPEMI-UFSM)

Dra. Fernanda Vieira Amorim da Costa (UFRGS)

Dra. Andréia Spanamberg Dorneles (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar essa oportunidade e saúde para continuar.

Aos meus orientadores, Sandro Antonio Pereira pela paciência e confiança nesses 12 anos de convivência e Laerte Ferreiro pelo acolhimento em me receber tão bem na Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A toda equipe do Lapclin-Dermzoo, pelas risadas e pelos momentos de sufoco, mostrando que juntos somos mais fortes e conseguimos vencer todas as dificuldades. Em especial à Luisa Helena Monteiro de Miranda, que esteve presente colaborando no que fosse preciso e mostrando-se muito eficiente. Também, Érica Guerino pelo companheirismo, Tuanne Rotti pelos carinhos e apertos de felícia, Isabella Dib pela descontração e alegria, e entre outras pessoas: Emília, Fabiano, Rodrigo, Tais, Monique, Beatriz, Tânia, Denise Torres, Anna, Paula, Marina Furtado, Isabelinha... ah são tantas nessa grande família dermzull!

À minha pibic Sheilla Maria, pela ajuda no atendimento e na leitura das lâminas.

À minha querida amiga Amanda Akemi, que mesmo distante, torce por mim.

Ao Laboratório de Micologia e ao Serviço de Anatomia Patológica/ INI/Fiocruz pelo processamento das amostras.

Às amigas Anna Caroline e Jéssica Boechat pelo cuidado com as nossas culturas.

À minha amiga Cibele Fraga do Laboratório de Micologia, que apesar do pouco tempo juntas, me ensinou que nem tudo é do jeito como sonhamos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que viabilizou o desenvolvimento do projeto.

Aos gatos dessa pesquisa, pela satisfação de vê-los bem ao final do tratamento.

Ao meu gato Milk pela feliz recepção diária em me ver de volta ao lar.

À minha família, que mesmo distante, me dava forças para seguir em frente, principalmente à minha avó Euzamar, nas orações.

Ao meu marido Rafael Menezes pelo apoio, compreensão e presente nesses 17 anos.

À minha querida mãe Maria Inêz que nunca serei capaz de retribuir todo carinho que faz por mim.

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por espécies do complexo *Sporothrix schenckii* que acomete seres humanos e animais, principalmente os gatos. Desde 1998 o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz no Rio de Janeiro vem acompanhando uma epidemia dessa doença envolvendo seres humanos, cães e gatos, onde as principais formas de transmissão são arranhadura, mordedura e/ou contato com o exsudato das lesões cutâneas de gatos doentes. O diagnóstico definitivo da esporotricose felina é obtido a partir do isolamento do *Sporothrix* sp. em meios de cultura, entretanto, o resultado desse exame pode demorar até quatro semanas, o que em algumas situações pode retardar o início do tratamento antifúngico. Os exames citopatológico, histológico e imuno-histoquímico são opções viáveis e mais rápidas para o diagnóstico dessa micose em gatos, principalmente em situações quando não é possível realizar o isolamento fúngico. O diagnóstico precoce da esporotricose felina é importante na implementação rápida do tratamento antifúngico, melhorando o prognóstico na maioria dos casos. O objetivo deste estudo foi avaliar e comparar as diferentes técnicas utilizadas no diagnóstico da esporotricose felina antes e durante o tratamento antifúngico. Na primeira etapa do estudo foram comparados os exames citopatológico (coloração pelo método panótico rápido), histológico (impregnação pela prata de Grocott) e imuno-histoquímico de 184 gatos no diagnóstico da esporotricose sem tratamento antifúngico prévio utilizando o cultivo fúngico como teste padrão de referência. Estruturas leveduriformes foram observadas em 160 (87,0%) casos no exame citopatológico, 168 (91,3%) na histopatologia e 163 (88,3%) na imunohistoquímica. A associação das três técnicas elevou a sensibilidade do diagnóstico para 98,3%, o que enfatiza a necessidade de sua implementação como ferramentas de rotina, sobretudo quando a cultura fúngica não está disponível. Na etapa seguinte, a carga parasitária e o isolamento de *Sporothrix* sp. das lesões cutâneas de 74 gatos foram avaliados mensalmente antes e durante o tratamento com itraconazol por um período de 12 semanas. A mediana da carga fúngica observada antes do início do tratamento antifúngico foi maior (pMW = 0,013) nos gatos nos quais foi observada a persistência da lesão (Med=98,6) em relação aqueles em que houve cicatrização (Med=15,0). A redução da carga fúngica ocorreu em todas as lesões estudadas, assim como a redução da positividade da cultura fúngica e do exame citopatológico. Estes resultados sugerem uma redução no potencial zoonótico dos gatos, enfatizando a importância do tratamento

precoce como medida de controle. Adicionalmente, o isolamento do fungo e a presença de estruturas leveduriformes nas lesões de gatos com esporotricose podem ser fatores preditores da falência terapêutica, indicando a necessidade da implementação de alternativas terapêuticas.

Palavras-chave: *Sporothrix* sp., gato, exame citopatológico, histopatologia, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Sporotrichosis is subcutaneous mycose caused by species of fungus from the *Sporothrix schenckii* complex and affects humans and animals, especially cats. Since 1998, the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Fiocruz in Rio de Janeiro has been describing in Rio de Janeiro an epidemic of sporotrichosis, involving humans, cats and dogs, with most of cases related to transmission through scratches, bites or contact with lesions from infected cats. The definitive diagnosis is based on the isolation of the fungus in culture; however, the results may take up to four weeks and postpone treatment outset. The cytopathology, histopathology and immunohistochemistry should be considered as rapid and accessible alternatives for the diagnosis in cats, especially when the fungal culture is not available. The early diagnosis of feline sporotrichosis is desirable for the prompt beginning of the antifungal treatment, improving the prognosis in most of the cases. The aim of this study was to evaluate and compare different techniques for the diagnosis of feline sporotrichosis before and during the treatment with itraconazol. In the first part of the study, cytopathological (Quick Panoptic), histopathological (Grocott silver stain) and immunohistochemical examinations were compared regarding the diagnosis of sporotrichosis in 184 cats without previous treatment, by using fungal culture as a reference standard. The yeast-like cells were observed in 160 (87.0%) cases by cytopathological examination, in 168 (91.3%) by histopathology and in 163 (88.3%) by immunohistochemistry. The combination of the three methods led to the diagnosis of 98.3% of cases, pointing to the need of their implementation as regular tools, notably when fungal culture is not available. In the second part of the study, the fungal burden and the isolation of *Sporothrix* sp. in cutaneous lesions of 74 cats were monthly evaluated before and during the treatment with itraconazole for twelve weeks. The median of the fungal load detected before the outset of the antifungal treatment was

higher ($p_{MW}=0.013$) in cats in which there was a persistence of the cutaneous lesion (Med=98.6) in comparison to those in which healing of the lesion was observed (Med=15.0). The decrease of the fungal burden occurred in all the lesions in this study as well as the reduction of the positivity of the fungal culture and the cytopathological examination. These results suggest a reduction in the zoonotic potential of cats and emphasize the importance of the early treatment as a control measure. In addition, the isolation of the fungus and the presence of yeast-like cells in lesions of cats with sporotrichosis during the treatment can be a predictor of treatment failure and should alert for the need of alternative therapeutic regimens.

Keywords: cat; cytopathology, histopathology, immuno-histochemistry, sporotrichosis

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina-peroxidase. Fonte: Ramos-Vara 2005. -----	35
FIGURA 2	Exame citopatológico de pele ulcerada apresentando estruturas leveduriformes compatíveis com espécies do complexo <i>S. schenckii</i> livres, formas arredondadas, formas de charuto e brotamentos no interior de macrófagos e/ou neutrófilos. Panótico Rápido. 100x. -----	41
FIGURA 3	Biópsia de pele ulcerada apresentando grande quantidade de leveduras de <i>Sporothrix</i> sp. Impregnação pela Prata de Grocott, 40x.-----	42
FIGURA 4	Leveduras e antígenos intracelulares de <i>Sporothrix</i> sp. Imuno-histoquímica, 40x. -----	44
ARTIGO 1		
FIGURA 1	Feline sporotrichosis. a: Cat presenting ulcerated skin multiple lesions in the forelimb and face. b: Ulcer on the bridge of the nose -----	67
FIGURA 2	Skin of a cat with sporotrichosis. a: Dark-brown <i>Sporothrix</i> spp. yeast-like cells (arrows). Immunohistochemistry (anti- <i>Sporothrix</i> spp. antiserum, 1:4000); b: Impression smear showing numerous cigar-shaped or oval yeast-like cells with a single round pink nucleus surrounded by blue cytoplasm and a non-staining cell wall, within macrophages and extracellular medium. Quick Panoptic stain; c: High fungal load. Grocott silver stain. -----	68

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

- TABELA 1 Concordance between the GSS and IHC techniques, separately according to CPT results, taking into consideration both positive and negative concordance. ----- 65
- TABELA 2 Concordance between the techniques: cytopathology (CPT), Grocott silver stain (GSS) and immunohistochemistry (IHC). ----- 66

ARTIGO 2

- TABELA 1 Resultados dos exames micológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos com esporotricose antes e durante o tratamento com itraconazol. ----- 78
- TABELA 2 Correlação da quantificação de leveduras no exame citopatológico de acordo com a distribuição das lesões em grupos dos gatos com esporotricose antes e durante o tratamento com itraconazol. ----- 79
- TABELA 3 Relação dos resultados dos exames micológicos (exame citopatológico e cultura) ao longo do tratamento com o desfecho dos gatos (cura clínica e falência terapêutica). ----- 81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHIA – *Brain heart infusion Agar* (Ágar de Infusão de cérebro e coração)

BSA – Albumina Sérica Bovina

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório

CM – Cultura Micológica

CPT – Exame citopatológico

FeLV – Vírus da Leucemia Felina

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

FIV – *Feline Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Felina)

H&E – Hematoxilina e Eosina

IHQ – Imuno-histoquímica

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IPG – Impregnação pela Prata de Grocott

Lapclin-Dermzoo – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

PAS – *Periodic acid-Schiff*

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

TBS – *Tris-Buffered-Saline*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. <i>Objetivo Geral</i>	18
2.2. <i>Objetivos Específicos</i>	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1. <i>Histórico da esporotricose</i>	19
3.2. <i>Sporothrix sp.</i>	20
3.3. <i>Esporotricose</i>	21
3.3.1. <i>Epidemiologia</i>	22
3.3.1.1 <i>Aspecto global</i>	22
3.3.1.2 <i>Brasil</i>	23
3.3.1.3 <i>Notificação Compulsória</i>	24
3.3.1.4 <i>Gato: fonte de infecção</i>	24
3.3.1.5 <i>Cães</i>	25
3.3.1.6 <i>Dados sócio-demográficos</i>	25
3.3.1.7 <i>Controle</i>	27
3.3.2. <i>Zoonose</i>	27
3.4. <i>Esporotricose felina</i>	28
3.4.1 <i>Aspectos clínicos</i>	28
3.4.2 <i>Diagnóstico laboratorial</i>	29
3.4.2.1 <i>Cultura</i>	30
3.4.2.2 <i>Exame citopatológico (CPT)</i>	30
3.4.2.3 <i>Histopatologia</i>	32
3.4.2.4 <i>Imuno-histoquímica (IHQ)</i>	33
3.4.2.5 <i>Sorologia</i>	35
3.4.2.6 <i>Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</i>	35
3.4.3 <i>Diagnóstico diferencial</i>	36
3.4.4 <i>Terapêutica</i>	37
4 MÉTODOS	38
4.1 <i>Desenho do estudo</i>	38
4.2 <i>Casuística</i>	38
4.2.1 <i>População do estudo</i>	38
4.2.2 <i>Critérios de inclusão e exclusão</i>	38
4.2.2.1 <i>Critérios de inclusão</i>	38
4.2.2.2 <i>Critérios de exclusão</i>	39
4.2.3 <i>Cálculo amostral</i>	39
4.2.5 <i>Plano de recrutamento</i>	39
4.2.6 <i>Critérios para suspender ou encerrar o estudo ou retirar voluntários</i>	39
4.3 <i>Materiais, procedimentos e técnicas</i>	40
4.3.1 <i>Primeira Etapa</i>	40

4.3.1.1 Exame citopatológico	40
4.3.1.2 Exame histopatológico	41
4.3.1.3 Exame imuno-histoquímico (IHQ)	42
4.3.2 Segunda Etapa	44
4.3.2.1 Avaliação Clínica	44
4.3.2.2 Exame citopatológico (CPT).....	45
4.3.2.3 Cultura micológica (CM).....	45
4.3.2.4 Tratamento e seguimento do paciente.....	46
4.4 Plano de Análise	46
5. RESULTADOS	47
5.1 Capítulo 1	47
5.2 Capítulo 2	69
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÃO	96
8. REFERÊNCIAS.....	97
9. ANEXO 1.....	107

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença suabaguda a crônica, usualmente limitada a pele e ao tecido subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes, embora possa tornar-se disseminada (KWON-CHUNG & BENNET, 1992; BARROS *et al.*, 2011). Acomete os humanos e uma grande variedade de animais, como porcos, cavalos, ratos, mulas, raposas, tatus, golfinhos, camelos, aves (LONDERO & RAMOS, 1980; RIPPON, 1988; COSTA *et al.*, 1994; PAPPAS *et al.*, 2000), cães (SCHUBACH *et al.*, 2006), mas o gato é a principal espécie animal acometida (PEREIRA *et al.*, 2014).

Na região metropolitana do Rio de Janeiro, o alto percentual da transmissão zoonótica de *Sporothrix schenckii* a partir de gatos doentes, por meio de mordedura, arranhadura e/ou do contato com o exsudato de suas lesões cutâneas evidencia a importância destes animais na manutenção da epidemia que ocorre nesta localidade desde o final da década de 1990 (SCHUBACH *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2010).

Dentre os animais, o gato é a espécie mais afetada pela esporotricose. Na epidemia do Rio de Janeiro já foram diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) mais de 4.000 casos em gatos no período que compreende 1998 até 2012 (GREMIÃO *et al.*, 2015). Apesar dessa ser a maior casuística de esporotricose animal descrita, esse número não representa a totalidade de casos, e em muitas situações onde as condições socioeconômicas são precárias, é provável que não seja sequer realizado o diagnóstico da doença.

O diagnóstico definitivo obtido através do isolamento do *Sporothrix* sp. em meios de cultura, método padrão de referência, nem sempre é possível fora dos laboratórios de referência em virtude de diferentes fatores, tais como: o custo elevado

do exame e a ausência de estrutura laboratorial apropriada e de recursos humanos que permitam a realização deste método de diagnóstico. Além disso, existe a necessidade de um diagnóstico laboratorial rápido, prático, pouco oneroso e acurado que possa auxiliar os médicos veterinários no diagnóstico e no acompanhamento terapêutico dessa micose (SILVA *et al.*, 2015).

Até o momento poucos estudos abordaram a sensibilidade dos métodos utilizados para o diagnóstico da esporotricose felina (SILVA *et al.*, 2015). O foco desses estudos geralmente está concentrado no método padrão de referência, a cultura, no entanto, exames utilizados rotineiramente no diagnóstico como o citopatológico e o histopatológico são ainda pouco explorados. Outros métodos como a imunohistoquímica têm sido estudados no diagnóstico da esporotricose em humanos e animais (MIRANDA *et al.*, 2011), entretanto, a padronização e a posterior comparação da sensibilidade deste teste em relação à cultura fúngica e aos outros exames empregados na rotina diagnóstica da esporotricose felina ainda não foi realizada.

PEREIRA e colaboradores (2011) relataram a importância da utilização do exame citopatológico no diagnóstico da esporotricose felina na epidemia do RJ e observaram que a sensibilidade desse método foi 78,9 % utilizando a coloração pelo método panótico rápido, reforçando que é um teste adequado para o diagnóstico presuntivo da esporotricose, principalmente em situações de epizootia. Corroborando com esses achados, SILVA e colaboradores (2015) também encontraram sensibilidade satisfatória deste exame (84,9%) comparada com a cultura.

Estudos que avaliem a carga parasitária e a viabilidade do fungo durante o curso do tratamento antifúngico ainda não foram realizados. Após a implementação do tratamento antifúngico sistêmico regular com itraconazol espera-se que ocorra a diminuição da carga parasitária nas lesões cutâneas felinas e da viabilidade do agente

etiológico, com conseqüente redução do risco de transmissão do fungo para seres humanos e outros animais. Os conhecimentos desses dados são importantes no que diz respeito às medidas de controle e profilaxia da esporotricose. O estudo dos gatos com esporotricose provenientes da epidemia em curso no Rio de Janeiro constitui uma oportunidade singular para ampliar o conhecimento sobre o diagnóstico dessa micose, que nos últimos anos representa um importante problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a sensibilidade nas diferentes técnicas utilizadas no diagnóstico da esporotricose felina e a carga fúngica antes e durante o tratamento antifúngico.

2.2. Objetivos Específicos

- Padronizar a reação de imuno-histoquímica em cortes histológicos de lesões cutâneas de gatos com esporotricose, utilizando o soro policlonal de coelho anti-*Sporothrix* sp.
- Avaliar a sensibilidade e comparar os exames citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico no diagnóstico da esporotricose felina, utilizando o cultivo fúngico como teste padrão de referência;
- Quantificar o número de estruturas leveduriformes provenientes de lesões cutâneas felinas observadas no exame citopatológico corado pelo método panótico rápido na consulta inicial (pré-tratamento) e nas consultas de seguimento (durante o tratamento);
- Descrever o tempo decorrido após o início do tratamento antifúngico no qual não foi mais possível o isolamento de *Sporothrix* sp. em meio de cultivo proveniente de lesão cutânea felina.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Histórico da esporotricose

Em 1898, o médico Benjamin Schenck, no Johns Hopkins Hospital em Baltimore, Estados Unidos, realizou o primeiro isolamento de um fungo de um paciente do sexo masculino que apresentava lesões na mão direita e braço. A amostra desse paciente foi enviada para ser estudada pelo micologista Erwin F. Smith que identificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporothrichum* (SCHENCK, 1898). O segundo caso da doença foi descrito em 1900, também nos Estados Unidos, na cidade de Chicago, por Hektoen e Perkins. Este caso era de um menino que apresentava um abscesso subcutâneo e posterior desenvolvimento de lesão ulcerada e nódulos, além de linfangite secundária, devido a um ferimento causado por uma martelada no dedo indicador. Após o isolamento do fungo, os autores denominaram o agente como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN e PERKINS, 1900). Entre 1903 e 1912, de BEURMANN e GOUGEROT (1912) descreveram as principais formas clínicas e a terapêutica da esporotricose, após reunir e revisar cerca de 200 casos humanos.

No Brasil, LUTZ & SPLENDORE (1907) descreveram inicialmente um caso humano no Brasil, no estado de São Paulo, e posteriormente descreveram a primeira infecção natural de esporotricose em ratos. Em 1912, Terra e Rabelo descreveram o primeiro caso humano no Rio de Janeiro. Entretanto, novos casos foram registrados em outros estados brasileiros, dentro de um período de quatro anos (DONADEL *et al.*, 1993).

O primeiro relato de esporotricose animal no Rio de Janeiro foi em uma mula (LEÃO *et al.*, 1934). Casos esporádicos de esporotricose felina nessa região foram descritos nas décadas de 1980 e 1990 (CRUZ, 2013). Desde então, o INI/Fiocruz vem

diagnosticando um grande número de casos humanos e animais dessa micose na região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo a primeira epidemia associada a transmissão zoonótica que tem os gatos doentes como fonte de infecção do *Sporothrix* sp. descrita na literatura (SCHUBACH *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2011).

3.2 *Sporothrix* sp.

Recentemente, estudos moleculares com base nas análises da sequência de síntese de quitina, β -tubulina e calmodulina mostraram que o *S. schenckii* constitui um complexo de pelo menos seis espécies, discriminadas filogeneticamente, como *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, e *S. luriei*, além do *S. schenckii* sensu stricto (RODRIGUES *et al.*, 2013). Em estudo recente, RODRIGUES e colaboradores (2013) descrevem que *S. brasiliensis* é o agente etiológico mais prevalente entre gatos doentes no Brasil (96,9% das amostras).

Sporothrix sp. é encontrado em plantas e matéria vegetal em decomposição, sendo, portanto, amplamente disperso no meio ambiente. A distribuição é universal, entretanto, apresenta predileção por climas temperados e tropicais (RIPPON, 1988). LUTZ & SPLENDORE (1907) demonstraram o dimorfismo dependente da temperatura no início do século passado. Na natureza ou em meio de cultura a 25° C, cresce na forma filamentosa; enquanto que em parasitismo ou em meio de cultura a 37° C, encontra-se na forma de levedura (KWON-CHUNG & BENNET, 1992). A forma de levedura é descrita como mais virulenta que a forma micelial (RODRIGUES *et al.*, 2013).

Na macromorfologia as colônias filamentosas de *Sporothrix* sp. em cultura variam em sua morfologia, entretanto, em ágar Sabouraud glicose a 25°C, após três a cinco dias de crescimento, geralmente apresentam textura lisa e coloração branca

acinzentada, porém, com o passar do tempo, as colônias tornam-se mais escurecidas (BARROS *et al.*, 2011). Algumas cepas, entretanto possuem a capacidade de produzirem colônias escurecidas desde o início do crescimento (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). A 37°C o fungo faz a conversão para a sua forma de levedura onde observam-se colônias lisas e úmidas, de consistência cremosa e coloração esbranquiçada (RIPPON, 1988). Cepas relacionadas à espécie *S. globosa* não crescem bem a 37°C, podendo necessitar de temperaturas mais baixas para a conversão à forma de levedura (MARIMON *et al.*, 2007). Esse processo de transição pode ocorrer após o paciente ter sido infectado pela forma filamentosa do fungo (BARROS *et al.*, 2011). A micromorfologia da forma filamentosa revela várias hifas hialinas, finas e septadas, associadas a conídios ovóides e soltos, algumas vezes agrupados em conidióforos terminais, conferindo-lhes o aspecto de “margarida” e também a conídios demáceos que podem ser encontrados dispostos ao longo de toda a hifa (RIPPON, 1988). O tamanho e a forma dos conídios demáceos podem variar entre as espécies do complexo *Sporothrix* (MARIMON *et al.*, 2007). Microscopicamente as células leveduriformes apresentam-se em vários tamanhos e formas. Observam-se estruturas redondas, ovais ou em forma de naveta, com brotamento em formato de charuto (BARROS *et al.*, 2011). A aeração, tensão de CO₂, fonte de carbono e pH também têm importância na conversão da forma filamentosa para levedura (RIPPON, 1988).

3.3 Esporotricose

A esporotricose é uma doença suabaguda a crônica, usualmente limitada a pele e ao tecido subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes, embora possa tornar-se disseminada (KWON-CHUNG & BENNET, 1992; BARROS *et al.*, 2011).

Acomete os humanos e uma grande variedade de animais, como porcos, cavalos, ratos, mulas, raposas, tatus, golfinhos, camelos, aves (LONDERO & RAMOS, 1980;

RIPPON, 1988; COSTA et al., 1994; PAPPAS et al., 2000), cães (SCHUBACH et al., 2006), mas o gato é a principal espécie animal acometida (PEREIRA et al., 2014).

No estado de saprofitismo, o fungo é geralmente encontrado em substratos vegetais nas condições favoráveis de temperatura e umidade (RIPPON, 1988). *Sporothrix* sp. foi isolado em espinhos, feno, palha, musgos do gênero *Sphagnum*, madeira e solo rico em matéria orgânica em decomposição (KAUFFMAN, 1999). Classicamente, a transmissão do agente etiológico ocorre através da pele pela implantação traumática do fungo presente em matéria vegetal ou matéria orgânica de solo contaminado por conídios de *Sporothrix* sp. (RIPPON, 1988). Em raras ocasiões, pode ser adquirida por inalação do esporo (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011).

Até o início da década de 1980, casos de transmissão de *Sporothrix* sp. envolvendo animais eram raramente descritos (BARROS et al., 2011), porém, na região metropolitana do Rio de Janeiro, a transmissão zoonótica é importante devido ao grande número de casos descritos nos últimos anos. Essa transmissão ocorre através de arranhadura, mordedura ou contato com exsudatos de lesões de gatos doentes (BARROS et al., 2010; SILVA et al., 2012).

3.3.1. Epidemiologia

3.3.1.1 Aspecto global

A esporotricose apresenta distribuição mundial, apesar de apresentar altas prevalências em regiões de clima tropical e subtropical úmido. No entanto, há relatos nos Estados Unidos, México, América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Guatemala e Peru), Ásia (China, Índia e Japão), África e Austrália. (CHAKRABATI et al., 2015). É a micose subcutânea mais frequente na América Latina (COSTA et al., 1994), principalmente no Brasil (SCHUBACH et al., 2008).

Epidemias de esporotricose acometendo amplas áreas geográficas ou elevado número de casos são raras e geralmente estão relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004). A maior delas acometeu mais de 3.000 trabalhadores de uma mina de ouro na África do Sul. Nessa epidemia os dormentes de madeira utilizados na sustentação da mina estavam colonizados com o *S. schenckii* (HELM & BERMAN, 1947). Outra aconteceu nos Estados Unidos, na década de 1980, na qual 84 trabalhadores de 15 estados adquiriram a doença ao participar de um programa de reflorestamento, sendo esses casos relacionados ao contato com um tipo de musgo contaminado com *S. schenckii* (COLES *et al.*, 1992). Neste mesmo país, em 1996, foram descritos 48 casos de esporotricose felina, durante um período de 40 anos (DAVIES & TROY, 1996). Alguns anos depois, CROTHERS e colaboradores (2009) realizaram um estudo retrospectivo para avaliação de 14 casos felinos observados no nordeste da Califórnia no período de 1987 a 2007.

Segundo um estudo recente realizado por ZHANG e colaboradores (2015), as regiões mais endêmicas são China, África do Sul e Brasil, que apresenta o maior número de casos de esporotricose tanto humana quanto animal.

3.3.1.2 Brasil

A primeira descrição no Brasil foi relatada na década de 1950 em São Paulo (FREITAS *et al.*, 1956). No Brasil, a maior série de casos da doença em gatos incluía oito casos (FREITAS *et al.*, 1965), até a descrição de 347 casos felinos provenientes do Rio de Janeiro (SCHUBACH *et al.*, 2004a). Esta endemia de esporotricose relacionada aos gatos domésticos está em curso no Rio de Janeiro desde 1998, sendo a primeira sob a forma de zoonose encontrada na literatura. Desde julho de 2013, devido ao *status* hiperendêmico da esporotricose no Rio de Janeiro, a doença se tornou de notificação

obrigatória no estado. Apenas no INI, unidade de referência no Rio de Janeiro, mais de 4.000 casos humanos e 4.000 casos felinos foram diagnosticados (GALHARDO *et al.*, 2015; GREMIÃO *et al.*, 2015).

SILVA e colaboradores (2012) relataram que o número de casos da epidemia no estado do Rio de Janeiro ultrapassou os cerca de 3.000 casos descritos na década de 1940 na África do Sul, uma vez que foi observado um aumento de 126,6% em relação a totalidade dos casos em 11 anos de estudo, o que então caracteriza esta endemia como a maior endemia mundial.

3.3.1.3 Notificação Compulsória

A esporotricose não é uma doença de notificação compulsória na maioria dos países, logo as informações sobre a incidência da doença não são bem conhecidas e estão limitadas aos dados gerados por publicações científicas (BARROS *et al.*, 2011). Somente no estado do Rio de Janeiro, os casos humanos apenas passaram a ser de notificação compulsória no ano de 2013, através da resolução SES nº 674 de 12 de junho de 2013. A notificação compulsória dos animais, que apresentavam esporotricose, foi através da portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014, no artigo 2º, parágrafo IV.

3.3.1.4 Gato: fonte de infecção

Dos casos humanos de esporotricose atendidos no INI/Fiocruz durante o período de 1997 a 2007, 65% possuíam gatos e dentre eles, 80,3% declararam terem sido infectados por estes animais (SILVA *et al.*, 2012). SCHUBACH e colaboradores (2012) acreditam que os gatos são os únicos animais que apresentam um potencial zoonótico importante em virtude da elevada quantidade de leveduras encontrada nas lesões,

facilitando assim, a transmissão pelo contato, através da arranhadura, mordedura ou até mesmo pelo contato com exsudato das lesões dos animais doentes. O isolamento do fungo proveniente das cavidades nasal e oral, fragmentos de unhas, exsudato de lesões cutâneas e mucosas, órgãos internos e sangue de gatos (SCHUBACH *et al.*, 2001; SCHUBACH *et al.*, 2003a; SCHUBACH *et al.*, 2003b; SCHUBACH *et al.*, 2004a; SCHUBACH *et al.*, 2004b), associado aos relatos de casos humanos de esporotricose (SCHUBACH *et al.*, 2008) e à alta equivalência genotípica demonstrada entre isolados felinos e isolados humanos com os quais os gatos se relacionam (REIS *et al.*, 2009), demonstram a importância do gato como fonte de infecção (SILVA *et al.*, 2012).

O resultado da endemia causada por *S. brasiliensis* no Rio de Janeiro pode ser considerado uma complexa interação patógeno-hospedeiro-ambiente, incluindo elevada susceptibilidade do gato e alta virulência do patógeno, comportamento dos gatos e recente introdução de *S. brasiliensis* a uma população de felinos urbanos (MONTENEGRO *et al.*, 2014).

3.3.1.5 Cães

Os cães não desempenham um papel importante na transmissão de *Sporothrix* sp., uma vez que até o final de 2009 não havia sido relatada a transmissão associada à esta espécie animal (BARROS *et al.*, 2010), provavelmente devido à baixa carga fúngica encontrada nas lesões cutâneas desses animais (SCHUBACH *et al.*, 2004a; SCHUBACH *et al.*, 2006).

3.3.1.6 Dados sócio-demográficos

Na análise espacial da distribuição geográfica da doença na região metropolitana do Rio de Janeiro, observa-se uma elevada densidade de casos ao redor da capital fluminense, extrapolando seus limites para municípios vizinhos, denominado cinturão

de esporotricose, indicando que esta é uma epidemia urbana (BARROS *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2012).

A análise de dados epidemiológicos e socioambientais demonstrou que a epidemia apresenta um perfil característico. Além da distribuição pela região metropolitana do Rio de Janeiro, esta acomete principalmente regiões com baixo nível socioeconômico e dificuldades ambientais além da presença do gato (GALHARDO *et al.*, 2015, BARROS *et al.*, 2010). Porém, a epidemia não está relacionada ao nível de escolaridade, mas influenciada pelos hábitos e estilos de vida da população (SILVA *et al.*, 2012). No Brasil, em especial no estado do Rio de Janeiro, o grupo de risco para aquisição da esporotricose são mulheres acima de 40 anos, donas de casa e que cuidam de gatos com esporotricose. (BARROS *et al.*, 2008; SCHUBACH *et al.*, 2008). Algumas profissões são consideradas como grupo de risco ocupacional, como agricultores, floricultores jardineiros, mineiros, fazendeiros e outras que apresentem facilidade de exposição ao fungo (RIPPON, 1988) e posteriormente foram incluídos nesse grupo os médicos veterinários (BARROS *et al.*, 2002; YEGNESWARAN *et al.*, 2009).

A esporotricose felina tem sido registrada em outros estados do Brasil ao longo dos últimos 20 anos, especialmente no Rio Grande do Sul (NOBRE *et al.*, 2001, OLIVEIRA *et al.*, 2011; MADRID *et al.*, 2012) e São Paulo (BORGES *et al.*, 2013, RODRIGUES *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 2014). No entanto, até o momento, o número de casos descritos nos dois maiores estudos nessas regiões, são inferiores ao que é descrito no Rio de Janeiro, destacando a gravidade da situação epidemiológica neste último estado brasileiro (PEREIRA *et al.*, 2014).

3.3.1.7 Controle

Segundo PEREIRA e colaboradores (2014), a principal dificuldade para o controle desta epidemia é a falta de um programa de saúde pública que invista no controle da doença animal. Além disso, foram considerados como fatores de entrave, o abandono de animais doentes e o destino inadequado das carcaças de animais mortos, além do abandono do tratamento, o que pode levar a uma recorrência da doença impondo dificuldades no processo de cura desses animais, podendo contribuir para a manutenção da endemia no Rio de Janeiro (BARROS *et al.*, 2010).

3.3.2 Zoonose

A doença acomete os humanos e uma grande variedade de animais, entre eles, ratos, tatus, cães e outros animais estão relacionados à transmissão zoonótica desse fungo (KAUFFMAN, 1999). Entretanto, os gatos são os principais animais envolvidos na transmissão do *Sporothrix* sp. para o ser humano (SCHUBACH *et al.*, 2004a, PEREIRA *et al.*, 2011). Alguns autores acreditam que os gatos são os únicos animais que apresentam um potencial zoonótico importante em virtude da elevada quantidade de leveduras encontrada nas lesões (READ & SPERLING, 1982; TABOADA, 2000).

O isolamento de *S. schenckii* proveniente das cavidades nasal e oral, fragmentos de unhas, exsudato de lesões cutâneas e mucosas, órgãos internos e sangue de gatos (SCHUBACH *et al.*, 2004b; SCHUBACH *et al.*, 2004a), associado aos relatos de casos humanos de esporotricose (SCHUBACH *et al.*, 2008), demonstram a importância do gato como fonte de infecção desse fungo (BARROS *et al.*, 2004).

3.4 Esporotricose felina

No início do século XX foi descrita a susceptibilidade experimental do gato à *S. schenckii* (BEURMANN & GOUGEROT, 1906). Geralmente, os gatos adquirem a infecção após brigas com outros gatos infectados, quando ocorre a inoculação do *S. schenckii* através da pele (SCHUBACH *et al.*, 2004a).

3.4.1 Aspectos clínicos

A infecção em gatos pode iniciar de forma subclínica e evoluir para lesões cutâneas múltiplas e comprometimento sistêmico fatal, associado ou não a sinais extracutâneos (SCHUBACH *et al.*, 2004a).

As formas clínicas da esporotricose em seres humanos são classificadas em: cutânea-fixa, linfocutânea, mucocutânea, extracutânea e disseminada (RIPPON, 1988); entretanto, essa classificação torna-se de difícil aplicação na esporotricose felina, pois os gatos podem apresentar mais de uma forma da doença concomitantemente (SCHUBACH *et al.*, 2004a).

Geralmente a esporotricose em gatos assemelha-se à forma disseminada da doença em seres humanos imunocomprometidos (SCHUBACH *et al.*, 2004b). No entanto, em gatos com esporotricose co-infectados ou não com os vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e da Leucemia Felina (FeLV), até o momento, não foram observadas diferenças significantes na resposta terapêutica, gravidade da doença ou carga fúngica (GREMIÃO *et al.*, 2015, MIRANDA *et al.*, 2013, PEREIRA *et al.*, 2010).

As lesões cutâneas mais frequentes em gatos são nódulos e úlceras (recobertas ou não por crostas), que podem evoluir até necrose com exposição de músculos e ossos (SCOTT *et al.*, 1996). A maioria dessas lesões está localizada na cabeça, extremidades

dos membros e cauda (ROSSER & DUNSTAN, 2006). SCHUBACH e colaboradores (2004a) relataram que cerca de 40% (n=347) dos gatos com esporotricose apresentavam lesões cutâneas em três ou mais localizações não contíguas. Linfadenite, linfangite nodular ascendente e lesões mucosas podem estar presentes nos gatos com esporotricose. Febre, desidratação, perda de peso e anorexia também podem ser observadas (SCHUBACH *et al.*, 2004a). A presença de sinais respiratórios é frequente em gatos com esporotricose ((SCHUBACH *et al.*, 2004a); LEME *et al.*, 2007; IACHINI, 2009; CROTHERS *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2010), principalmente os espirros, que podem estar associados a lesões localizadas na região nasal, inclusive em mucosa (SCHUBACH *et al.*, 2004a). Estudos sugerem que a presença de sinais respiratórios, pode em alguns casos, preceder a observação de lesões cutâneas em gatos (SCHUBACH *et al.*, 2002; SCHUBACH *et al.*, 2004a).

3.4.2 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo da esporotricose requer o isolamento do fungo em meio de cultura. Nos gatos, os exames citopatológico e histopatológico, são úteis no diagnóstico dessa micose (SILVA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2011).

De acordo com o tipo e a localização da lesão, diferentes amostras biológicas podem ser coletadas para isolamento do fungo (SCHUBACH *et al.*, 2002). Secreção nasal e exsudato de lesões cutâneas ou mucosas podem ser obtidas através de um *swab* estéril (SCHUBACH *et al.*, 2003a). Também podem ser enviados para a cultura, fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas obtidos por biópsia, aspirado de conteúdo purulento ou seropurulento proveniente de abscesso não ulcerado (SCHUBACH *et al.*, 2004a), sangue (SCHUBACH *et al.*, 2003b) e lavado broncoalveolar (LEME *et al.*, 2007).

3.4.2.1 Cultura

Este método de diagnóstico é considerado padrão de referência para diagnóstico da esporotricose. *Sporothrix* sp. na natureza ou em meio de cultura rico em nutrientes, a temperatura ambiente ou a 25°C, cresce na forma filamentosa; enquanto que em parasitismo ou em meio de cultura a 37°C, encontra-se na forma de levedura (KWON-CHUNG & BENNET, 1992). A cultura pode ser realizada inicialmente em meio de ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol ou ágar Mycosel a 25°C por cinco a sete dias, podendo as vezes ser um tempo maior. Após o crescimento de um fungo hialino na forma filamentosa que com o tempo adquire a capacidade de produzir melanina, este é inoculado em meio de ágar infusão de cérebro e coração (BHIA) e incubado a 37°C por cinco a sete dias, visando à conversão do fungo para a forma leveduriforme, com aspecto cremoso e coloração amarelada, concluindo-se assim o diagnóstico micológico (RIPPON, 1988; BARROS *et al.*, 2011). As culturas que serão consideradas negativas devem ser mantidas por pelo menos 4 semanas (RIPPON, 1988). Para a caracterização das espécies torna-se necessária a aplicação de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

3.4.2.2 Exame citopatológico (CPT)

A citopatologia é a análise morfológica de células de um tecido sem a presença de arquitetura tecidual e tem como objetivo auxiliar no diagnóstico e prognóstico da doença. É um método amplamente utilizado para diagnosticar e/ou diferenciar doenças infecciosas, inflamatórias, proliferativas e neoplásicas (SILVA *et al.*, 2015; COWELL, 2008) e utilizadas com frequência no diagnóstico presuntivo da esporotricose felina (PEREIRA *et al.*, 2011; COWELL *et al.*, 2008). É um exame de simples execução, baixo custo, rápido, que para o diagnóstico da esporotricose felina não exige treinamento técnico sofisticado ou estrutura laboratorial complexa. As colorações do

tipo Romanowsky, como o método panótico rápido, são rotineiramente utilizadas (PEREIRA *et al.*, 2011).

O exame é realizado em uma lâmina de vidro previamente limpa, desengordurada e seca, que é pressionada na superfície da lesão após a retirada da crosta se a mesma estiver presente. A coloração utilizada para visualização do agente etiológico é do tipo Romanowsky, onde então são observadas estruturas ovaladas ou fusiformes (em forma de charuto), apresentando entre 3 a 9 μ de comprimento e 1 a 3 μ de largura e coloração variando de azul claro a médio com imperceptível núcleo arroxeadado, livres ou no interior de macrófagos (WELSH, 2003).

As lesões cutâneas dos gatos com esporotricose apresentam uma maior riqueza parasitária quando comparada as lesões de cães e seres humanos doentes, sendo possível observar com frequência estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* sp. (SILVA *et al.*, 2015). O elevado número de leveduras observadas no exame citopatológico também é referido por outros autores o que facilita o diagnóstico presuntivo da esporotricose (SILVA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2011). PEREIRA e colaboradores (2011), avaliaram 806 casos de esporotricose felina confirmados em cultura, dos quais 636 foram positivos no exame citopatológico, cuja sensibilidade foi 78,9%, corroborando também os achados de SILVA e colaboradores (2015) no qual obteve 84,9% (n=244) de sensibilidade neste exame. No entanto, em algumas situações, as estruturas leveduriformes do *Sporothrix* spp. observadas no exame citopatológico podem ser confundidas com leveduras de outras espécies, tais como *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* podendo levar ao erro por este método de diagnóstico (CLINKENBEARD, 1991). A ocorrência de casos falsos positivo e negativo pode estar relacionada à observação de artefatos de técnica e baixa carga fúngica, respectivamente, encontrada nas lesões de animais classificados como L1 e L2,

lesão em um local e lesões em dois locais não contíguos, respectivamente. Os resultados deste estudo reforçam que em regiões epidêmicas de esporotricose, nas quais existem dificuldades para realização da cultura fúngica devido à escassez de recursos financeiros ou por alguma impossibilidade técnica, o uso do exame citopatológico está indicado como uma ferramenta diagnóstica viável, capaz de identificar aproximadamente 80% dos casos positivos e iniciar precocemente as medidas preventivas e de controle dessa zoonose.

3.4.2.3 Histopatologia

O exame histopatológico é uma ferramenta auxiliar para o diagnóstico, tendo importância quando o isolamento do agente etiológico em meio de cultura não pode ser realizado (MIRANDA *et al.*, 2013; RODRIGUEZ & SARMIENTO, 1998; BARROS *et al.*, 2005), sendo utilizado com frequência no diagnóstico da esporotricose felina (SCHUBACH *et al.*, 2003a; CROTHERS *et al.*, 2009). Fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas, obtidos através de biópsia, e armazenados em frascos contendo formalina tamponada a 10%, podem ser enviados para esse exame (SCHUBACH *et al.*, 2003a). A coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS), hematoxilina & eosina (HE) e a impregnação pela prata de Grocott (IPG), possibilita definir a etiologia fúngica em 62 % dos casos (SCHUBACH *et al.*, 2004a). Ao exame, as lesões cutâneas dos gatos revelam um infiltrado inflamatório na derme, composto por células mononucleares e polimorfonucleares, predominantemente macrófagos e neutrófilos, podendo ser visualizadas estruturas leveduriformes redondas, ovais ou em forma de charuto, algumas vezes exibindo brotamento, com diâmetro medindo 5 – 7 μ (SCHUBACH *et al.*, 2003a). O exame histológico apresenta grande valor na análise diagnóstica diferencial, pois permite realizar diagnóstico de outras doenças ulcerosas cutâneas, principalmente neoplásicas e também infecciosas. Porém, o exame histopatológico pode ser

influenciado por fatores relacionados à amostra, técnica de processamento e ao observador (SANTOS *et al.*, 2007).

Na esporotricose felina é possível observar uma riqueza parasitária nas lesões. MIRANDA e colaboradores (2011) detectaram o fungo em 79 casos (94.0%) pela técnica da impregnação pela Prata de Grocott e um alto percentual foi observado em gatos com múltiplas lesões.

A carga fúngica nas lesões está diretamente relacionada com o número de neutrófilos nos animais e em humanos. Na esporotricose humana, o número acentuado está relacionado a pacientes com o maior número de lesões e com o tempo de tratamento longo. (MORGADO *et al.*, 2011).

3.4.2.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

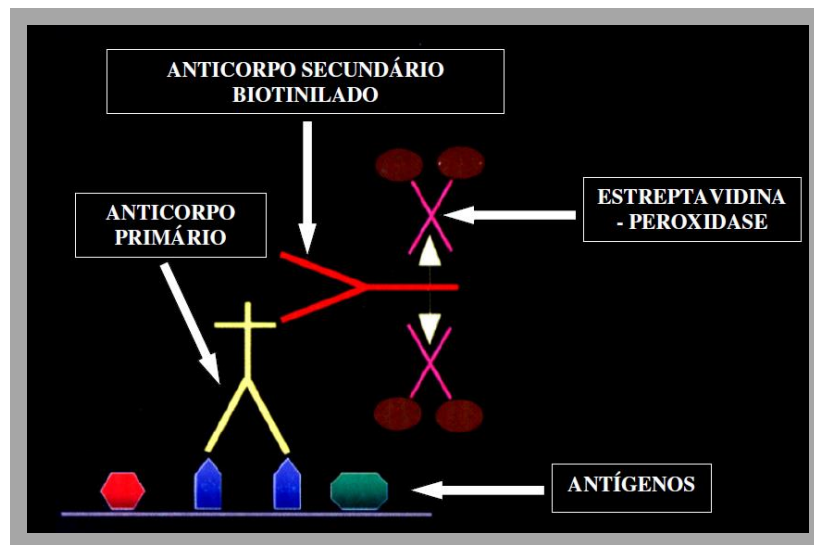
É um método imunológico que permite a demonstração de antígenos presentes no tecido, por meio da utilização de anticorpos primários específicos. A positividade deste método é baseada na ocorrência de ligações antígeno-anticorpo, demonstradas pela formação de cor no tecido, visível ao microscópio óptico (RAMOS-VARA, 2005).

Estes sistemas utilizam enzimas que, em presença do respectivo substrato e de um cromógeno, produzem cor no local onde ocorre a ligação antígeno-anticorpo. O sistema estreptavidina-peroxidase (Figura 1) é considerado especialmente sensível e consiste na aplicação de um anticorpo secundário biotilado, que reconhece o anticorpo primário ligado ao antígeno. A seguir, um reagente contendo moléculas de estreptavidina conjugadas à enzima peroxidase é adicionado. A estreptavidina se liga com avidéz à biotina do anticorpo secundário. A formação de cor ocorre quando o

peróxido de hidrogênio, substrato da enzima peroxidase, é adicionado à reação juntamente com o cromógeno (RAMOS-VARA, 2005).

O método é rápido e com elevada eficácia e, uma vez que utiliza anticorpos específicos, promove um diagnóstico mais preciso do que realizado pela análise da HE ou técnicas histoquímicas especiais, baseado apenas em características morfológicas do agente (SCHWARZ, 1982). Adicionalmente, a IHQ permite a detecção de antígenos de *Sporothrix* sp. em lesões de esporotricose canina e humana (MARQUES *et al.*, 1992; MIRANDA *et al.*, 2011), apresentando nesta última alta sensibilidade em relação às demais técnicas histoquímicas (MARQUES *et al.*, 1992; RODRIGUEZ & SARMIENTO, 1998). As leveduras de *Sporothrix* sp., mesmo em quantidade escassa, são de fácil visualização pela IHQ, uma vez que assumem uma marcação castanha, contrastando com o fundo tecidual (MOSKOWITZ *et al.*, 1986; MARQUES *et al.*, 1992). A IHQ pode ser combinada aos demais métodos, garantindo maior sensibilidade aos resultados (MIRANDA *et al.*, 2011). O encontro de antígenos em lesões sugestivas de esporotricose pode ser útil em casos em que não sejam observadas leveduras íntegras por meio das colorações especiais (MARQUES *et al.*, 1992). Contudo, o valor destes achados para o diagnóstico ainda deve ser discutido.

Figura 1: Reação de imuno-histoquímica. Método de estreptavidina-peroxidase. Fonte: (RAMOS-VARA, 2005).



3.4.2.5 Sorologia

O método de ensaio imunoenzimático (ELISA- “*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*”) pode ser utilizado como uma ferramenta de triagem devido sua sensibilidade e especificidade para a detecção de anticorpos de *Sporothrix* sp. no soro de gatos com esporotricose (FERNANDES *et al.*, 2011). Este método é considerado de fácil realização, rápido e barato, mas sua aplicação na rotina diagnóstica ainda não foi estabelecida.

3.4.2.6 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

É uma técnica baseada no diagnóstico molecular que pode ser utilizada no diagnóstico da esporotricose, e quando disponível, pode ser uma alternativa ao diagnóstico em casos específicos. KANO e colaboradores (2001) relataram o uso do gene da quitina-sintetase 1 como alvo para a identificação de genes de *S. schenckii* a partir de isolados clínicos de humanos e animais. HU e colaboradores (2003) descreveram, através de um ensaio realizado em camundongos, uma alta sensibilidade e

especificidade da PCR aninhada, indicando ser um diagnóstico rápido e com precisão suficiente para ser clinicamente útil em pacientes com esporotricose. KANBE e colaboradores (2005) relataram que a técnica de amplificação por PCR utilizando iniciadores específicos para o gene de DNA-topoisomerase II é uma ferramenta útil na identificação rápida de *S. schenckii*.

RODRIGUES e colaboradores (2015) em seu estudo, desenvolveram *primers* específicos para a identificação das espécies de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida*, e *Ophiostoma Stenocereus* a partir de isolados de cultura, além disso, detectou com sucesso DNA de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* em amostras de tecidos derivados de um modelo murino com esporotricose disseminada, concluindo que estes *primers* espécie-específicos podem ser aplicados na epidemiologia, diagnóstico clínico e estudos experimentais da esporotricose e que, as melhorias nos sistemas primários de diagnóstico e vigilância poderiam facilitar a identificação e o rápido controle de futuros surtos.

3.4.3 Diagnóstico diferencial

Na esporotricose felina os sinais clínicos são inespecíficos e se faz necessário a realização de um diagnóstico diferencial para outras doenças como piodermites, micobacterioses, nocardiose, actinomicose, criptococose, complexo granuloma eosinofílico, corpo estranho, neoplasia (principalmente carcinoma de células escamosas, carcinoma e linfoma), doenças imuno mediadas (lupus eritematoso), doenças alérgicas graves, entre outros. Deve-se levar em consideração os sinais clínicos, o histórico do paciente e os aspectos epidemiológicos. No Rio de Janeiro, o

principal diagnóstico diferencial, especialmente nos cães e humanos, é a leishmaniose tegumentar americana (SANTOS *et al.*, 2007).

3.4.4 Terapêutica

Diferentes fármacos antifúngicos têm sido utilizados no tratamento da esporotricose em gatos (SCHUBACH *et al.*, 2012). O azólico itraconazol é considerado o fármaco de eleição nos casos de esporotricose humana (KAUFFMAN *et al.*, 2007) e felina (PEREIRA *et al.*, 2010), devido à sua eficácia e segurança em comparação com os demais antifúngicos. O uso de iodetos, anfotericina B, termoterapia local, criocirurgia e remoção cirúrgica das lesões cutâneas, representam outras opções terapêuticas (SOUZA *et al.*, 2016; REIS *et al.*, 2012; GREMIÃO *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2009; HONSE *et al.*, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2011).

O tratamento da esporotricose felina, diferente do que é observado nos seres humanos, em muitos casos representa um desafio. A adesão do responsável pelo gato ao tratamento é baixa e o abandono é frequente, e ocorre principalmente no momento no qual o responsável pelo gato observa o início do processo cicatricial das lesões cutâneas (CHAVES *et al.*, 2013). A cura, a falência terapêutica, a recorrência e os efeitos adversos ocorrem independentes do esquema terapêutico utilizado, pois, o tempo de tratamento é longo e a administração dos fármacos por via oral é problemática (PEREIRA *et al.*, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2015).

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

O estudo em questão foi dividido em duas etapas. Na primeira etapa foi conduzido um estudo longitudinal retrospectivo e na segunda foi realizado um estudo longitudinal prospectivo.

4.2 Casuística

4.2.1 População do estudo

A população alvo foi constituída de gatos com esporotricose atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo)/INI/Fiocruz, que preencherem os critérios de elegibilidade abaixo descritos.

4.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

4.2.2.1 Critérios de inclusão

- Gatos apresentando lesão cutânea ulcerada com diagnóstico definitivo de esporotricose através do isolamento de *Sporothrix* sp. em meio de cultura;
- Gatos que após o diagnóstico definitivo de esporotricose iniciaram o tratamento com itraconazol por via oral no Lapclin-dermzoo/INI;
- Gatos cujos responsáveis aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

4.2.2.2 Critérios de exclusão

- Gatos que foram previamente tratados com substâncias antifúngicas sistêmicas ou tópicas;
- Diagnóstico clínico de gestação ou gatas em lactação;
- Uso de terapia concomitante não permitida com anti-neoplásicos e corticosteróides;

4.2.3 Cálculo amostral

Na primeira etapa do estudo foram utilizadas amostras clínicas de 184 gatos previamente coletadas no âmbito do projeto “Estudo terapêutico da esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro” com intuito de padronizar a reação de imuno-histoquímica e comparar a sensibilidade dos exames citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico no diagnóstico da esporotricose com a cultura.

Na segunda etapa foi realizado o cálculo amostral baseado na população infinita de gatos, tomando como proporção 50% da população, erro amostral de 10% e nível de significância de 95%, resultando num tamanho amostral mínimo de 97 gatos para verificação do tempo de positividade do exame citopatológico e cultura durante o tratamento antifúngico.

4.2.5 Plano de recrutamento

Os responsáveis pelos gatos que preencheram os critérios de elegibilidade foram convidados a participar do estudo. Após a concordância dos responsáveis, por meio da assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), os gatos foram submetidos ao protocolo do estudo.

4.2.6 Critérios para suspender ou encerrar o estudo ou retirar voluntários

- Por decisão do responsável pelo gato;

- Não comparecimento ou não cicatrização da lesão(ões) inicial(is) em duas consultas de seguimento mensais consecutivas;
- Utilização de terapia não permitida com corticoides, antineoplásicos e outros antifúngicos após a inclusão no estudo;
- Gato que ultrapassar 28 semanas de tratamento com itraconazol.

4.3 Materiais, procedimentos e técnicas

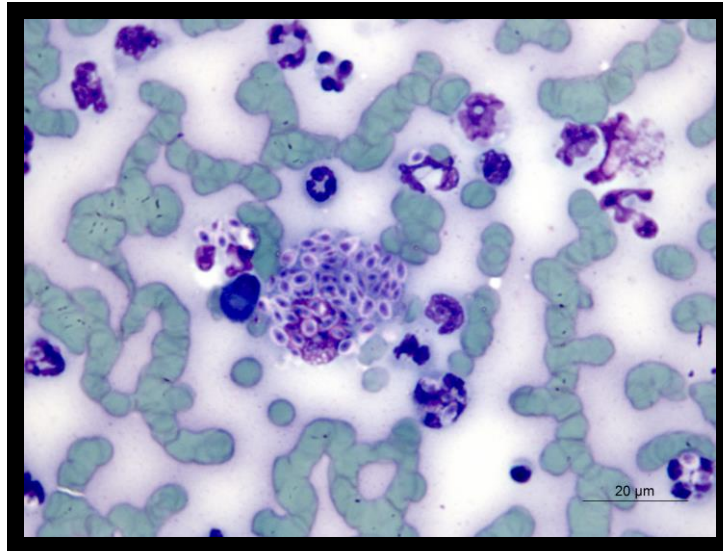
4.3.1 Primeira Etapa

Todas as amostras incluídas nessa etapa do estudo são provenientes de gatos com diagnóstico definitivo de esporotricose através do isolamento em cultura e com aprovação pelo CEUA/Fiocruz (L-041/06).

4.3.1.1 Exame citopatológico

As lâminas de vidro contendo as impressões do exsudato proveniente de lesões cutâneas ulceradas de gatos e coradas pelo método panótico rápido foram identificadas e armazenadas em caixas apropriadas. Posteriormente, foi realizada a observação destas em microscópio óptico utilizando-se a objetiva de imersão de 100X procurando-se estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* sp. em toda a superfície da lâmina. O resultado desse exame foi considerado positivo quando visualizadas as estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* sp (Figura 2).

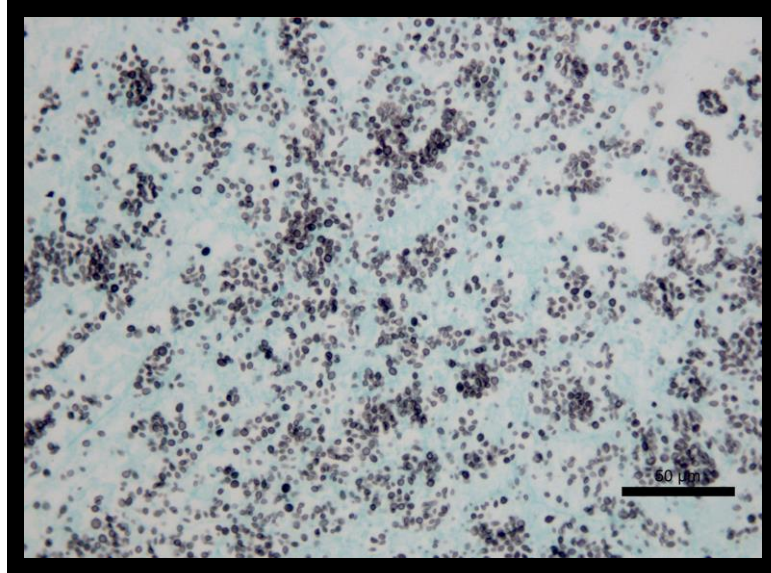
Figura 2: Exame citopatológico de pele ulcerada apresentando estruturas leveduriformes compatíveis com espécies do complexo *Sporothrix sp.* formas arredondadas, formas de charuto e brotamentos no interior de macrófagos e/ou neutrófilos. Panótico Rápido. 100x.



4.3.1.2 Exame histopatológico

As lâminas de vidro contendo o corte histológico proveniente de lesões cutâneas ulceradas de gatos com esporotricose e coradas pelo H&E, PAS e IPG foram identificadas e armazenadas no Serviço de Anatomia Patológica/INI/Fiocruz. Foi realizada a observação destas em microscópio óptico procurando-se estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix sp.* No estudo histopatológico, na IPG, foram considerados positivos os casos nos quais se observaram estruturas leveduriformes (Figura 3) e negativos quando não se observaram estruturas leveduriformes após análise de cerca de 50 campos microscópicos de grande aumento (400x).

Figura 3: Biópsia de pele ulcerada apresentando grande quantidade de leveduras de *Sporothrix* sp. Impregnação pela Prata de Grocott, 40 x.



4.3.1.3 Exame imuno-histoquímico (IHQ)

Os blocos de parafina foram submetidos a cortes de 5 μm em micrótomo em lâminas silanizadas (Erviagas, ERV – SF PLUS®). Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol à 60° C durante 20 minutos e, a seguir, à temperatura ambiente, também por 20 minutos, e em imersões sequenciais. Depois disso, foi procedida à re-hidratação do tecido em imersões sequenciais em álcool a concentrações decrescentes (100% a 70%) e banho em água corrente por dez minutos.

A inibição da peroxidase endógena foi realizada com solução de peróxido de hidrogênio 30% (Merck) na concentração v/v de 0,4 mL/100mL em metanol (Quimex) durante 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente em água corrente por 15 minutos. Depois disso, as lâminas foram submetidas a três lavagens sequências de cinco minutos em tampão TBS (Tris-Buffered-Saline – TBS, pH 7,6, Dako Corporation – S3001).

A inibição de reações inespecíficas foi realizada com soro normal de suíno (Novo Castra, NCL-S-SERUM) em albumina sérica bovina (BSA) (Sigma®) 1,5% a concentração de 1:20 durante 20 minutos e, em seguida, com solução de leite em pó (Molico®) na concentração m/v de 0,1 g/ml em BSA (3%) durante 40 minutos. Entre as duas incubações, foi realizada lavagem em tampão TBS.

Os cortes foram incubados com o soro policlonal anti-*Sporothrix* sp. diluído em BSA 1,5% em câmara úmida *overnight* a 4°C. Como controle negativo para reações inespecíficas, cortes histológicos do mesmo caso foram incubados com soro normal de coelho (DakoCytomation, Normal Rabbit Serum – X0902) na mesma diluição. Cortes histológicos adicionais também foram incubados apenas com BSA como controle negativo para biotina e peroxidase endógenas. O soro realizado foi na diluição 1:4000.

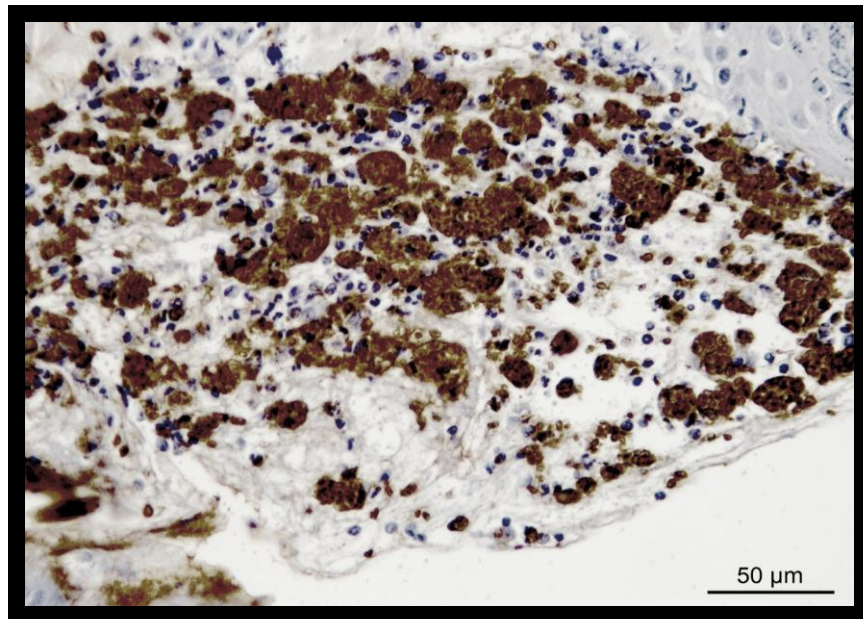
A seguir, os cortes foram lavados em TBS e procederam-se incubações seqüenciais de 25 minutos com anticorpo secundário biotilado universal e com o conjugado estreptavidina-peroxidase (DakoCytomation, LSAB⁺ System Kit – K0690), com lavagens em TBS após cada incubação.

Para a revelação, uma pastilha do cromógeno diaminobenzidina (DAB – DAB Tablets, Dako Corporation, S3000) foi diluída em 10 mL de tampão TBS e 1 mL desta solução com 7,5 µL de peróxido de hidrogênio 3% foi utilizado. A revelação foi controlada ao microscópio óptico (Nikon E200), em objetiva de 10x, pelo controle positivo, interrompendo-se a reação com água destilada no momento em que as leveduras, acastanhadas, se destacavam no tecido (Figura 4).

Depois de lavados em água corrente por três minutos e contra-corados com hematoxilina de Mayer, os cortes foram banhados rapidamente em água destilada e, a seguir, lavados em água corrente por três minutos.

A desidratação foi realizada por imersões sequenciais em álcool a concentrações crescentes (70% a 100%), para posterior passagem por xilol, montagem das lâminas com lamínula e meio de montagem, e visualização em microscópio óptico.

Figura 4: Esporotricose felina. Fragmento de pele ulcerada. Numerosas leveduras e antígenos intracelulares de *Sporothrix* sp. marcadas em castanho. Imuno-histoquímica anti-*Sporothrix* sp. 40x.



4.3.2 Segunda Etapa

Nessa etapa, foi estudado o tempo de diagnóstico positivo no exame citopatológico e no isolamento em cultura durante o tratamento com itraconazol oral na dose de 100mg/gato/dia. Os procedimentos desta etapa foram aprovados pela CEUA/Fiocruz (L69/2012).

4.3.2.1 Avaliação Clínica

Os gatos foram submetidos a exame clínico geral e dermatológico, quando foram avaliados: estado geral, lesões (tipo, localização e número), sinais extracutâneos, e tempo de evolução dos sinais clínicos antes da consulta inicial. De acordo com a o

número e a distribuição das lesões cutâneas, os gatos foram divididos em três grupos: L1, L2 e L3. No grupo L1, foram incluídos os gatos que apresentaram lesão (ões) em apenas uma localização anatômica; no grupo L2, aqueles que apresentaram lesões em duas localizações não contíguas; e no grupo L3 os que exibiram lesões em três ou mais localizações não contíguas (Schubach et al., 2004).

4.3.2.2 Exame citopatológico (CPT)

Para o exame citopatológico foram utilizadas lâminas de microscopia, previamente limpas e secas. O procedimento de coleta das amostras consistiu em três impressões sequenciais da lâmina sobre a lesão preferencialmente de maior diâmetro. A lâmina foi corada pelo Panótico rápido (Instant Prov; Newprov), uma coloração do tipo *Romanowsky* similar ao DiffQuik, seguindo às instruções do fabricante. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico na objetiva de imersão de 100x. O resultado foi considerado positivo quando pelo menos uma estrutura leveduriforme sugestivas de *Sporothrix* sp. foi observada. A carga fúngica foi determinada por meio da média do número de estruturas leveduriformes observadas em três campos microscópicos (100x), de cada uma das três impressões.

4.3.2.3 Cultura micológica (CM)

Concomitantemente, foi realizada a coleta do material da mesma lesão ulcerada utilizando um swab estéril para a cultura fúngica. As amostras foram semeadas em ágar dextrose Sabouraud com cloranfenicol e ágar Mycobiotic agar (Difco), incubados a 25°C e observados por 4 semanas. Os isolados foram repicados em meio ágar Batata Dextrose a 25°C e o dimorfismo foi demonstrado pela conversão a 37°C em meio Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHIA) (RIPPON, 1988; WERNER & WERNER, 1994).

4.3.2.4 Tratamento e seguimento do paciente

As consultas de seguimento foram realizadas a cada quatro semanas durante 12 semanas de tratamento antifúngico com itraconazol. O protocolo previamente descrito foi novamente empregado para coleta do exsudato da mesma lesão ulcerada investigada no primeiro atendimento. Nas lesões nas quais foi observada a cicatrização, a coleta não foi realizada.

Os gatos sob tratamento antifúngico que não compareceram às consultas de seguimento foram excluídos do estudo. Os pacientes nos quais a cura clínica não ocorreu durante o período de seguimento aqui descrito permaneceram em acompanhamento clínico e terapêutico no Lapclin-Dermzoo. Ao fim do tratamento com itraconazol, os o desfecho dos gatos foi descrito como: cura clínica, falência terapêutica e óbito.

4.4 Plano de Análise

Todos os dados foram armazenados e posteriormente analisados no *software* SPSS versão 16. Foram calculadas as sensibilidades dos exames citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico utilizando o *software* citado anteriormente. Foram descritas as frequências simples das variáveis categóricas (sexo, distribuição das lesões e visualização de estruturas leveduriformes nos exames propostos) e as medidas de tendência central e dispersão das variáveis quantitativas contínuas (idade, tempo de positividade dos exames micológicos durante o tratamento, número de estruturas leveduriformes observadas no exame citopatológico antes e durante o tratamento).

5. RESULTADOS

5.1 Capítulo 1

MANUSCRITO 1 (SUBMETIDO) – Journal of Feline Medicine and Surgery

Standardization of the immunohistochemical assay for detecting *Sporothrix* spp. in feline tissue and the sensitivity of three different methods for diagnosing sporotrichosis in cats

O objetivo desse artigo foi descrever a padronização da reação de imunohistoquímica para o diagnóstico na esporotricose felina e comparar os exames citopatológico, histopatológico e imuno-histoquímico no diagnóstico da esporotricose felina, utilizando o cultivo fúngico como teste padrão de referência, mostrando a importância de métodos diagnósticos como alternativa à cultura.

Este artigo responde aos dois primeiros objetivos específicos desta tese.

27-Jan-2016

Dear Mrs. Silva:

Your manuscript entitled "Standardization of the immunohistochemical assay for detecting *Sporothrix* spp. in feline tissue and the sensitivity of three different methods for diagnosing sporotrichosis in cats" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Feline Medicine and Surgery.

Your manuscript ID is JFMS-16-0014.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jfms>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Feline Medicine and Surgery.

Sincerely,
Journal of Feline Medicine and Surgery Editorial Office

Standardization of the immunohistochemical assay for detecting *Sporothrix* spp. in feline tissue and the sensitivity of three different methods for diagnosing sporotrichosis in cats

Journal:	<i>Journal of Feline Medicine and Surgery</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Silva, Jéssica; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Micologia; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos Miranda, Luisa Helena; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos Menezes, Rodrigo; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos Gremião, Isabella; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos Oliveira, Raquel; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Epidemiologia Clínica Vieira, Scheilla Maria; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos Conceição-Silva, Fátima da; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz/Laboratório de Imunoparasitologia Ferreiro, Laerte; Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Laboratório de Micologia Pereira, Sandro; Fundacao Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia/Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatoozonoses em Animais Domésticos
Keywords:	feline, cytopathology, histopathology, immunohistochemistry, sporotrichosis, diagnosis
Abstract:	Objectives The high potential of cats for transmitting <i>Sporothrix</i> spp. and the increasing numbers of reports of sporotrichosis from different geographic areas highlight the importance of alternative diagnostic tools. Particularly when the clinical suspicion of sporotrichosis is not raised at the time of the sample collection, the retrospective analysis of formalin-fixed paraffin-embedded tissues are highly desirable. In this study, the standardization of the immunohistochemical assay for diagnosing feline sporotrichosis is described for the first time and the evaluation of its sensitivity is assessed through blinded comparisons with cytopathological and histopathological examinations. Methods One hundred and eighty-four cats with culture-confirmed

	<p>sporotrichosis were subjected to collection of skin ulcer exudates for cytopathology (Quick Panoptic) and of tissue for histopathology (Grocott silver stain) and immunohistochemistry with an anti-<i>Sporothrix</i> sp. antiserum. For the standardization of immunohistochemistry, the antiserum was initially titrated in order to assess its optimal dilution.</p> <p>Results The standardization of immunohistochemistry enabled the detection of yeast-like cells in lesions of cats in this study and the optimal dilution of the anti-<i>Sporothrix</i> sp. antiserum was 1:4000. The sensitivities of Grocott silver stain, immunohistochemistry and cytopathological examination were respectively 91.3%, 88.3% and 87.0%.</p> <p>Immunohistochemistry detected yeast-like cells in two cases that tested negative through the two other techniques and in four cases that tested negative through Grocott silver stain.</p> <p>Conclusions and relevance Immunohistochemistry showed high sensitivity for diagnosing feline sporotrichosis and is considered to be a specific method, since the detection of the agent is based on antigen-antibody binding. Therefore, its employment as alternative should be considered. The combination of the three methods herein described enabled the diagnosis of sporotrichosis in almost 100% of the cases, pointing to the need of their implementation as regular tools, notably when fungal culture is not available.</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

Peer Review

32 **Standardization of the immunohistochemical assay for detecting *Sporothrix* spp. in feline**
33 **tissue and the sensitivity of three different methods for diagnosing sporotrichosis in cats**
34

35 Jéssica Nunes Silva ^{1,2}, Luisa Helena Monteiro de Miranda ², Rodrigo Caldas Menezes ²,
36 Isabella Dib Ferreira Gremião ², Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira ³, Scheilla
37 Maria Mesquita Vieira ², Fátima da Conceição-Silva ⁴, Laerte Ferreira ¹, Sandro Antonio
38 Pereira ²

39

40 1- Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio
41 Grande do Sul.

42 2- Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos,
43 Instituto Nacional de Infectologia/Fundação Oswaldo Cruz.

44 3- Laboratório de Epidemiologia Clínica, Instituto Nacional de Infectologia/Fundação
45 Oswaldo Cruz

46 4- Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz/Fundação Oswaldo Cruz

47

48 **Corresponding author:**

49 Jéssica Nunes Silva, DVM, MSc

50 Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do
51 Sul

52 Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Rio Grande do Sul, Brazil.

53 E-mail: jessicanunes7@gmail.com

54

55 **Keywords:** cytopathology; diagnosis; feline; histopathology; immunohistochemistry;
56 sporotrichosis.

57

58

1 **Standardization of the immunohistochemical assay for detecting *Sporothrix* spp. in feline**
2 **tissue and the sensitivity of three different methods for diagnosing sporotrichosis in cats**
3 Jéssica Nunes Silva, Luisa Helena Monteiro de Miranda, Rodrigo Caldas Menezes, Isabella Dib
4 Ferreira Gremião, Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, Scheilla Maria Mesquita
5 Vieira, Fátima da Conceição-Silva, Laerte Ferreira, Sandro Antonio Pereira

6 **Abstract**

7 *Objectives* The high potential of cats for transmitting *Sporothrix* spp. and the increasing
8 numbers of reports of sporotrichosis from different geographic areas highlight the importance of
9 alternative diagnostic tools. Particularly when the clinical suspicion of sporotrichosis is not
10 raised at the time of the sample collection, the retrospective analysis of formalin-fixed paraffin-
11 embedded tissues are highly desirable. In this study, the standardization of the
12 immunohistochemical assay for diagnosing feline sporotrichosis is described for the first time
13 and the evaluation of its sensitivity is assessed through blinded comparisons with
14 cytopathological and histopathological examinations. *Methods* One hundred and eighty-four
15 cats with culture-confirmed sporotrichosis were subjected to collection of skin ulcer exudates for
16 cytopathology (Quick Panoptic) and of tissue for histopathology (Grocott silver stain) and
17 immunohistochemistry with an anti-*Sporothrix* sp. antiserum. For the standardization of
18 immunohistochemistry, the antiserum was initially titrated in order to assess its optimal dilution.
19 *Results* The standardization of immunohistochemistry enabled the detection of yeast-like cells
20 in lesions of cats in this study and the optimal dilution of the anti-*Sporothrix* sp. antiserum was
21 1:4000. The sensitivities of Grocott silver stain, immunohistochemistry and cytopathological
22 examination were respectively 91.3%, 88.3% and 87.0%. Immunohistochemistry detected
23 yeast-like cells in two cases that tested negative through the two other techniques and in four
24 cases that tested negative through Grocott silver stain. *Conclusions and relevance*
25 Immunohistochemistry showed high sensitivity for diagnosing feline sporotrichosis and is
26 considered to be a specific method, since the detection of the agent is based on antigen-
27 antibody binding. Therefore, its employment as alternative should be considered. The
28 combination of the three methods herein described enabled the diagnosis of sporotrichosis in
29 almost 100% of the cases, pointing to the need of their implementation as regular tools, notably
30 when fungal culture is not available.

31

59 **Abstract**

60

61 *Objectives* The high potential of cats for transmitting *Sporothrix* spp. and the increasing
62 numbers of reports of sporotrichosis from different geographic areas highlight the importance of
63 alternative diagnostic tools. Particularly when the clinical suspicion of sporotrichosis is not
64 raised at the time of the sample collection, the retrospective analysis of formalin-fixed paraffin-
65 embedded tissues are highly desirable. In this study, the standardization of the
66 immunohistochemical assay for diagnosing feline sporotrichosis is described for the first time
67 and the evaluation of its sensitivity is assessed through blinded comparisons with
68 cytopathological and histopathological examinations.

69 *Methods* One hundred and eighty-four cats with culture-confirmed sporotrichosis were
70 subjected to collection of skin ulcer exudates for cytopathology (Quick Panoptic) and of tissue
71 for histopathology (Grocott silver stain) and immunohistochemistry with an anti-*Sporothrix* sp.
72 antiserum. For the standardization of immunohistochemistry, the antiserum was initially titrated
73 in order to assess its optimal dilution.

74 *Results* The standardization of immunohistochemistry enabled the detection of yeast-like cells
75 in lesions of cats in this study and the optimal dilution of the anti-*Sporothrix* sp. antiserum was
76 1:4000. The sensitivities of Grocott silver stain, immunohistochemistry and cytopathological
77 examination were respectively 91.3%, 88.3% and 87.0%. Immunohistochemistry detected
78 yeast-like cells in two cases that tested negative through the two other techniques and in four
79 cases that tested negative through Grocott silver stain.

80 *Conclusions and relevance* Immunohistochemistry showed high sensitivity for diagnosing feline
81 sporotrichosis and is considered to be a specific method, since the detection of the agent is
82 based on antigen-antibody binding. Therefore, its employment as alternative should be
83 considered. The combination of the three methods herein described enabled the diagnosis of
84 sporotrichosis in almost 100% of the cases, pointing to the need of their implementation as
85 regular tools, notably when fungal culture is not available.

86

87 Introduction

88

89 Sporotrichosis is caused by different species of thermodimorphic fungi within the
90 *Sporothrix schenckii* complex and has worldwide geographical distribution, with reports from all
91 continents¹. This disease has been reported to be an emerging health problem over the last two
92 decades because of increasing numbers of human and animal cases, changes to epidemiology
93 and case distribution, and multiple outbreaks. This highlights the need for efficient diagnostic
94 tools^{2,3}.

95 Transmission of *Sporothrix* spp. usually occurs by means of traumatic inoculation through
96 the skin and it is reported in a zoonotic form that is generally correlated with scratches and bites
97 from infected cats⁴. These animals are the species most involved in this kind of transmission
98 due to the high numbers of yeast-like cells in their cutaneous lesions^{1,5}.

99 An epidemic of sporotrichosis affecting humans and animals in Rio de Janeiro, Brazil,
100 that began in 1998 has been described^{1,5,7}. In this scenario, *S. brasiliensis* is the most prevalent
101 etiological agent in humans and cats⁸. Importantly, most of the cases in this epidemic were
102 related to transmission from infected cats, which emphasizes the importance of these animals in
103 the epidemiological chain of this mycosis. Cats are the animal species most affected by this
104 mycosis, and skin ulcers are the main clinical sign observed^{6,9}. By December 2012, 4,120 feline
105 cases had been diagnosed at the Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI),
106 Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), which is a reference center for diagnosing and treating
107 sporotrichosis and other mycoses in Rio de Janeiro, Brazil¹.

108 The reference standard for diagnosing sporotrichosis is isolation of *Sporothrix* spp. in
109 culture media¹⁰. However, this method is not 100% sensitive and *Sporothrix* spp. growth may
110 not be observed⁵. This is generally due to inadequate collection or transportation of the material
111 or to contamination with saprophytic microorganisms^{11,12}. In addition, it needs to be stated that
112 in some cases, this method delays the start of antifungal treatment because of the time required
113 for isolating the fungus¹³. Furthermore, in non-endemic regions, sporotrichosis is unlikely to be
114 the first clinical suspicion, and thus, the general procedures for sample collection and
115 processing for isolation of the fungus might not be properly implemented. Especially in such

116 cases, other diagnostic methods are required, in particular those that are useful for making the
117 differential diagnosis with neoplasms and other infectious diseases⁵.

118 Cytopathological examination (CPT) is routinely used as a screening method for
119 diagnosing feline sporotrichosis, because of its high sensitivity in comparison with fungal
120 culture. It enables detection of approximately 78-85% of feline positive cases. Moreover, CPT
121 involves simple noninvasive sample collection and is a rapid and inexpensive method. It is thus
122 suitable for routine use by veterinary practitioners even in small facilities^{5,13}.

123 Histopathology is an ancillary diagnostic tool that is also used as a rapid, inexpensive and
124 widely available alternative for diagnosing feline sporotrichosis¹⁴. Special histochemical stains,
125 such as Grocott silver stain (GSS), have been described for diagnosing human and animal
126 sporotrichosis and are usually applied to enhance the visualization of the yeast-like cells in
127 tissues¹⁴⁻¹⁷.

128 Although detection of yeast-like cells in tissues or cytological preparations from lesions in
129 cats does not generally pose a problem with regard to diagnosing sporotrichosis, there are
130 cases in which the fungal burden is low and the use of more accurate methods is required¹⁴.

131 Immunohistochemistry (IHC) has already been shown to improve the sensitivity of the
132 histological diagnosis of human and canine sporotrichosis^{18,19}. However, it has so far not been
133 applied to feline sporotrichosis.

134 It is highly desirable that convenient methods enabling rapid and reliable results should
135 be available for diagnosing feline sporotrichosis and for implementation of early treatment and
136 control measures¹³, thereby potentially reducing the transmission of *Sporothrix* spp. to humans
137 and other animals⁵. The aims of the present study were to standardize the anti-*Sporothrix* spp.
138 immunohistochemical analysis for diagnosing feline sporotrichosis and to evaluate its sensitivity
139 in comparison with CPT and GGS, through using fungal culture as a reference standard.

140

141 **Material and Methods**

142 **Sampling**

143

144 The samples were obtained from cats seen at the Laboratório de Pesquisa Clínica em
145 Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo)/INI/Fiocruz, Rio de Janeiro,

146 Brazil, between 2009 and 2011. Cats presenting skin ulcers with no previous antifungal
147 treatment, for which the definitive diagnosis of sporotrichosis was confirmed by means of fungal
148 culture, were eligible for this study. The medical procedures performed on the cats were
149 approved by the Animal Ethics Committee/Fiocruz.

150 For the sample collection, all the specimens were obtained from a single lesion per cat. In
151 cats presenting multiple lesions, the one with the largest diameter was selected for sample
152 collection.

153

154 **Cytopathological examination**

155

156 The CPT was based on analysis of triplicate impression smears on a glass slide. The
157 slides were air-dried and then stained using the Quick Panoptic method (Instant Prov; Newprov,
158 Pinhais, Brazil). Subsequently, all the slides were analyzed under an optical microscope at a
159 magnification of 1000X. The results were considered positive when at least one yeast-like
160 structure suggestive of *Sporothrix* spp. was detected⁵. These structures measured 3–5 μ m in
161 diameter and were surrounded by a clear halo²⁰.

162

163 **Histopathology: Grocott silver stain**

164

165 For the histopathological analysis, one fragment from the edge of the ulcer was obtained
166 through biopsy, using a punch of 4 mm, after sedation and local anesthesia. The biopsy
167 specimens were fixed in 10% formalin and then processed for routine paraffin embedding.
168 Tissue sections were subjected to GSS, as described previously described²¹, for further
169 examination at the Serviço de Anatomia Patológica, INI/Fiocruz.

170 Cases were considered positive when yeast-like forms consistent with *Sporothrix* spp.
171 were found: round to oval or cigar-shaped yeasts, of about 2-6 μ m, usually presenting
172 elongated buds with a narrow base⁴.

173

174 **Anti-*Sporothrix* sp. immunohistochemical analysis**

175

176 - Standardization of the anti-*Sporothrix* immunohistochemical assay for diagnosing
177 sporotrichosis in feline tissue

178 The procedures for preparing the antigen and producing anti-*Sporothrix* spp. antiserum
179 were as previously described²². The antiserum previously used for the anti-*Sporothrix*
180 immunohistochemical analysis in dogs was produced following the same protocol. The
181 standardization of the assay in feline tissue was carried out based on what was previously
182 reported for canine sporotrichosis¹⁹.

183 In order to standardize the immunohistochemical procedures, the runs were initially
184 performed using positive control sections from cutaneous lesions in cats with sporotrichosis that
185 had been confirmed through isolation of the fungus in culture. These sections were selected as
186 positive controls because they had presented moderate to high fungal burden on
187 histopathological analysis. The formalin-fixed paraffin-embedded samples were subjected to
188 histological sectioning on silanized slides, followed by deparaffinization and rehydration. The
189 following steps were then performed: inhibition of endogenous peroxidase using 30% hydrogen
190 peroxide in 40 mL/100 mL (v/v) methanol solution; blockage of non-specific binding by means of
191 normal swine serum (NCL-SSERUM, Novo Castra, Newcastle, UK) in 1.5% bovine serum
192 albumin (BSA) (1:20 dilution); followed by incubation in a solution of 0.1 g/mL milk powder in
193 3.0% BSA.

194 Thereafter, the histological sections were incubated overnight in a moist chamber at 4°C
195 with anti-*Sporothrix* sp. antiserum in 1.5% BSA. Additional sections from the same samples
196 were used as negative controls and then incubated with normal rabbit serum (X0902, Dako,
197 Carpinteria, CA, USA). The antiserum was initially titrated in order to assess its optimal dilution.
198 For this purpose, several histological sections were covered with serial dilutions (1:800, 1:2000,
199 1:4000 and 1:8000) of the anti-*Sporothrix* sp. antiserum.

200 Serial washes in Tris-buffered saline were performed and were followed by incubation
201 with a universal biotinylated secondary antibody and the streptavidin-biotin-peroxidase
202 complex (LSAB+ System Kit K0690, Dako, Carpinteria, CA, USA). The staining was developed
203 by using diaminobenzidine (SIGMAFAST™ 3,3'-diaminobenzidine tablets, Sigma-Aldrich®, St.
204 Louis, MO, USA) as the chromogen. The histological sections were counterstained with Mayer's
205 hematoxylin and dehydrated.

206 The presence of brown stained yeast-like cells consistent with *Sporothrix* sp. was
207 evaluated through examination under a microscope.

208

209 - *Study of cases*

210 After standardization of the assay and establishment of the optimal dilution of the
211 antiserum, the samples from the cats included in this analysis were subjected to histological
212 sectioning on silanized slides and to the same protocol as described above. For each run,
213 positive and negative controls were used.

214

215 **Data analysis**

216

217 The concordance between the GSS and IHC techniques was assessed by using the
218 overall concordance, separately according to CPT results, taking into consideration both
219 positive and negative concordance. Thus, the total number of positive and negative cases (a +
220 d) from both techniques (GSS and IHC) was divided by the total number of cats (a + b + c + d).
221 Table 1 presents this analysis: $(a + d)/(a + b + c + d)$. Within each method, the cases were
222 analyzed blindly in relation to the results from the other two methods.

223

224 Table 1: Concordance between the Grocott Silver Stain (GSS) and immunohistochemistry (IHC)
225 techniques, separately according to cytopathology (CPT) results, taking into consideration both
226 positive and negative concordance.

227

	IHC-negative	IHC-positive	Total
GSS-negative	a	b	a + b
GSS-positive	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

228

229

230

231

232 **Results**

233

234 One hundred and eighty-four cats were included in this study (Figs 1a, b). They were
 235 mostly males (n=150; 81.5%), mixed-breed (n=152; 82.6%) and in good general condition
 236 (n=143; 77.7%). The median age was 24 months.

237 [insert Figure 1a, b]

238 The standardization of the IHC assay for diagnosing feline sporotrichosis enabled
 239 detection of brown-stained yeast-like cells in the positive control sections (Fig 2a), and the
 240 optimal dilution of the anti-*Sporothrix* sp. antiserum was 1:4000. No staining was detected when
 241 the anti-*Sporothrix* sp. antiserum was replaced with normal rabbit serum in the negative
 242 controls.

243 By means of the techniques evaluated here, yeast-like cells were detected in 168 cases
 244 (91.3%) through GSS, in 163 (88.3%) through IHC and in 160 (87.0%) through CPT. Combining
 245 the three methods increased the sensitivity of the diagnosis to 98.3%. Concordance between
 246 these techniques occurred in 148 cases (80.4%) (Table 2): 144 of these were positive and four
 247 were negative.

248

249 Table 2: Concordance between the techniques: cytopathology (CPT), Grocott silver stain (GSS)
 250 and immunohistochemistry (IHC).

251

CPT	GSS	IHC		Total
		Negative	Positive	
Negative [*]	Negative	4	2	6
	Positive	5	13	18
	Total	9	15	24
Positive [†]	Negative	6	4	10
	Positive	6	144	150
Total		12	148	160

261

)

262 * CPT-negative: % concordance GSS vs. IHC = 70.8%

263 † CPT-positive: % concordance GSS vs. IHC = 93.8%

264

265 The results from GSS and IHC agreed in 157 cases, while the results from CPT agreed
266 with GSS and IHC in 150 and 144 positive cases respectively. In the present study, GSS and
267 IHC were able to detect yeast-like cells in 18 and 15 cases respectively that tested negative
268 through CPT. Moreover, use of IHC made it possible to diagnose sporotrichosis in two cases
269 that tested negative through the two other techniques and in four cases that tested negative
270 through GSS. Figures 2b and 2c present the yeast-like cells of *Sporothrix* sp. in CPT and GSS,
271 respectively.

272 [insert Figure 2a, b, c]

273

274 Discussion

275

276 In the present study, an immunohistochemical assay was standardized for detecting
277 yeast-like cells of *Sporothrix* sp. in tissue from cats for the first time. This method was further
278 compared with cytopathological analysis and GSS for diagnosing sporotrichosis in 184 cats,
279 using fungal culture as the reference standard. Evaluation of alternative tools for diagnosing
280 sporotrichosis is imperative, since fungal culturing is not always available.

281 The results described here show that CPT showed high sensitivity (87%) for detecting
282 yeast-like cells of *Sporothrix* sp. in cytological preparations, as previously described^{5,13}.
283 However, this method may present low specificity, and false positive cases have already been
284 identified in endemic areas, especially when the analysis is performed by an inexperienced
285 observer⁵. On the other hand, sporotrichosis is not likely to be the first suspicion in non-endemic
286 areas, even in common clinical presentations. In addition, in these areas, the observers may not
287 be familiar with the visualization of the fungus, and the yeast-like cells of *Sporothrix* sp. would
288 not be promptly identified through CPT. For this reason, histopathology may be the only
289 alternative for diagnosing sporotrichosis in these cases, since it enables retrospective analysis
290 of formalin-fixed paraffin-embedded tissues when the clinical suspicion of sporotrichosis is not
291 raised at the time of the sample collection.

292 The GSS presented high sensitivity for detecting yeast-like cells in histological sections
293 from cats with sporotrichosis, as previously found by Miranda et al¹⁴. In relation to human and
294 dogs, GSS is not considered a highly sensitive method for diagnosing sporotrichosis, because
295 the skin lesions in these species typically have low fungal burdens. In a previous study on
296 canine sporotrichosis¹⁵, the sensitivity of GSS was 65.5%; while in relation to human
297 sporotrichosis, this sensitivity was 35.3%¹⁷.

298 In the present study, this technique turned out to be more sensitive than CPT and IHC.
299 Skin lesions caused by *Sporothrix* in cats usually show high fungal burden and thus the yeast-
300 like cells are easily found, independently of which method is used. However, a low fungal
301 burden has been occasionally described in cats with sporotrichosis, especially in animals with
302 localized lesions, and this may represent an obstacle for implementing the method. Additionally,
303 GSS is not specific and may be used for detecting any fungal species²³.

304 In this context, the IHC technique described here enabled detection of yeast-like cells
305 without requiring any kind of antigen retrieval step, and even when a high dilution of the anti-
306 *Sporothrix* sp. antiserum was used. This technique is simple and may be rapidly reproducible in
307 other laboratories. IHC has already been described as a useful tool for diagnosing
308 sporotrichosis in humans and dogs^{18,19} with greater sensitivity in comparison with GSS.
309 Moreover, this method is considered to be more specific, since detection of the agent is based
310 on antigen-antibody binding.

311 In the present study, GSS presented better performance than CPT and IHC. Although the
312 sensitivity of CPT was lower than that of GSS and IHC, this method was positive in six cases
313 that proved to be negative through the other two methods.

314 Combining CPT, GSS and IHC increased the sensitivity of the diagnosis, in comparison
315 with each technique individually. However, the overall concordance between them was low in
316 the negative cases. Although analysis on the fungal burden was not the objective of this study, it
317 is likely that the disagreement between the methods occurred in cases with low fungal burden,
318 in which evaluation of different methods is particularly important. Among the inconclusive cases,
319 notably those presenting low fungal burden, confirmation of the diagnosis by means of IHC,
320 which is generally considered to be more specific, may be necessary. Further evaluation of the

321 different methods should be carried out considering the fungal burden, and this may be
322 particularly useful in cases in which yeast-like cells are scarce.

323 Importantly, it should be stated that *S. brasiliensis*, the most prevalent causative species
324 of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, has also been described as highly virulent, in
325 comparison with other species within the *Sporothrix* spp. complex. This has been correlated
326 with dissemination of the agent and with high fungal burden²⁴. For this reason, the high fungal
327 burden commonly observed in skin lesions of cats with sporotrichosis from Rio de Janeiro may
328 be explained by the high prevalence of this species in that region. Within this context, infection
329 by less virulent species from the *Sporothrix* complex could lead to lower fungal burden and to
330 difficulties in diagnosing this condition. Histopathological analysis by means of hematoxylin-
331 eosin staining is a decisive tool and should be used by pathologists for conducting case studies.
332 Therefore, in cases in which the histopathological presentation is consistent with sporotrichosis
333 (suppurative granulomatous inflammation), special histochemical stains like GSS for detecting
334 yeast-like cells should be used¹⁴. Immunohistochemical assay is a sensitive tool and thus
335 should be considered an alternative in cases in which GSS is negative or inconclusive.

336 Although the sensitivity of CPT was slightly inferior to that of GSS and IHC, we strongly
337 recommend that it should be routinely used for presumptive diagnosing of feline sporotrichosis
338 within veterinary practice, especially in epidemic or endemic situations. This method is
339 inexpensive, rapid and easy to use. Furthermore, it enables early treatment of cats, leading to
340 higher chances of clinical cure and consequent reduction of the risk of transmission of
341 *Sporothrix* spp. to humans and other animals⁵.

342

343 Conclusions

344

345 Because of the high potential of cats for transmitting *Sporothrix* spp. and the increasing
346 numbers of reports of sporotrichosis from different geographic areas, we highlight the
347 importance of taking this disease into consideration as a differential diagnosis in cases in which
348 the clinical and histopathological presentation resemble that of sporotrichosis. In these cases,
349 investigation of the agent in histological sections is highly recommended. Immunohistochemistry
350 showed high sensitivity for diagnosing feline sporotrichosis and thus, its employment as

alternative should be considered. The different methods described here may lead to diagnosing of almost 100% of the cases. This emphasizes the importance of their implementation as regular tools, notably when fungal culture is unavailable.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of 'Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos' (INI/Fiocruz), to 'Laboratório de Micologia' and to 'Serviço de Anatomia Patológica'. Special thanks to Tânia Maria Pacheco Schubach and Rodrigo Mexas for processing the figures.

Funding

This work was supported by the the 'Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde' (PAPEs VI) Fiocruz/Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico' (CNPq) [grant number 407771/2013-3] and the 'Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro' (FAPERJ)/'Jovem Cientista do Nosso Estado' [grant number E-23/102.255/2013].

Conflict of Interest statement

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

1. Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol* 2015; 53: 15–21.
2. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol* 2015; 53: 3–14.
3. López-Romero E, Reyes-Montes M del R, Torres AP, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol* 2011; 6: 85–102.
4. Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, et al. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica* 2011; 27: 455–460.
5. Silva JN, Passos SRL, Menezes RC, et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Med Mycol* 2015; 1–5.
6. Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2014; 47: 392–393.
7. Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1623–1629.
8. Rodrigues AM, Teixeira MM, Hoog GS, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7: e2281.
9. Pereira SA, Gremião IDF, Menezes RC. Sporotrichosis in Animals: Zoonotic Transmission. In: Carlos IZ, ed. *Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects*. Springer Press. Brazil: São Paulo, 2015, pp. 83–112.
10. Rippon J. Sporotrichosis. In: Rippon J, ed. *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomyces*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1988, pp. 325–352.
11. Moore M and Ackerman LV. Sporotrichosis with radiate formation in tissue: report of a case. *Arch Derm Syphilol* 1946; 53: 226–253.
12. Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol* 1992; 13: 519–533.

13. Perelra SA, Menezes RC, Gremlao IDF, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg* 2011; 13: 220–223.
14. Miranda LH, Conceição-Silva F, Quintella LP, et al. Feline sporotrichosis: profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2013; 36: 425–432.
15. Miranda LH, Quintella LP, dos Santos IB, et al. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia* 2009; 168: 79–87.
16. Quintella LP, Passos SR, de Miranda LH, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol* 2012; 167: 837.
17. Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol* 2011; 38: 25–32.
18. Marques ME, Coelho KI, Sotio MN, et al. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. *J Clin Pathol* 1992; 45: 1089–1093.
19. Miranda LH, Quintella LP, Menezes RC, et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet J* 2011; 190: 408–411.
20. Welsh RD. Sporotrichosis. *J Am Vet Med Assoc* 2003; 223: 1123–1126.
21. Carson FL and Hladik C. *Histotechnology: A Self Instructional Text*. Chicago, IL: ASCP Press, 2009.
22. Lopes Alves L, Travassos LR, Prevlato JO, et al. Novel antigenic determinants from peptidoglycanomannans of *Sporothrix schenckii*. *Glycobiology* 1994; 4: 281–288.
23. Reed JA, Hemann BA, Alexander JL, et al. Immunomycology: Rapid and specific immunocytochemical identification of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded material. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 1217–1221.
24. Almeida-Paes R, de Oliveira LC, Oliveira MM, et al. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *Biomed Res Int* 2015; 1–10.

Figure Legends

Figure 1. Feline sporotrichosis. a: Cat presenting ulcerated skin multiple lesions in the forelimb and face. b: Ulcer on the bridge of the nose.

Figure 2. Skin of a cat with sporotrichosis. a: Dark-brown *Sporothrix* spp. yeast-like cells (arrows). Immunohistochemistry (anti-*Sporothrix* spp. antiserum, 1:4000); b: Impression smear showing numerous cigar-shaped or oval yeast-like cells with a single round pink nucleus surrounded by blue cytoplasm and a non-staining cell wall, within macrophages and extracellular medium. Quick Panoptic stain; c: High fungal load. Grocott silver stain.

Journal of Feline Medicine and Surgery

Table 1: Concordance between the GSS and IHC techniques, separately according to CPT results, taking into consideration both positive and negative concordance.

	IHC-negative	IHC-positive	Total
GSS-negative	a	b	a + b
GSS-positive	c	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

Journal of Feline Medicine and Surgery

Table 2: Concordance between the techniques: cytopathology (CPT), Grocott silver stain (GSS) and immunohistochemistry (IHC).

CPT	GSS	IHC		Total
		Negative	Positive	
Negative*	Negative	4	2	6
	Positive	5	13	18
	Total	9	15	24
Positive†	Negative	6	4	10
	Positive	6	144	150
Total		12	148	160

* CPT-negative: % concordance GSS vs. IHC = 70.8%

† CPT-positive: % concordance GSS vs. IHC = 93.8%



Figure 1. Feline sporotrichosis. a: Cat presenting ulcerated skin multiple lesions in the forelimb and face. b: Ulcer on the bridge of the nose.
77x122mm (300 x 300 DPI)

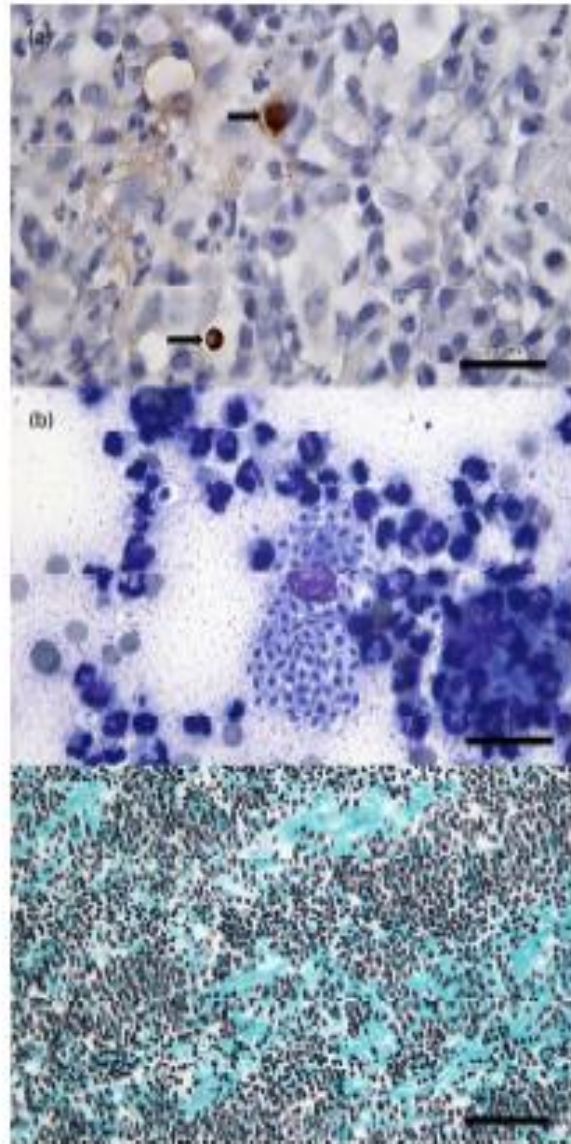


Figure 2. Skin of a cat with sporotrichosis. a: Dark-brown *Sporothrix* spp. yeast-like cells (arrows). Immunohistochemistry (anti-*Sporothrix* spp. antiserum, 1:4000); b: Impression smear showing numerous cigar-shaped or oval yeast-like cells with a single round pink nucleus surrounded by blue cytoplasm and a non-staining cell wall, within macrophages and extracellular medium. Quick Panoptic stain; c: High fungal load. Grocott silver stain.
77x141mm (300 x 300 DPI)

5.2 *Capítulo 2*

MANUSCRITO 2 –

A influência do tratamento com itraconazol no diagnóstico micológico e no controle da carga fúngica das lesões cutâneas na esporotricose felina

O objetivo desse artigo foi descrever a quantificação de estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* sp. de lesões cutâneas felinas observadas no exame citopatológico corado pelo método panótico rápido na consulta inicial (pré-tratamento) e nas consultas de seguimento (durante o tratamento). Adicionalmente, foi descrito o tempo decorrido após o início do tratamento antifúngico no qual não foi mais possível o isolamento de *Sporothrix* sp. em meio de cultura.

Este artigo responde ao terceiro e quarto objetivos específicos desta tese.

A influência do tratamento com itraconazol no diagnóstico micológico e no controle da carga fúngica das lesões cutâneas na esporotricose felina

Jéssica Nunes Silva¹, Luisa Helena Monteiro de Miranda², Érica Guerino dos Reis²,
Isabella Dib Ferreira Gremião², Rodrigo Caldas Menezes², Raquel Vasconcellos de
Oliveira³, Laerte Ferreira¹, Sandro Antonio Pereira²

1-Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul.

2-Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos,
Instituto Nacional de Infectologia/Fundação Oswaldo Cruz

3-Laboratório de Epidemiologia Clínica, Instituto Nacional de
Infectologia/Fundação Oswaldo Cruz

Corresponding author:

Jéssica Nunes Silva

Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves 9090, Agronomia, Rio Grande do Sul, Brasil.

E-mail: jessicanunes7@gmail.com

Abstract

Sporotrichosis is a fungal infection caused by species of *Sporothrix* complex, and it affects both humans and animals. Skin lesions in cats carry a high fungal burden, making the cat an important source of infection of this fungus. The zoonotic transmission occurs mainly through scratch, bite or contact with exudate of sick cats. Despite the importance of cats in the zoonotic transmission of *Sporothrix*, little is known about the possibility of isolation of this fungus from the skin lesions during antifungal treatment. The purpose of this study was to evaluate os exames micológicos and quantificar in cytopathological examination from ulcerated skin lesion during the treatment with itraconazole na esporotricose felina. All cats included presented ulcerated skin lesions which from the isolation of the fungus in culture media was conducted and were treated with oral itraconazole (100 mg/cat/24 hours). The median of the fungal load detected before the outse of the antifungal treatment was higher ($p_{MW}=0.013$) in cats in which there was a persistence of the cutaneous lesion (Med=98.6) in comparison to those in which healing of the lesion was observed (Med=15.0). The median of the fungal load was zero after two weeks of treatment. This suggests a potential reduction in the fungal load and in consequence, a decrease in the risk of transmission of *Sporothrix* from cats to humans and other animals. These findings stress the importance of the early treatment in feline sporotrichosis for controlling the transmission of the fungus to humans, dogs and cats, thus supporting the control of the epidemic. However, the risk of transmission of *Sporothrix* sp. from cats with persistent lesions under antifungal treatment should not be rulled out.

Introdução

A esporotricose é uma infecção fúngica causada por fungos termodimórficos do complexo *Sporothrix schenckii* e apresenta distribuição geográfica mundial com relatos em todos os continentes. (Chakrabarti *et al.*, 2015). A doença afeta humanos e uma variedade de animais, especialmente os gatos. (Pereira *et al.*, 2014). A transmissão zoonótica ocorre principalmente através de arranhadura, mordedura ou contato com o exsudato das lesões de gatos doentes (Barros *et al.*, 2011), os quais geralmente apresentam uma elevada carga fúngica em suas lesões cutâneas (Miranda *et al.*, 2013).

A esporotricose felina apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, que pode iniciar de forma subclínica e evoluir para lesões cutâneas múltiplas e comprometimento sistêmico fatal. A maioria das manifestações clínicas em gatos são múltiplas lesões na pele podendo ser encontrados em três ou mais sítios anatômicos não contíguos, comumente na região da cabeça, principalmente no nariz. (Gremião *et al.*, 2015).

A emergência da esporotricose ganhou importância há duas décadas devido a mudanças na epidemiologia, distribuição e múltiplos surtos (Chakrabarti *et al.*, 2015). Desde 1998, uma epidemia de esporotricose é descrita no Rio de Janeiro, Brasil (Gremião *et al.*, 2015) e *S. brasiliensis* é a espécie mais prevalente em humanos e gatos. (Rodrigues *et al.*, 2013). De 1998 a 2012, 4,120 casos felinos foram diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), centro de referência no diagnóstico e tratamento da esporotricose no Brasil (Gremião *et al.*, 2015). Além disso, muitos dos casos dessa epidemia relatados são por transmissão de gatos doentes, o que enfatiza a importância desses animais na cadeia epidemiológica desta micose. (Pereira *et al.*, 2014). Apesar da importância dos gatos na

transmissão zoonótica de *Sporothrix* sp., pouco se conhece sobre a possibilidade do isolamento do fungo de lesões cutâneas durante o tratamento antifúngico. O padrão de referência para o diagnóstico da esporotricose felina é o isolamento de *Sporothrix* sp. em meio de cultura (Rippon,1988). Entretanto, apesar da alta sensibilidade neste método diagnóstico, em casos felinos o tempo requerido para obtenção dos resultados para esta pode levar até quatro semanas. (Silva *et al.*, 2015).

O exame citopatológico (CPT) pode ser usado no diagnóstico presuntivo da esporotricose felina apresentando uma boa sensibilidade. É um método amplamente utilizado para diagnosticar e/ou diferenciar doenças infecciosas, inflamatórias, proliferativas e neoplásicas (Cowell, 2008). Em um estudo recente conduzido por esta mesma instituição, 806 gatos com esporotricose foram avaliados e observou-se a sensibilidade de 78.9%. Também, Silva e colaboradores (2015) demonstraram que a sensibilidade do exame citopatológico comparada com a cultura fúngica foi considerada satisfatória (84.9%). Análises de exsudato de lesões de pele ulceradas de gatos infectados com *Sporothrix* sp. geralmente revelam numerosas estruturas ovaladas ou fusiformes (em forma de charuto), apresentando entre 3–5 µm de diâmetro e 5 a 9 µm de largura com um halo ao redor, livres ou no interior de macrófagos (Pereira *et al.*, 2011). No entanto, não há relatos na literatura sobre a quantificação de estruturas leveduriformes nas lesões cutâneas em gatos antes e durante o tratamento antifúngico. O objetivo desse estudo foi verificar a influência do tratamento antifúngico no diagnóstico da esporotricose e no controle da carga fúngica nas lesões cutâneas.

Materiais e Métodos

- População do Estudo

Foram incluídos neste estudo 74 gatos apresentando lesões cutâneas ulceradas, das quais foi realizado o isolamento de *Sporothrix* sp. em cultura, e que após o diagnóstico foram submetidos ao tratamento sistêmico com itraconazol oral 100 mg/gato/a cada 24 horas. Os gatos foram atendidos no período de janeiro de 2013 a janeiro de 2015 no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo)/Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, Brasil. Os animais que receberam qualquer tratamento antifúngico prévio não foram incluídos no estudo. Os procedimentos realizados nesse estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)/ Fiocruz (L69/2012).

- Avaliação Clínica

Os gatos foram submetidos a exame clínico geral e dermatológico, quando foram avaliados: estado geral, lesões (tipo, localização e número), sinais extracutâneos, e tempo de evolução dos sinais clínicos antes da consulta inicial. De acordo com o número e a distribuição das lesões cutâneas, os gatos foram divididos em três grupos: L1, L2 e L3. No grupo L1, foram incluídos os gatos que apresentaram lesão (ões) em apenas uma localização anatômica; no grupo L2, aqueles que apresentaram lesões em duas localizações não contíguas; e no grupo L3 os que exibiram lesões em três ou mais localizações não contíguas (Schubach *et al.*, 2004).

- Exame citopatológico (CPT)

Para o exame citopatológico foram utilizadas lâminas de microscopia, previamente limpas e secas. O procedimento de coleta das amostras consistiu em três impressões sequenciais da lâmina sobre a lesão preferencialmente a de maior diâmetro. A lâmina foi corada pelo Panótico rápido (Instant Prov; Newprov), uma coloração do tipo *Romanowsky* seguindo às instruções do fabricante. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico na objetiva de imersão de 100x. O resultado foi considerado positivo quando pelo menos uma estrutura leveduriforme sugestiva de *Sporothrix* sp. foi observada. A carga fúngica foi determinada por meio da média do número de estruturas leveduriformes observadas em três campos microscópicos (100x), de cada uma das três impressões.

- Cultura micológica (CM)

Concomitantemente, foi realizada a coleta do material da mesma lesão ulcerada utilizando um swab estéril para a cultura fúngica. As amostras foram semeadas em ágar dextrose Sabouraud com cloranfenicol e ágar Mycobiotic agar (Difco), incubados a 25°C e observados por 4 semanas. Os isolados foram repicados em meio ágar Batata Dextrose a 25°C e o dimorfismo foi demonstrado pela conversão a 37°C em meio Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHIA) (Rippon, 1988).

- Seguimento dos pacientes

As consultas de seguimento foram realizadas a cada quatro semanas durante 12 semanas de tratamento antifúngico com itraconazol, quando as seguintes variáveis

foram avaliadas: a presença ou cicatrização de lesões cutâneas ulceradas, os resultados da cultura micológica e do exame citopatológico. O protocolo previamente descrito foi novamente empregado para coleta do exsudato da mesma lesão ulcerada investigada no primeiro atendimento. Nas lesões nas quais foi observada a cicatrização, a coleta não foi realizada.

Os gatos sob tratamento antifúngico que não compareceram às consultas de seguimento foram excluídos do estudo. Os pacientes nos quais a cura clínica não ocorreu durante o período de seguimento aqui descrito permaneceram em acompanhamento clínico e terapêutico no Lapclin-Dermzoo. Ao fim do tratamento com itraconazol, o desfecho dos gatos foi descrito (cura clínica, falência terapêutica e óbito).

- Análise estatística

Os dados foram armazenados e analisados no programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), versão 16.0.

Para verificar se a associação entre as variáveis categóricas foi significativa, foi realizada a análise dos dados pelo teste de independência qui-quadrado de Pearson (p_P). Para tabelas constituídas pelo cruzamento de variáveis com apenas duas categorias (2x2) em que pelo menos uma das casas apresentou valor inferior a 5, o teste exato de Fisher (p_F) foi utilizado.

Os testes de Kruskal-Wallis (p_{KW}) e Mann-Whitney (p_{MW}) para testes não-paramétricos foram utilizados para verificar a correlação entre as variáveis categóricas e contínuas não pareadas. O teste de Wilcoxon (p_W), para análise de amostras pareadas,

foi utilizado para verificar a existência de correlação entre as categorias das diferentes variáveis estudadas e a carga fúngica ao longo do tempo de tratamento investigado.

Em todas as análises descritas, um p-valor $< 0,05$ foi utilizado na indicação de associação estatisticamente significativa.

Resultados

Setenta e quatro gatos com esporotricose foram incluídos no estudo. A maioria dos pacientes era macho (67,6%), sem raça definida (95,9%) e se encontrava em bom estado geral (87,8%). A idade mediana dos gatos foi 24 meses (6-96 meses; n=69) e o tempo mediano decorrido entre a observação do início das lesões cutâneas e a consulta inicial foi 8 semanas (2-48 semanas). Sinais respiratórios foram observados em 24 gatos (32,4%), dos quais os mais frequentes foram espirros e rinorréia (n=19; 79,2%). Sinais extracutâneos não respiratórios foram observados em 57 (77%) animais, sendo o aumento do linfonodo regional o mais frequente (n=30; 40,5%). Vinte e cinco gatos (33,8%) foram classificados como pertencentes ao grupo L1, 19 (25,7%) ao L2, e 30 (40,5%) ao L3.

De acordo com os resultados do exame citopatológico e da cultura micológica ao longo do tratamento com itraconazol, observa-se que a positividade nos dois métodos é inversamente proporcional ao tempo de tratamento (Tabela 1). Em relação a primeira revisão (T1), o percentual de resultados falso positivos no exame citopatológico foi 53,3% e o de falso negativos foi 29,4%. Na segunda (T2) e terceira (T3) revisões não houve casos falso positivos, entretanto, resultados falso negativos foram observados em dois e quatro casos, respectivamente.

Tabela 1: Resultados dos exames micológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos com esporotricose antes e durante o tratamento com itraconazol.

		Gatos com lesões cutâneas ulceradas			
		Período de tratamento em meses (T)			
		T0	T1	T2	T3
		(n=74)	(n=32)	(n=13)	(n=12)
Exames micológicos	EC				
	+	65	20	4	3
	-	9	12	9	9
	+	74	17	6	7
	CM				
	-	0	15	7	5

CM – CULTURA MICOLÓGICA

EC – EXAME CITOPATOLÓGICO

A tabela 2 descreve a variação da carga fúngica ao longo do tratamento antifúngico, desde a primeira consulta até a 12^a semana de tratamento. Em relação ao CPT antes do início do tratamento (T0), os animais do grupo L3 apresentaram uma maior carga fúngica quando comparados aos grupos L1 ($p_{MW}=0,03$) e L2 ($p_{MW}=0,03$).

Tabela 2: Correlação da quantificação de leveduras no exame citopatológico de acordo com a distribuição das lesões em grupos dos gatos com esporotricose antes e durante o tratamento com itraconazol.

		Quantificação de estruturas leveduriformes			
Grupos		Período de tratamento em meses (T)			
		T0	T1	T2	T3
	N	25	9	4	4
L1	Mediana	9	2,0	,0	,0
	Min-Max	0-298	0-50	0-1	0-21
	N	19	8	1	1
L2	Mediana	8,3	,5	,0	,0
	Min-Max	0-323	0-17	0	0
	N	30	15	8	7
L3	Mediana	76	1	,0	,0
	Min-Max	2-413	0-15	0-5	0-11

A redução da carga fúngica ao longo do tratamento ocorreu nos três grupos estudados, sendo essa redução significativa tanto entre a primeira coleta (antes do tratamento antifúngico) e a primeira revisão ($p_w < 0,001$), quanto entre a primeira revisão e a segunda revisão ($p_w = 0,003$).

Após 12 semanas de tratamento antifúngico, 62 gatos (83,8%) apresentaram a lesão cutânea ulcerada avaliada cicatrizada e em 12 pacientes foi observada a persistência da lesão. A maioria das lesões estudadas ($n=42$, 56,8%) cicatrizaram em até um mês de tratamento com itraconazol. A mediana da carga fúngica observada antes do início do tratamento antifúngico foi maior ($p_{MW} = 0,013$) nos gatos nos quais foi observada a persistência da lesão (Med=98,6) em relação aqueles em que houve cicatrização (Med=15,0).

Dentre os gatos nos quais houve persistência da lesão ($n=12$), a mediana da carga fúngica foi zero após 12 semanas de tratamento com itraconazol em todos os grupos estudados e o número máximo de estruturas leveduriformes observadas no CPT foi 21.

Dentre os 74 gatos estudados, em 57 (77,0%) houve cura clínica. A falência terapêutica foi observada em 14 casos (18,9%) e um caso houve óbito não relacionado a esporotricose (1,35%). A perda de seguimento terapêutico ocorreu em dois casos. A mediana da carga fúngica observada antes do início do tratamento antifúngico e na primeira consulta de revisão foi maior ($p_{MW} = 0,022$ e $p_{MW} < 0,001$) nos gatos em que houve falência terapêutica (Med=100,0) em relação aqueles nos quais foi observada a cura clínica (Med=13,6).

A proporção de casos nos quais houve cicatrização e de casos negativos tanto na cultura micológica quanto ao exame citopatológico ao longo do período de tratamento

analisado foi superior ($p_p < 0,001$) em todas as revisões nos gatos que evoluíram para a cura clínica em relação aqueles que evoluíram para a falência terapêutica (Tabela 3).

Tabela 3: Relação dos resultados dos exames micológicos (exame citopatológico e cultura) ao longo do tratamento com o desfecho dos gatos (cura clínica e falência terapêutica).

Seguimento	Exame	Resultado	Desfecho após 12 semanas		
			Alta	Falência	
Primeira Revisão	Cultura micológica	+	7	10	
		-	12	1	
	Exame citológico	+	8	10	
		-	11	1	
	Cicatrização			38	3
	Segunda Revisão	Cultura micológica	+	1	5
-			2	3	
Exame citológico		+	0	4	
		-	3	4	
Cicatrização			54	6	
Terceira Revisão		Cultura micológica	+	0	7
	-		1	3	
	Exame citológico	+	0	3	
		-	1	7	
	Cicatrização			56	4

Discussão

O presente estudo apresenta, pela primeira vez, o acompanhamento seriado com a utilização de dois métodos de diagnóstico micológico em lesões cutâneas ulceradas causadas pelo *Sporothrix* sp. em gatos ao longo do tratamento sistêmico/oral com itraconazol 100mg/gato/dia, visando a verificação da influência do tratamento antifúngico no diagnóstico da esporotricose e no controle da carga fúngica.

Após o início da administração do itraconazol, fármaco de eleição no tratamento da esporotricose, é esperada a redução na carga fúngica e a consequente cicatrização das lesões cutâneas. Entretanto, têm sido descrito casos felinos refratários à monoterapia com esse azólico no Rio de Janeiro, com persistência de lesões cutâneas nas quais o *Sporothrix* sp. foi isolado (Gremião *et al.*, 2009; Gremião *et al.*, 2011; Gremião *et al.*, 2015). Nossos resultados demonstram que o tratamento com itraconazol levou a redução da carga fúngica nas lesões cutâneas ulceradas, independente da distribuição e número das mesmas nos gatos, assim como à ausência de crescimento fúngico na cultura em um grande número de lesões cutâneas. Após um mês de tratamento antifúngico, observou-se cicatrização em mais da metade das lesões estudadas e, dentre as lesões não cicatrizadas, a cultura micológica foi negativa em mais de 50% dos casos.

Os resultados falso positivos observados no exame citopatológico, após o primeiro mês de tratamento antifúngico podem estar relacionados a observação de artefatos (como precipitados de coloração) e debris celulares ou a contaminação da cultura (Silva *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2011). Além disso, o comprometimento do crescimento fúngico em cultura pode ocorrer devido a introdução do itraconazol ou a coleta e transporte da amostra inadequados. Por outro lado, a ocorrência de casos falso negativos pode estar relacionada a redução significativa da carga fúngica observada

neste período. Desta forma, a utilização de mais de um método de diagnóstico é importante para a confirmação do diagnóstico em gatos recebendo tratamento antifúngico.

A avaliação da carga fúngica nas lesões cutâneas ulceradas antes do início do tratamento antifúngico demonstrou que gatos com múltiplas lesões (grupo L3) apresentam maior carga fúngica, conforme previamente descrito por outros autores (Silva *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 2013), o que pode indicar uma incapacidade do sistema imune do gato frente a multiplicação do *Sporothrix* sp.

De fato, de acordo com modelos experimentais, a eficiência da resposta imune frente ao fungo interfere no controle da carga fúngica (Miyaji & Nishimura, 1982; Mohri, 1987; Pen-Cheng *et al.*, 1993). Em seres humanos e cães, a ocorrência de lesões cutâneas com carga fúngica elevada está geralmente associada a fatores imunossupressores, como desnutrição, uso de corticosteróides e a presença de doenças concomitantes, especialmente as que causam imunodeficiência, como a AIDS (Rocha *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2002; Schubach *et al.*, 2006; Bernstein *et al.*, 2007; Cafarchia *et al.*, 2007).

Recentemente, Miranda e colaboradores (2015) observaram que a intensidade da carga fúngica em gatos com esporotricose parece estar associada a diferentes padrões de resposta imune, e que lesões com carga fúngica elevada apresentam geralmente uma resposta inflamatória pouco organizada. Ressalta-se que formas graves da doença, associadas a lesões com grande quantidade de leveduras são frequentes em gatos, independentemente da coinfeção com retrovírus felinos, sabidamente causadores de imunossupressão (Miranda *et al.*, 2015). Contudo, a influência de outros fatores imunossupressores não pode ser descartada nesses animais, uma vez que seu *status*

imunológico é desconhecido. No presente estudo, gatos com múltiplas lesões cutâneas e com maior carga fúngica tenderam a apresentar lesões persistentes e falência terapêutica. Uma vez que o balanço adequado da resposta imune parece estar associado a lesões mais localizadas e com menor carga fúngica, a manutenção de um bom estado geral pode contribuir para maior chance de cicatrização e de cura clínica, com consequente controle da transmissão (Miranda *et al.*, 2015).

Neste estudo, a avaliação do exame citopatológico e da cultura fúngica durante o tratamento demonstrou que a positividade nos dois métodos até o terceiro mês de tratamento pode estar associada a um desfecho negativo nesses animais. Desta forma, o acompanhamento das lesões cutâneas com base nos resultados dos testes de diagnóstico pode ser indicativa de animais refratários ao itraconazol, de modo que alternativas terapêuticas devem ser consideradas. Neste contexto, o exame citopatológico é um método de baixo custo e de fácil execução e pode ser implementado rotineiramente por veterinários clínicos para avaliação do tratamento antifúngico.

A diminuição significativa da carga fúngica em todas as lesões aqui estudadas, incluindo as persistentes e aquelas em gatos cujo desfecho final foi a falência terapêutica, sugere que gatos sob tratamento antifúngico podem não representar um papel central na cadeia de transmissão do *Sporothrix* sp., mesmo aqueles que apresentavam elevada carga fúngica inicialmente. A redução marcante da quantidade de estruturas leveduriformes observada após o primeiro mês de tratamento com o itraconazol indica que a redução do potencial zoonótico pode ocorrer precocemente.

Estes achados confirmam a importância da instituição precoce do tratamento antifúngico nos casos de esporotricose felina como medida de controle da transmissão do *Sporothrix* sp. para seres humanos, cães e outros gatos, contribuindo desta forma para o controle da epidemia. Paralelamente, o acompanhamento das lesões cutâneas

durante o tratamento com itraconazol em gatos com esporotricose deve ser considerado como um parâmetro para a avaliação da resposta terapêutica.

Referências

- BERNSTEIN, J.A., et al. Cytologic diagnosis of generalized cutaneous sporotrichosis in a hunting hound. **Veterinary clinical pathology**. v. 36, p. 94-6, 2007.
- CARVALHO, M.T.M., et al. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 35, p. 655-59, 2002.
- CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**. v. 53, p. 3–14, 2015.
- BARROS, M.B., ALMEIDA-PAES, R., SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24, p. 633-654, 2011.
- CAFARCHIA, C., et al. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case report. **Mycopathologia**. v. 163, p. 7579, 2007.
- COWELL, R.L. et al. Selected infectious agents. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB, editors. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3rd ed. Saint Louis: Mosby - Elsevier; p. 47-62, 2008.
- GREMIÃO, I.D.F. et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**. v. 53, p. 15-21, 2015.
- GREMIÃO, I.D.F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**. v. 89, p. 346-51, 2011.
- GREMIÃO, I.D.F., et al. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 346-351, 2009.

MIYAJI, M. & NISHIMURA, K. Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. **Mycopathologia**. v. 80, p. 117-24, 1982.

MIRANDA et al. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8low cells and a decrease in CD4+ cells. **Medical Mycology**. p. 1-11, 2015.

MIRANDA, L.H. et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology Microbiology & Infection Disease**. v. 36, p. 425-432, 2013.

MOHRI, S. Study in sporotrichosis – III. Histological and Immunohistochemical study in experimental cutaneous sporotrichosis in man. **Yokohama Med Bull**. v. 38: p. 37-48, 1987.

PENG-CHENG, L., et al. Histopathological studies of *Sporothrix schenckii*- inoculated mice – Possible functions of polymorphonuclear leukocytes in normal and immunocompromised (congenitally athymic nude) mice. **Mycopathologia**. v.122: p. 89-93, 1993.

PEREIRA, S.A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 47: p. 392-393, 2014.

PEREIRA, S.A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.13: p. 220-223, 2011.

RIPPON, J. Sporotrichosis. In: Rippon J, editor. **Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; p. 325-352, 1988.

ROCHA, M.M., et al. Sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case and review. *Revista Iberoamericana de Micologia*. v. 18, p. 133-36, 2001.

SCHUBACH, T.M. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**. v. 44: p. 87-92, 2006.

SCHUBACH, T.M. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 224: p. 1623-9, 2004.

SCHWARZ, J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. **Human Pathology**. v. 13: p. 519-33, 1982.

SILVA, J.N. et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**. 1–5, 2015.

WERNER, A.H. & WERNER, B.E. Sporotrichosis in man and animal. **International Journal of Dermatology**. v. 33: p. 692-700, 1994.

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo foi realizado de forma pioneira a padronização da reação de imuno-histoquímica para detecção de estruturas leveduriformes de *Sporothrix* sp. em tecido cutâneo de gatos e a comparação deste método com o CPT e IPG no diagnóstico da esporotricose em 184 gatos, utilizando a cultura micológica como padrão de referência. Adicionalmente, e também de forma inédita, foi feito o acompanhamento seriado de lesões cutâneas ulceradas causadas pelo *Sporothrix* sp. em gatos durante o tratamento sistêmico com itraconazol, por meio de dois métodos de diagnóstico micológico, para verificação da influência do tratamento antifúngico no diagnóstico da esporotricose e no controle da carga fúngica.

A IHQ é um método de diagnóstico simples, rápido e reprodutível em outros laboratórios. É descrita como uma ferramenta útil para o diagnóstico da esporotricose humana e canina (MARQUES et al., 1992; MIRANDA et al., 2011). Em nosso estudo a sensibilidade desta técnica foi alta (88,3%), entretanto, não encontramos outros trabalhos que avaliaram a IHQ na esporotricose felina. A sensibilidade dessa técnica no diagnóstico da esporotricose em cães foi 65,5% (MIRANDA et al., 2011), inferior a descrita neste estudo, o que pode ser explicado pela maior carga fúngica geralmente encontrada nas lesões cutâneas felinas em relação às lesões em cães. A IHQ se mostrou uma alternativa sensível e mais específica porque foi capaz de detectar o agente etiológico baseado na ligação antígeno-anticorpo. Leveduras de *Sporothrix* sp. são facilmente detectadas no exame microscópico porque adquirem uma coloração acastanhada que contrasta com a coloração azulada do tecido. Dessa forma, deve ser considerada como uma alternativa, sobretudo em casos em que os outros métodos de diagnóstico foram negativos ou inconclusivos.

Em comparação com a IPG, segundo Miranda e colaboradores (2011), a IHQ foi mais sensível na detecção de *Sporothrix* sp. em lesões de esporotricose canina. Um achado também descrito na esporotricose humana por MARQUES et al. (1992). Diferentemente de Moskowitz e colaboradores (1986) que não observaram diferença na sensibilidade entre o IPG e a IHQ.

Nos últimos anos, o CPT tem sido fortemente indicado no diagnóstico da esporotricose felina, principalmente em regiões onde ocorrem epizootias, em virtude de ser um método sensível, prático, rápido e barato (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015). A sensibilidade deste método para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* sp. varia de 78,9 a 84,9% (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015). Em nosso estudo, o CPT apresentou uma sensibilidade similar às descritas previamente, até porque a população de gatos incluída nos estudos foram provenientes da mesma região. Contudo, esse método pode apresentar baixa especificidade, uma vez que casos falsos positivos foram descritos, principalmente quando a leitura das lâminas for realizada por observadores com menor experiência (SILVA et al., 2015). Isto é particularmente importante em áreas não endêmicas, onde a esporotricose não é frequentemente descrita e a suspeita dessa doença pode não ser considerada inicialmente, mesmo em quadros clínicos compatíveis.

Em áreas não endêmicas, o exame histopatológico pode ser uma alternativa para o diagnóstico da esporotricose felina, pois permite a realização de exame de forma retrospectiva e pode ser empregada quando a suspeita clínica de esporotricose não foi considerada no momento da realização da biópsia.

Diferente do que ocorre na esporotricose felina, em seres humanos e cães, o método histológico com o uso da IPG não apresenta sensibilidade elevada, uma vez que nessas espécies, a quantidade de estruturas leveduriformes nas lesões cutâneas

geralmente é escassa. Em um estudo realizado em cães com esporotricose apresentando lesões cutâneas, MIRANDA e colaboradores (2011) descreveram sensibilidade de 43,7% com a utilização desta técnica. Em humanos, a sensibilidade deste método foi 35,3% em estudo realizado por Quintella e colaboradores (2011) em 119 pacientes.

A ocorrência de lesões cutâneas com carga fúngica elevada em seres humanos e cães, está geralmente associada a fatores imunossupressores, como desnutrição, uso de corticosteróides e a presença de doenças concomitantes, especialmente as que causam imunodeficiência, como a AIDS (ROCHA *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2002; SCHUBACH *et al.*, 2006; BERNSTEIN *et al.*, 2007; CAFARCHIA *et al.*, 2007).

Os gatos apresentam elevada susceptibilidade para aquisição da infecção por *Sporothrix* sp., em virtude dos seus hábitos e da alta virulência do patógeno, o que determina a complexa interação patógeno-hospedeiro-ambiente e a manutenção da epidemia (MONTENEGRO *et al.*, 2014). Sendo assim, nestes animais, as lesões cutâneas de causadas pelo *Sporothrix* sp. frequentemente apresentam alta carga fúngica e desta forma, as estruturas leveduriformes são visualizadas mais facilmente, independentemente do método utilizado. MIRANDA e colaboradores (2013) detectaram este fungo em 79 casos felinos (94.0%) pela técnica da IPG e um alto percentual foi observado em lesões de gatos apresentando múltiplas lesões cutâneas. Entretanto, em alguns casos, a baixa carga fúngica é descrita, sobretudo em gatos com poucas lesões (MIRANDA *et al.*, 2013) e pode representar um obstáculo à performance deste método.

A combinação das três técnicas estudadas - CPT, IPG e IHQ - elevou a sensibilidade do diagnóstico da esporotricose felina em relação ao uso das mesmas técnicas isoladamente. A IPG mostrou-se discretamente mais sensível (91,3%) do que a IHQ, obtendo um melhor desempenho quando comparada às outras técnicas. Ressalta-

se, contudo, que a combinação das técnicas IPG e IHQ foi capaz de diagnosticar um número maior de casos do que em cada uma isoladamente e a concordância entre os três testes foi baixa nos casos negativos. É possível que a discordância entre as técnicas tenha ocorrido em casos com baixa carga fúngica, os quais de fato, representam maior dificuldade para o diagnóstico e para os quais a avaliação destas técnicas e a sua disponibilidade torna-se particularmente útil. Em casos inconclusivos, notadamente aqueles com baixa carga fúngica, a confirmação com a IHQ, que é um método mais específico em virtude da ligação antígeno-anticorpo, pode ser útil.

A CPT, IPG e IHQ apresentaram elevada sensibilidade para o diagnóstico da esporotricose, com magnitude de diferenças bem parecidas. Embora a sensibilidade do CPT tenha sido levemente inferior a IHQ e IPG, recomendamos fortemente seu uso rotineiro para o diagnóstico da esporotricose felina, principalmente em situações de epizootia. A rapidez, praticidade e baixo custo deste método proporcionam em caso de positividade a instituição do tratamento antifúngico precoce nos gatos, o que pode por consequência aumentar as chances de cura clínica e reduzir o risco de transmissão de *Sporothrix* sp. para humanos e outros animais. E, considerando o alto potencial dos gatos na transmissão desse fungo e o aumento da descrição da doença em diferentes regiões geográficas, é importante que a esporotricose seja considerada como diagnóstico diferencial em quadros clinicamente compatíveis e diante de lesões granulomatosas supurativas. Nestes casos, a investigação de estruturas leveduriformes em cortes histológicos é altamente recomendada e a disponibilidade das técnicas descritas neste estudo pode garantir o diagnóstico de quase 100% dos casos, mesmo que houvesse a impossibilidade da realização da cultura fúngica.

Uma das lacunas no estudo da esporotricose felina diz respeito a escassez de trabalhos sobre a quantificação da carga fúngica nas lesões cutâneas. Sabe-se que de

uma forma geral esta espécie animal apresenta uma carga fúngica superior a encontrada nos seres humanos e cães. Entretanto, apenas um estudo até o momento quantificou as estruturas leveduriformes presentes nas lesões cutâneas felinas por meio de histopatologia utilizando a IPG (MIRANDA et al., 2013), demonstrando que os gatos com lesões cutâneas localizadas em três ou mais sítios anatômicos apresentavam uma maior carga fúngica. Tal fato está diretamente relacionado com o número de neutrófilos observados na lesão (MIRANDA et al., 2013; MORGADO et al., 2011), numa relação inversa, ou seja animais com alta carga fúngica apresentam uma menor intensidade de neutrófilos.

A não existência de dados na literatura a respeito do isolamento do *Sporothrix* sp. após o início do tratamento antifúngico, assim como a quantificação da carga fúngica ao longo deste, representam outras lacunas no conhecimento dessa micose. A ausência desses dados foi um dos motivos para realização deste estudo, mesmo sabendo das dificuldades e limitações, dentre as quais destacamos: o acompanhamento clínico e laboratorial de um grande número de gatos, as diferentes apresentações clínicas dos gatos, a realização de diferentes técnicas de diagnóstico e a dependência da adesão do responsável pelo gato para realização dos procedimentos do estudo.

O desconhecimento sobre o percentual de isolamento do *Sporothrix* sp. em gatos com suspeita de esporotricose, que ao procurarem atendimento clínico em um serviço veterinário já se encontrem sob tratamento antifúngico empírico, fato relativamente comum em áreas de epizootia, pode em muitas ocasiões levar a resultados falso negativos; pois conforme foi demonstrado em nosso estudo, em alguns casos, após um mês de tratamento com itraconazol, não é mais possível isolar o fungo, entretanto, o gato ainda apresenta lesões. O mesmo raciocínio pode ser feito em relação ao CPT.

A diminuição significativa da carga fúngica nas lesões cutâneas, incluindo as persistentes e àquelas em gatos cujo desfecho final foi a falência terapêutica, sugere que gatos sob tratamento antifúngico podem não representar um papel central na cadeia de transmissão do *Sporothrix* sp., mesmo aqueles que apresentavam elevada carga fúngica inicialmente. A redução marcante da quantidade de estruturas leveduriformes observada após o primeiro mês de tratamento com o itraconazol indica que a redução do potencial zoonótico pode ocorrer precocemente.

Recentemente, MIRANDA e colaboradores (2016) observaram que a intensidade da carga fúngica em gatos com esporotricose parece estar associada a diferentes padrões de resposta imune, e que lesões com carga fúngica elevada apresentam geralmente uma resposta inflamatória pouco organizada. Ressalta-se que formas graves da doença, associadas a lesões com grande quantidade de leveduras são frequentes em gatos, independentemente da coinfeção com retrovírus felinos, sabidamente causadores de imunossupressão. Os gatos com múltiplas lesões cutâneas e com maior carga fúngica tenderam a apresentar lesões persistentes e falência terapêutica. Uma vez que o balanço adequado da resposta imune parece estar associado a lesões mais localizadas e com menor carga fúngica, a manutenção de um bom estado geral pode contribuir para maior chance de cicatrização e de cura clínica, com conseqüente controle da transmissão.

Deve-se ressaltar que a espécie reconhecida como agente etiológico da esporotricose felina no Rio de Janeiro, *S. brasiliensis*, é descrita como mais virulenta em relação a outras espécies do complexo *Sporothrix* sp. e associada à disseminação pelo organismo e carga fúngica elevada (ALMEIDA-PAES et al., 2015). Desta forma, a alta frequência de lesões em gatos com carga fúngica elevada descrita nessa micose no Rio de Janeiro, pode ser explicada parcialmente pela prevalência deste agente nesta região. É importante considerar que a infecção por espécies menos virulentas podem

não levar a carga fúngica elevada, dificultando o diagnóstico, conforme mencionado anteriormente.

Neste estudo, a avaliação das lesões de esporotricose felina ao longo do tratamento confirma a importância da instituição precoce da terapia antifúngica como medida de controle da transmissão do *Sporothrix* sp. para seres humanos, cães e gatos, contribuindo desta forma para o controle da epidemia. Paralelamente, este acompanhamento pode ser considerado como um dos parâmetros para a avaliação da resposta terapêutica.

7. CONCLUSÃO

- A padronização da reação de imuno-histoquímica detectou estruturas leveduriformes de *Sporothrix* sp. em cortes histológicos de lesões cutâneas de gatos na diluição de 1:4000 do soro policlonal anti-*Sporothrix* sp.
- Em relação a sensibilidade das técnicas avaliadas no diagnóstico da esporotricose felina, a IPG foi a mais sensível, seguida pela IHC e pela CPT. E a combinação dessas três técnicas - CPT, IPG e IHC - elevou a sensibilidade do diagnóstico em relação ao uso das mesmas técnicas isoladamente.
- Os gatos do grupo L3 apresentaram uma carga fúngica maior quando comparados aos gatos dos grupos L1 e L2. A redução gradual da carga fúngica foi observada no CPT após o primeiro mês de tratamento com o itraconazol.
- A carga fúngica observada antes do início do tratamento antifúngico foi maior naqueles que apresentaram o desfecho de falência terapêutica. Após um mês de tratamento, a cicatrização ou ausência do crescimento de *Sporothrix* sp. ocorreu na maioria das lesões cutâneas estudadas.

8. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, R. et al. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes Infection**. v. 11, p. 554-562, 2009.
- BARROS, M.B. et al. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Publica**. v. 27: p. 455-60, 2010.
- BARROS, M.B., ALMEIDA-PAES, R., SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 24: p. 633-654, 2011.
- BARROS, M.B. et al. Positive Montenegro skin test among patients with sporotrichosis in Rio de Janeiro. **Acta Tropica**. v. 93: p. 41-7, 2005.
- BARROS, M.B. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Disease**. v. 38: p. 529-535, 2004.
- BEURMANN L, GOUGEROT H. Les sporotrichoses hypodermiques. **Annales de Dermatologie et de Syphiligraphie**. v. 7: p. 993-1006, 1096.
- BORGES, T.S. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). **Mycopathologia**. v. 176: p. 129-137, 2013.
- BUSTAMANTE, B. & CAMPOS, P.E. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**. v. 2: p. 85-94, 2004.
- CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**. v. 53: p. 3–14, 2015.
- CHAVES, A.R. et al. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis - Study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**. v. 60: p. 149-153, 2013.

CLINKENBEARD, K.D. Diagnostic cytology: sporotrichosis. **Compêndio de Educação Continuada Veterinária**. v. 13: p. 207–211, 1991.

COLES, F.B. et al. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. **American of Journal Epidemiology**. v. 136: p. 475-487, 1992.

COSTA, E.O. et al. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals, São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**. v. 125: p. 19-22, 1994.

COWELL, R.L. et al. Selected infectious agents. In: Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH, DeNicola DB, editors. **Diagnostic cytology and hematology of the dog and cat**. 3rd ed. Saint Louis: Mosby - Elsevier; p. 47-62, 2008.

CROTHERS, S.L. et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**. v. 20: p. 249-259, 2009.

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**. v. 20 (Edição Comemorativa): p. 8-28, 2013.

DAVIES, C. & TROY, G.C. Deep mycotic infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 32: p. 380-391, 1996.

DONADEL, K. et al. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 68: p. 45-52, 1993.

FERNANDES, G.F. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Veterinary Microbiology**. v. 147: p. 265-73, 2011.

FREITAS, D., MIGLIANO, M., ZANI, N.L. Esporotricose - Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Revista Faculdade de Medicina Veterinária São Paulo**. v. 5: p. 601-604, 1956.

FREITAS, D. et al. Esporotricose em cães e gatos. **Revista Faculdade Medicina Veterinária São Paulo**. v. 7: p. 381-387, 1965.

GREMIÃO, I.D.F. et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**. v. 53: p. 15-21, 2015.

GREMIÃO, I.D.F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**. v. 89: p. 346-51, 2011.

GREMIÃO, I.D.F. et al. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 34: p. 221-223, 2006.

HEKTOEN, L. & PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 55: p. 77-89, 1900.

HELM, M.A.F. & BERMAM, C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. In: Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association**. p. 59-47, 1947.

HONSE, C.O. et al. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Record**. v. 166: p. 208-9, 2010.

HU S. et al. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41: p. 1414-8, 2003.

KANBE, T. et al. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. **Journal of Dermatological Science**. v. 38: p. 99-106, 2005.

KANO, R. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**. v. 44: p. 261-5, 2001.

KAUFFMAN, C.A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Disease**. v. 29: p. 231-23, 1999.

KAUFFMAN, C.A. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Disease**. v. 45: p. 1255-1265, 2007.

KWON-CHUNG, K. & BENNET, J. Sporotrichosis. In: Kwon-Chung K, Bennet J, editors. **Medical Mycology**. 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger. p. 707-729, 1992.

IACHINI, R. Sporotrichosis in a domestic cat. **Revista Argentina de Microbiologia**. v. 41: p. 27, 2009.

LEÃO, A., SILVA, J., PROENÇA, M. Sur un cas de sporotrichose a *Sporotrichum Beurmanni*, observé pour la première fois chez un mulet a Rio de Janeiro. **Comptes Rendus des Séances et Mémoires de la Société de Biologie**. v. 116: p. 1157-1158, 1934.

LEME, L.R. et al. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**. v. 50: p. 210-4, 2007.

LONDERO, A & RAMOS, C. Esporotricose. Estudo de 195 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**. v. 24: p. 104-106, 1980.

LOPEZ-ROMERO, E. et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**. v. 6: p. 85-102, 2011.

LUTZ, A. & SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Revista Médica de São Paulo**. v. 21: p. 433-450, 1907.

MADRID, I.M. et al. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**. v. 173: p. 265-273, 2012.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45: p. 3198-3206, 2007.

MARQUES, M.E.A. et al. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. **Journal of Clinical Pathology**. v. 45: p. 1089-93, 1992.

MIRANDA, L.H. et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology Microbiology & Infection Disease**. v. 36: p. 425-432, 2013.

MIRANDA, L.H. et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **The Veterinary Journal**. v. 190: p. 408-411, 2011.

MONTENEGRO, H. et al. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**. v. 10: p. 269, 2014.

MORGADO, F. et al. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. **Medical Mycology**. v. 49: p. 612–620, 2011.

MOSKOWITZ, L.B. et al. Immunohistological identification of fungi in systemic and cutaneous mycoses. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**. v. 110: p. 433-436, 1986.

NOBRE, M.O. et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v. 18: p. 137-140, 2001.

OLIVEIRA, M.M. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**. v. 172: p. 257-267, 2011.

PAPPAS, P.G. et al. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Disease**. v. 30: p. 65-70, 2000.

PEREIRA, S.A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 47: p. 392-393, 2014.

PEREIRA, S.A. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 13: p. 220-223, 2011.

PEREIRA, S.A. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**. v. 166: p. 290-4, 2010.

PEREIRA, S.A. et al. Therapeutic aspects of feline sporotrichosis. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 37: p. 311-21, 2009.

RAMOS-VARA, J.A. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. v. 42: p. 405-26, 2005.

READ, S.I. & SPERLING, L.C. Feline sporotrichosis – Transmission to man. **Archives of Dermatology**. v. 118: p. 429-31, 1982.

REIS, E.G. et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medical and Surgery**. v. 14: p. 399-404, 2012.

REIS, R.S. et al. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**. v. 104: p. 769–774, 2009.

RIPPON, J. Sporotrichosis. In: Rippon J, editor. **Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988. p. 325-352.

RODRIGUES, A.M., DE HOOG, G.S., DE CAMARGO, Z.P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Negl Trop Diseases**. v. 9: e0004190, 2015.

RODRIGUES, A.M. et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 55: p. 233-4, 2013.

RODRIGUEZ, G. & SARMIENTO, L. The asteroid bodies of sporotrichosis. **American Journal of Dermatopathology**. v. 20: p. 246-49, 1998.

ROSSER, E. & DUNSTAN, R. Sporotrichosis. In: Greene CE, editor. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.

SANTOS, I.B. et al. Sporotrichosis - The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 143: p. 1-6, 2007.

SCHENCK, B.R. On Refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**. v. 240: p. 286-90, 1898.

SCHUBACH, T.M., MENEZES, R.C., WANKE, B. Sporotrichosis. In: Greene EC. **Infectious diseases of the dog and cats**. 4th ed. Missouri: Elsevier. p. 645-650, 2012.

SCHUBACH, A., BARROS, M.B., WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 21: p. 129-33, 2008.

SCHUBACH, T.M. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**. v. 44: p. 87-92, 2006.

SCHUBACH, T.M. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 224: p. 1623-9, 2004a.

SCHUBACH, T.M. et al. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. **Journal of Small Animal Practice**. v. 44: p. 395-398, 2003a.

SCHUBACH, TM, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**. v. 153: p. 83-86, 2002.

SCHUBACH, T.M. et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**. v. 152: p. 172-175, 2003b.

SCHUBACH, T.M. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**. v. 39: p. 147-149, 2001.

SCHUBACH, T.M. et al. *Sporothrix schenckii* isolation from blood clot of naturally infected cats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 41: p. 404-408, 2004b.

SCHWARZ, J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. **Human Pathology**. v. 13, p. 519-33, 1982.

SCOTT, D., MILLER, W., GRIFFIN, C. Doenças fúngicas da pele. In: Scott D, Muller G, Griffin C, editors. Muller & Kirk - **Dermatologia de pequenos animais**. 5th ed. Rio de Janeiro: Interlivros Edições Ltda. p. 301-369, 1996.

SILVA, M.B. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 28: p. 1867-1880, 2012.

SILVA, J.N. et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**. 1–5, 2015.

SOUZA, C.P., et al. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medical and Surgery**. v. 18: p. 137-143, 2016.

TABOADA, J. Systemic mycoses. In: Ettinger S, Feldman E, editors. Textbook of veterinary internal medicine - **Diseases of the dog and cat**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. p. 453-476, 2000.

WELSH, R.D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 223: p. 1123-6, 2003.

WERNER, A.H. & WERNER, B.E. Sporotrichosis in man and animal. **International Journal of Dermatology**. v. 33: p. 692-700, 1994.

YEGNESWARAN, P.P. et al. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. **International Journal of Dermatology**. v. 48: p. 1198-1200, 2009.

ZHANG, Y. et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14.000 human and animal case reports. **Persoonia**. p. 1-20, 2015.

9. ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUIÇÃO: INSTITUTO DE PESQUISA CLÍNICA EVANDRO CHAGAS / IPEC – FIOCRUZ

Coordenadora da Pesquisa: Jéssica Nunes Silva

Endereço: Avenida Brasil, 4365 – Manguinhos – Rio de Janeiro / RJ – CEP 21045-900
Telefone (0XX21) 3865-9536

Nome do Projeto: Avaliação da viabilidade do *Sporothrix schenckii* proveniente de gatos sob terapia antifúngica na cultura e exame citopatológico

Nome do paciente: _____ **Prontuário:** _____

Nome do responsável: _____

A esporotricose é uma doença infecciosa causada por espécies do complexo *Sporothrix schenckii* e que acomete homens e animais, incluindo cães e gatos. Os gatos são animais bastante sensíveis a essa doença e costumam adquiri-la quando vão as ruas e brigam com outros gatos doentes. É uma zoonose, isto é, uma doença que pode ser naturalmente transmissível entre animais e seres humanos. Desde 1998 a ocorrência dessa micose em cães, gatos e seres humanos têm aumentado muito na cidade do Rio de Janeiro e arredores.

O presente documento tem o objetivo de esclarecê-lo sobre a pesquisa que será realizada, prestando informações, explicando os procedimentos e exames, benefícios e inconvenientes.

Você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica que será realizada no IPEC – FIOCRUZ, com o seguinte objetivo:

- Avaliar a viabilidade do fungo através da cultura e quantificar as estruturas leveduriformes no exame citopatológico antes e durante o tratamento antifúngico.

Serão quantificadas a carga parasitária das lesões cutâneas felinas através do exame citopatológico (duas técnicas de coloração: método panótico rápido e Grocott).

O conhecimento desses dados são importantes no que diz respeito as medidas de controle e profilaxia da esporotricose.

A participação de seu gato neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a permitir a participação dele no estudo ou retirá-lo a qualquer instante, bem como está garantido o atendimento de rotina no LAPCLIN-DERMZOO. O médico veterinário também poderá interromper a participação do seu gato a qualquer momento, se julgar necessário. Para que seu gato participe desse projeto, você deverá autorizar a realização de exames e posterior acompanhamento da doença. Serão realizadas fotografias em todas as consultas para o acompanhamento do tratamento. Os exames, procedimentos e medicações contra o fungo serão oferecidos de forma gratuita pela Instituição.

Os resultados desse estudo poderão ou não beneficiar diretamente a você e o seu animal, mas no futuro poderão beneficiar outros animais e pessoas com a mesma doença.

Os resultados dessa pesquisa serão publicados, preservando o anonimato e em caso de necessidade, as informações médicas estarão disponíveis para toda a equipe médica veterinária envolvida, para a Comissão de Ética no Uso de Animais da FIOCRUZ, para autoridades sanitárias e para você.

Você pode e deve fazer todas as perguntas que achar necessárias à equipe de médicos veterinários antes de concordar que seu gato participe dos estudos, assim como durante o tratamento.

Procedimentos, exames e testes que poderão ser utilizados:

Antes do início do tratamento, será realizado exame clínico geral e exame dermatológico que consistirá na coleta da secreção da lesão ulcerada para o exame citopatológico e cultura.

Após o início do tratamento, o animal deverá ser trazido ao LAPCLIN-DERMZOO a cada 30 dias durante o tempo de estudo para a realização dos exames. Após a cura, o gato deverá ser trazido em três meses para reavaliação clínica e laboratorial.

Todos os animais incluídos no estudo receberão gratuitamente o antifúngico sistêmico mensalmente, de acordo com a prescrição do médico veterinário responsável. Os animais poderão ser acompanhados no LAPCLIN-DERMZOO após o término do estudo, caso a esporotricose reapareça.

Inconvenientes:

Poderá ocorrer um leve desconforto do animal no momento da contenção física para a coleta dos exames. Nos casos de lesões ulceradas recobertas por crostas, poderá ocorrer sangramento leve até que ocorra a hemostasia definitiva.

Benefícios esperados:

Após a implementação do tratamento antifúngico sistêmico regular espera-se que ocorra a diminuição da carga parasitária nas lesões cutâneas felinas e da viabilidade do agente etiológico, com conseqüente redução da chance de transmissão do fungo para seres humanos e outros animais.

Declaro que li e entendi todas informações relacionadas ao estudo em questão e que todas as minhas perguntas foram adequadamente respondidas pela equipe médica veterinária, a qual estará a disposição sempre que eu tiver dúvidas a respeito dessa pesquisa.

Recebi uma cópia deste termo e pelo presente consinto voluntariamente com a participação do meu gato neste estudo.

Nome do responsável pelo gato _____ Data _____

Nome do médico veterinário _____ Data _____