

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO PROFISSIONAL EM PESQUISA CLÍNICA

**AVALIAÇÃO DO EXAME CITOPATOLÓGICO CORADO PELOS MÉTODOS
PANÓTICO RÁPIDO, ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF E IMPREGNAÇÃO PELA
PRATA DE GROCOTT E DA CULTURA FÚNGICA NO DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA**

Fernanda Prado Roque Ferreira

Orientador (es): Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Dr. Sandro Antonio Pereira

Rio de Janeiro

2022

Fernanda Prado Roque Ferreira

**AVALIAÇÃO DO EXAME CITOPATOLÓGICO CORADO PELOS MÉTODOS
PANÓTICO RÁPIDO, ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF E IMPREGNAÇÃO PELA
PRATA DE GROCOTT E DA CULTURA FÚNGICA NO DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do
Instituto Nacional de Infectologia Evandro
Chagas, para obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Dr. Sandro Antônio Pereira

Rio de Janeiro

2022

Fernanda Prado Roque Ferreira

**AVALIAÇÃO DO EXAME CITOPATOLÓGICO CORADO PELOS MÉTODOS
PANÓTICO RÁPIDO, ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF E IMPREGNAÇÃO PELA
PRATA DE GROCOTT E DA CULTURA FÚNGICA NO DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE FELINA E CANINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica do Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas, para obtenção do grau de mestre.

Orientador (es): Dr. Rodrigo Caldas Menezes
Dr. Sandro Antonio Pereira

Aprovada em 25 / 07 / 2022

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fernanda Nazaré Morgado (Presidente)
Doutora em Ciências
IOC- FIOCRUZ

Dra. Cintia Xavier de Mello (Membro)
Doutora em Ciências
IOC- FIOCRUZ

Dra. Viviane Cardoso Boechat (Membro)
Doutora em Ciências
INI- FIOCRUZ

Dra. Isabella Dib Ferreira Gremião (Suplente)
Doutora em Ciências
INI- FIOCRUZ

À Deus, por me proporcionar tamanho
aprendizado.
Aos meus pais, José Carlos Lourenço Roque e
Aurete Prado Roque, por nunca duvidarem de
minha capacidade.
Ao meu esposo Luiz Cláudio Ferreira e minha filha
Mariana Prado Roque Ferreira, toda gratidão por
sempre apoiarem meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas pela oportunidade oferecida aos alunos do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Aos meus orientadores, Dr. Rodrigo Caldas Menezes e Dr. Sandro Antonio Pereira, por acreditarem e confiarem em mim. Obrigada por tanta delicadeza em todas as ações.

Ao Luiz Cláudio Ferreira do laboratório de Anatomia Patológica, meu esposo e o maior incentivador que poderia ter.

Ao amigo Antônio Carlos da Silva do laboratório de Anatomia Patológica, pela grande parceria e amizade.

Às minhas amigas e colegas de profissão Isabela Maria da Silva Antonio e Maria Lopes Corrêa, pela imensa contribuição, paciência e amizade durante todo projeto, além do carinho e amor por mim e aos animais.

Aos amigos do LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz Isabella Dib Ferreira Gremião, Thais Nascimento, Maria Emília Lima da Silva, Cindy Caroline dos Santos Honorato, Gabriela Reis Pereira de Oliveira, Lucas Keidel Oliveira, Renato Orsini Ornellas, Adilson Benedito de Almeida, Artur Augusto Velho Mendes Júnior, André Felipe Pedrazzi Chacon, Bruno Fiore Castro Figueiredo e Anna Barreto Fernandes Figueiredo trabalhar com vocês torna a vida mais produtiva, divertida e feliz. Muito obrigada por me deixarem fazer parte da família.

Aos amigos da turma do mestrado: Cristiane Regina Vinissius de Castro e Jeferson Tobias da Silva de Oliveira pelos momentos compartilhados e valiosa amizade.

Ao Rodrigo de Almeida Paes do Laboratório de Micologia pela imensa ajuda ao longo desse projeto.

Ao Serviço de Anatomia Patológica do INI/Fiocruz pela disponibilidade e a oportunidade do aprendizado.

À Fundação Oswaldo Cruz, CAPES, FAPERJ (Programa Jovem Cientista do Nosso Estado, projeto número E-26/202.737/2019) e ao LAPCLIN-DERMZOO/INI/FIOCRUZ pelo apoio financeiro a este projeto.

FERREIRA, Fernanda Prado Roque. Gênero, Ciência & Tecnologia e Saúde: avaliação do exame citopatológico corado pelos métodos panótico rápido, ácido periódico de schiff e impregnação pela prata de grocott e da cultura fúngica no diagnóstico da esporotricose felina e canina. 2022. 110 f. Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2022.

RESUMO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por espécies do gênero *Sporothrix* que acomete seres humanos e animais, principalmente os gatos. O diagnóstico precoce é importante na rápida implementação do tratamento e das medidas de prevenção. O presente estudo compara o exame citopatológico de lesões cutâneas corados pelos métodos panótico rápido, ácido periódico de Schiff (PAS) e impregnação pela prata de Grocott (IPG) com a cultura fúngica para o diagnóstico da esporotricose felina e canina. Foram utilizadas 32 amostras de gatos e 4 amostras de cães, sem tratamento (9 gatos e 3 cães) ou em tratamento (23 gatos e 1 cão), no período de março a dezembro de 2021. A coleta de material para o exame citopatológico consistiu em *imprints* de exsudato da lesão cutânea ulcerada. Foram coletados um *swab* estéril para cultura fúngica e três lâminas de *imprint* da mesma lesão, que foram coradas pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG. As lâminas foram examinadas em microscópio óptico por dois observadores. Foram calculadas as frequências de positividade do exame citopatológico para cada uma das três colorações e cultura fúngica. A sensibilidade do exame citopatológico para cada uma das colorações foi calculada utilizando a cultura fúngica como padrão de referência. A frequência de positividade para *Sporothrix* spp. nos gatos em tratamento e sem tratamento com antifúngico foram, respectivamente: 91,3% e 88,8% para cultura, 69,5% e 55,5% para o PAS, 69,5% e 66,6% para IPG, 60,8% e 44,5% para o panótico rápido. Em cães, as frequências de positividade foram 75% na cultura, 50% no PAS, 25% na IPG e 0% no panótico rápido. A sensibilidade do exame citopatológico nos gatos em tratamento e sem tratamento foram, respectivamente: 71,4% e 50% no PAS e na IPG, 66,6% e 37,5% no panótico rápido. Nos cães, a sensibilidades dos exames citopatológicos foram 66,6% no PAS e 0% na IPG e panótico rápido. A concordância interobservador foi razoável. O tempo de leitura do exame citopatológico foi menor no PAS (361 s) e IPG (487 s) em comparação com o panótico rápido (545 s). Os exames citopatológicos pelo PAS e IPG foram úteis no diagnóstico da esporotricose, detectando mais casos positivos e de leitura mais rápida que o panótico rápido. São técnicas rápidas, práticas e não necessitam de equipamentos sofisticados. Com base nesses resultados, o PAS e IPG podem ser aplicadas no diagnóstico citológico da rotina como alternativas ao panótico rápido, sobretudo na indisponibilidade da cultura, porém há necessidade de treinamento adequado do observador.

Palavras-chave: *Sporothrix* spp., Diagnóstico, Zoonose, Caninos, Felinos.

FERREIRA, Fernanda Prado Roque. Gender, Science & Technology and Health: evaluation of cytopathological examination stained by rapid panoptic methods, periodic acid schiff and impregnation with grocott silver and fungal culture in the diagnosis of feline and canine sporotrichosis. 2022. 110 f. Dissertation (Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Rio de Janeiro, 2022.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by species of the genus *Sporothrix* that affects humans and animals, especially cats. Early diagnosis is important in the rapid implementation of treatment and prevention measures. The present study compares the cytopathological examination of skin lesions stained by the rapid panoptic, periodic acid Schiff (PAS) and Grocott silver impregnation (IPG) methods with fungal culture for the diagnosis of feline and canine sporotrichosis. We used 32 samples from cats and 4 samples from dogs, untreated (9 cats and 3 dogs) or undergoing treatment (23 cats and 1 dog), from March to December 2021. The collection of material for the cytopathological examination consisted of in exudate imprints from the ulcerated skin lesion. A sterile swab for fungal culture and three imprint slides of the same lesion were collected, which were stained by rapid panoptic, PAS and IPG methods. The slides were examined under light microscopy by two observers. The frequencies of positive cytopathological examination were calculated for each of the three stains and fungal culture. The sensitivity of the cytopathological examination for each of the stains was calculated using the fungal culture as a reference standard. The frequency of positivity for *Sporothrix* spp. in treated and untreated with antifungal cats were, respectively: 91.3% and 88.8% for culture, 69.5% and 55.5% for PAS, 69.5% and 66.6% for IPG, 60.8% and 44.5% for fast panoptic. In dogs, the positivity frequencies were 75% in culture, 50% in PAS, 25% in IPG and 0% in rapid panoptic. The sensitivity of the cytopathological examination in treated and untreated cats were, respectively: 71.4% and 50% in PAS and IPG, 66.6% and 37.5% in rapid panoptic. In dogs, the sensitivities of the cytopathological exams were 66.6% in PAS and 0% in IPG and rapid panoptic. Interobserver agreement was reasonable. The reading time of the Pap smear was shorter in PAS (361 s) and IPG (487 s) compared to rapid panoptic (545 s). The cytopathological examinations by PAS and IPG were useful in diagnosing sporotrichosis, detecting more positive cases and reading faster than rapid panoptic. These are fast, practical techniques and do not require sophisticated equipment. Based on these results, PAS and IPG can be applied in routine cytological diagnosis as alternatives to rapid panoptic, especially in the absence of culture, but there is a need for adequate training of the observer.

Key words: *Sporothrix* spp., Diagnosis, Zoonosis, Dogs, Cats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Procedimentos de coleta de amostras para realização da cultura fúngica e dos exames citopatológicos em lesão cutânea ulcerada de gato. (A) Limpeza da lesão na orelha com gaze a fim de retirar resíduos e crostas hemáticas; (B) Coleta do material exudativo da lesão cutânea com auxílio de *swab* estéril para o exame de cultura micológica; (C) Coleta do material exudativo por meio de *imprint* da lesão cutânea em lâmina de vidro para os exames citológicos corados pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG.....43

Figura 2 - Três lâminas de material exudativo de lesão cutânea coletadas por meio de *imprint* dessa lesão, sendo uma para o panótico rápido, uma para o PAS e uma para o IPG. Em cada lâmina foram realizados três *imprints* da mesma lesão.....43

Figura 3 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea de gato corado pelo método panótico rápido com presença de leveduras arredondadas ou em formato de charuto no citoplasma de macrófagos ou extracelulares, compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta). As leveduras apresentavam núcleo rosa redondo, citoplasma azul, com halo incolor ao redor.....48

Figura 4 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea ulcerada de gato corado pelo PAS com presença de leveduras de coloração púrpura-magenta, arredondadas, algumas com unibrotamento de base estreita, ou em forma de charuto compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta)48

Figura 5 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea de gato corado pelo IPG com presença de estruturas leveduriformes negras, arredondadas, algumas com

unibrotamento de base estreita, ou em forma de charuto compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta)48

Figura 6 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada corado pelo panótico rápido e positivo para leveduras de *Sporothrix* spp. que apresentavam citoplasma azul, núcleo rosa e halo incolor ao redor, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.....51

Figura 7 - Exames citopatológicos de *imprint* de lesão ulcerada corado pelo PAS e positivos para leveduras de *Sporothrix* spp. marcadas em púrpura magenta, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.....51

Figura 8 - Exames citopatológicos de *imprint* de lesão ulcerada corados pelo IPG e positivos para leveduras de *Sporothrix* spp. marcadas em negro, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.....52

Figura 9 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada de gato corado pelo panótico rápido mostrando levedura de *Sporothrix* spp. (seta) e excesso de hemácias (círculo)52

Figura 10 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada de gato corado pelo PAS e IPG. (A) PAS e (B) IPG com *imprint* espesso resultando na hiperpigmentação do material coletado.....53

Figura 11 - Número de gatos incluídos no estudo de acordo com os municípios de origem no estado do Rio de Janeiro, no período de março a dezembro de 202153

Figura 12 - Tipos de lesões cutâneas causadas por *Sporothrix* spp. em gatos. (A) Lesão ulcerada com crosta hemática e melicélica na ponte nasal; (B) Nódulos ulcerados na

região nasal. Animais diagnosticados com esporotricose: positivos na cultura fúngica, PAS e IPG.....55

Figura 13 – Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em gatos (A) Nódulos ulcerados seguindo trajeto de vasos linfáticos (Linfangite nodular ascendente) em membro pélvico. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica, PAS e IPG.....55

Figura 14 - Gato com esporotricose apresentando lesão cutânea ulcerada no dígito 1 do membro torácico direito em tratamento prévio com antifúngico oral. Resultado positivo no exame citopatológico corado pela IPG e resultado negativo na cultura fúngica. (A) Bom estado clínico geral. (B) Lesão ulcerada no dígito do membro torácico.....56

Figura 15 - Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em gatos previamente tratados. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....59

Figura 16 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em gatos sem tratamento. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....59

Figura 17 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose nos 32 gatos incluídos no estudo. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....60

Figura 18 – Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em cães. (A) Cão fêmea em bom estado clínico geral com lesões na região torácica; (B) Três lesões ulceradas. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica e PAS.....66

Figura 19 – Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em cães. (A) Cão fêmea em bom estado clínico geral com lesão no metacarpo do membro torácico direito; (B) Uma lesão ulcerada. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica e PAS.....66

Figura 20 - Frequências de positividade da combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em gatos em amostras de lesões cutâneas e com a utilização da cultura fúngica como padrão de referência.....	31
Tabela 2 - Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em cães em amostras de lesões cutâneas e com a utilização da cultura fúngica como padrão de referência.....	32
Tabela 3 - Equipamentos necessários, tipo de armazenamento do <i>kit</i> , custo do <i>kit</i> , quantidade de colorações que o <i>kit</i> realiza, quantidade de corante do <i>kit</i> , validade do <i>kit</i> e tempo de execução para a realização das colorações pelo panótico rápido: Romanowsky da marca LB Laborclin; PAS: HISTOKIT, PAS – RUO de Ácido Periódico de Schiff da marca EasyPath e IPG: HISTOKIT, GROCOTT - RUO de Grocott da marca EasyPath.....	44
Tabela 4 – Localização anatômica das lesões cutâneas ulceradas nas quais foram procedidas as coletas de amostras em gatos. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.....	54
Tabela 5 – Resultados dos exames micológicos realizados em amostras oriundas de lesões cutâneas ulceradas de gatos previamente tratados e virgens de tratamento após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....	56

Tabela 6 – Dados clínicos, epidemiológicos, terapêuticos dos gatos com esporotricose previamente tratados com antifúngicos e o resultado das técnicas de diagnóstico avaliadas. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.....57

Tabela 7 – Dados clínicos, epidemiológicos, terapêuticos dos gatos com esporotricose virgens de tratamento antifúngico e o resultado das técnicas de diagnóstico avaliadas. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.....58

Tabela 8 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pelas técnicas de diagnóstico utilizadas (citológicas e cultura) de acordo com a distribuição das lesões cutâneas de esporotricose nas amostras de lesão cutânea coletadas dos gatos virgens de tratamento e com tratamento prévio no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....61

Tabela 9 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pelas técnicas de diagnóstico utilizadas (citológicas e cultura) de acordo com a distribuição das lesões cutâneas de esporotricose nas amostras de lesão cutânea dos gatos no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....61

Tabela 10 – Frequência de positividade das técnicas Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica de acordo com o estado clínico dos gatos virgens de tratamento e com tratamento prévio no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....62

Tabela 11 – Frequência de positividade das técnicas Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica de acordo com o estado clínico dos gatos no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....63

Tabela 12 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em gatos previamente tratados. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	64
Tabela 13 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em gatos sem tratamento. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	64
Tabela 14 – Frequência de positividade de <i>Sporothrix</i> spp. nos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos corados por diferentes técnicas de acordo com os observadores 1 e 2. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	65
Tabela 15 – Local de coleta das lesões nos cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	65
Tabela 16 - Casos positivos e negativos para <i>Sporothrix</i> pelas técnicas de Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica nos cães após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	67
Tabela 17 - Quadro com dados dos cães. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021	68
Tabela 18 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em cães. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	70

Tabela 19 – Frequência de positividade para <i>Sporothrix</i> pelas técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica após consenso dos dois observadores em cães incluídos virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	70
Tabela 20 – Frequência de positividade entre observador 1 e 2, nos cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.....	71
Tabela 21 – Média do tempo de leitura das lâminas coradas pelas técnicas de panótico rápido, PAS e IPG para detecção de <i>Sporothrix</i> spp. pelos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021	71
Tabela 22 – Concordância Inter observadores dos valores de kappa para as técnicas de panótico rápido, PAS e IPG no diagnóstico da esporotricose canina e felina em <i>imprint</i> de lesões cutâneas. Rio de Janeiro no período de março a dezembro de 2021.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PAS	Ácido periódico de Schiff
IPG	Impregnação pela prata de Grocott
PR	Panótico Rápido
IHQ	Imuno-histoquímica
HE	Hematoxilina-eosina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
BHI	Brain Heart Infusion
SsCBF	<i>Sporothrix schenckii</i> Con A Binding Fraction
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
Lapclin-Dermzoo	Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
SEAP	Serviço de Anatomia Patológica
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação

Sumário

INTRODUÇÃO	19
1.1 ESPOROTRICOSE.....	19
1.1.1 Taxonomia	19
1.1.2 Epidemiologia	20
1.1.3. Manifestações clínicas	24
1.1.3.1 Esporotricose felina	24
1.1.3.2 Esporotricose canina	24
1.1.3.3 Esporotricose humana.....	24
1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ESPOROTRICOSE EM GATOS E CÃES	25
1.2.1 Cultura fúngica	25
1.2.2 Exame citopatológico	26
1.2.3. Exame histopatológico	28
1.2.4. Imuno-histoquímica	29
1.2.5 PCR	30
1.2.6 Sorologia	30
1.3 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE	32
1.3.1 Felinos	32
1.3.2 Caninos	34
2 JUSTIFICATIVA	36
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MÉTODOS	40
4.1 AMOSTRA.....	40
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	40
4.3 EXAME CLÍNICO	40
4.3.1 Animais previamente tratados	41
4.4 COLETA DE AMOSTRAS	41
4.4.1 Cultiva fúngica	41
4.4.2 Exame citopatológico	42
4.4.2.1 <i>Kits</i> de coloração e equipamentos necessários	43
4.4.2.2 Procedimento técnico da coloração do panótico rápido	44
4.4.2.4 Procedimento técnico da coloração da IPG.....	46
4.5 LEITURA DAS LÂMINAS DE CITOPATOLOGIA	47
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49

4.8 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E TERAPÊUTICO.....	49
5 ASPÉCTOS ÉTICOS	50
6 RESULTADOS.....	51
6.1 RESULTADO DAS COLORAÇÕES	51
6.2 ALTERAÇÕES INDESEJADAS NAS LÂMINAS.....	52
6.3 RESULTADOS NOS GATOS	53
6.3.1 Dados demográficos dos gatos.....	53
6.3.2 Local da coleta das lesões no gato	54
6.3.3 Frequência de positividade para <i>Sporothrix</i> spp. das técnicas panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica nos gatos com tratamento prévio com antifúngicos e virgens de tratamento	55
6.3.7 Sensibilidade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de gatos	63
6.3.8 Frequências de positividade das técnicas citopatológicas para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de gatos de acordo com os observadores 1 e 2.....	64
6.4 RESULTADOS NOS CÃES.....	65
6.4.1 Dados demográficos dos cães	65
6.4.3 Frequência de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de cães	67
6.4.4 Informações gerais dos cães	67
6.4.5 Sensibilidade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de cães	69
6.4.6 Frequência de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de cães virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos ..	70
6.4.7 Frequências de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com <i>Sporothrix</i> spp. em lesões cutâneas de cães de acordo com o observador 1 e 2.....	71
6.5 TEMPO DE LEITURA DAS LÂMINAS CONTENDO <i>IMPRINTS</i> DE LESÃO CUTÂNEA ULCERADA DE GATOS E CÃES POR TÉCNICA DE EXAME CITOPATOLÓGICO PARA A DETECÇÃO DE ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES DE <i>Sporothrix</i> spp.....	71
7 DISCUSSÃO.....	73
8 CONCLUSÕES.....	83
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
10 ANEXOS	92

INTRODUÇÃO

1.1 ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma micose subcutânea que acomete humanos e animais e é causada por espécies do gênero *Sporothrix* (PEREIRA; GREMIÃO; MENEZES, 2015). O primeiro caso humano de esporotricose foi descrito em 1898, por Benjamin Schenck nos EUA e o agente causador foi identificado como *S. schenckii* (SCHENCK, 1898). Adolph Lutz e Affonso Splendore relataram a esporotricose em ratos marrons (*Ratus norvegicus*) na cidade de São Paulo em 1907, e também descreveram pela primeira vez, a fase parasitária de levedura do fungo. Ademais, esses autores propuseram que os ratos poderiam adquirir esporotricose por ingestão das leveduras (LUTZ; SPLENDORE, 1907). Em 1952 foi a primeira evidência de esporotricose transmitida por gato documentada nos EUA (SINGER; MUNCIE, 1952), e no estado de São Paulo em 1955, o primeiro caso humano de esporotricose associada a um gato doente foi relatado (ALMEIDA et al., 1955).

1.1.1 Taxonomia

Sporothrix sp. é um fungo termodimórfico, pode ser encontrado no meio ambiente na forma filamentosa, tendo como habitat natural a vegetação, madeira em decomposição e solo. Esse microrganismo está inserido no Reino Fungi, sendo um organismo eucariótico, heterotrófico, sem mobilidade própria, com parede celular quitinosa e rígida. Também, é constituinte da Divisão Ascomycota, da Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae (OLIVEIRA, 2009).

Até 2007, a esporotricose era atribuída a uma espécie única, *S. schenckii*. No entanto, um estudo molecular demonstrou que *S. schenckii* é um complexo de espécies que foram identificadas de forma confiável. Através deste estudo para caracterizar fenotipicamente as diferentes espécies filogenéticas do complexo *S. schenckii*, foi demonstrado que *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* eram três novas espécies de importância clínica. (MARIMON et al., 2007).

Estudos posteriores sobre a variabilidade genética desse fungo demonstraram que isolados previamente identificados morfológicamente como *S. schenckii*, passaram a ser classificados em pelo menos seis espécies com seus respectivos clados, filogeneticamente descritas como *Sporothrix brasiliensis* (Clado I), *Sporothrix schenckii sensu stricto* (Clado IIa e IIb), *Sporothrix globosa* (Clado III), *Sporothrix mexicana* (Clado IV), *Sporothrix pallida* e *Sporothrix luriei* (Clado VI) (BOECHAT et al., 2018). Algumas espécies foram relatadas no Brasil e diferem em seu potencial patogênico de acordo com a distribuição geográfica, o mamífero acometido e na sensibilidade ao tratamento antifúngico (RODRIGUES et al., 2013). Recentemente, uma nova espécie foi descrita como *S. chilensis*, relatada no Chile em um caso clínico onde o fungo foi isolado de um paciente com onicomicose (RODRIGUES et al., 2016). As fontes de isolamento publicados anteriormente de *S. chilensis* eram de origem ambiental no Chile. Posteriormente, no Brasil, isolados de *S. chilensis* foram obtidos de amostras de pele (estados de Recife e São Paulo), sendo os primeiros relatos desta espécie neste país (VALERIANO et al., 2020). Rodrigues et al. (2016) confirmaram *S. chilensis* como um clado distinto geneticamente próximo de *S. pallida*, *S. nivea*, *S. estilitas*, *S. humicola* e *Ophiostoma palmiculminatum*. De Beer, Duong e Wingfield (2016) propuseram a classificação das espécies do gênero *Sporothrix* causadoras de esporotricose em dois clados, sendo um ambiental, composto de *S. mexicana*, *S. pallida*, *S. chilensis*, *S. humicola* e/ou clínico ou patogênico, composto de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei*.

1.1.2 Epidemiologia

A esporotricose tem sido identificada em diversas áreas do mundo e, nos anos mais recentes, a maioria dos casos publicados são provenientes da América Central e do Sul, em especial, Colômbia, Peru e Brasil, além do continente africano, EUA, México, Índia, China e Malásia, (GREMIÃO et al., 2020a; OLIVEIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2020). A doença acomete humanos, gatos, cães, cavalos, bovinos, camelos, golfinhos, cabras, mulas, pássaros, porcos, ratos e tatus (RODRIGUES et al., 2013), também é descrita em quatis, felinos silvestres, primatas, tamanduá gigante, peixes, insetos e um caso em calopsita, mosquito e cobaia (RABELLO et al., 2021). *S. brasiliensis* foi encontrado no Brasil (LOPEZ-BEZERRA et al., 2018), Reino Unido (RACHMAN et al., 2022), Argentina e Paraguai (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2017) e é conhecido

por ser transmitido de gatos infectados (BENTO et al., 2021). *S. mexicana* e *S. globosa* foram identificadas em todo o mundo (SIZAR; TALATI, 2020). E, mais recentemente, foi descrito o primeiro caso de esporotricose em um gato causada por *Sporothrix pallida* na Austrália (THOMSON et al., 2019).

As duas formas de transmissão da esporotricose são por via sapronótica e zoonótica. A transmissão sapronótica (possui o ambiente como fonte de infecção do fungo), acomete principalmente trabalhadores agrícolas e jardineiros e está relacionada principalmente às espécies *S. schenckii* e *S. globosa*. Nessa forma de transmissão, a infecção ocorre após a inoculação traumática de *Sporothrix* spp. proveniente do solo ou matéria vegetal, (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011). A transmissão zoonótica e de gato para gato/cão ocorre por inoculação traumática do fungo por meio de arranhões e mordidas ou contato com o exsudado de lesões cutâneas. Na transmissão zoonótica, a espécie patogênica envolvida é o *S. brasiliensis* no Brasil, embora o *S. schenckii* também tenha sua importância no exterior. Historicamente, a forma mais comum de transmissão observada na esporotricose humana foi a sapronótica, mas infecções zoonóticas envolvendo gatos doentes e *S. brasiliensis* têm sido mais frequentes atualmente (BENTO et al., 2021; RODRIGUES et al., 2020; ROSSOW et al., 2020). *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais virulenta do gênero *Sporothrix* e pode estar associada à alta frequência de lesões graves em mucosa nasal e dos sinais respiratórios superiores em gatos (SOUZA et al., 2018). O período de incubação do *Sporothrix* spp. é 14 dias, mas pode se estender por meses, tanto em humanos quanto em animais (PEREIRA et al., 2015).

No Brasil, 8.538 casos de esporotricose animal foram relatados na literatura de 1907 à 2020, sendo 7.750 (90,77%) em gatos e 676 (7,92%) em cães (RABELLO et al., 2021). A maioria dos casos de esporotricose humana e animal ocorrem nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, mas essa doença ocorre também em Minas Gerais, Espírito Santo, Paraná e mais recentemente nas regiões norte, nordeste e Centro Oeste (GREMIÃO et al., 2020a).

Na região metropolitana do Rio de Janeiro, a mais afetada pela esporotricose, há uma hiperendemia dessa doença sob a forma de zoonose, que teve início no final da década de 1990 e está associada à espécie *S. brasiliensis* (FREITAS et al., 2014). No período de 1998 a 2018, foram diagnosticados 5.113 casos felinos no INI- Fiocruz, Rio de Janeiro. Nessa mesma instituição, cerca de 5.000 casos humanos foram diagnosticados no período de 1998 até 2015 (GREMIÃO et al., 2020a). No estado do

Rio de Janeiro, segundo o Boletim Epidemiológico Esporotricose da Secretaria de Saúde, em 2019 e 2020 foram confirmados 1.586 e 1.030 casos de esporotricose humana, respectivamente (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2021).

Além das regiões Sul e Sudeste, a doença tem se expandido para outras regiões do Brasil, como Centro Oeste, Nordeste e Norte. Em Brasília, centro-oeste do Brasil, no período de 1993 a 2018, observou-se 91 casos humanos e de 2015 a 2018 foram 4 casos de animais com esporotricose (EUDES FILHO et al., 2020). No Rio Grande do Norte, no nordeste, no período de 2016 à 2019, um estudo relata 122 pacientes humanos com esporotricose, onde 115 (94.3%) haviam tido contato com gatos (BENTO et al., 2021).

Após a obrigatoriedade da notificação de esporotricose animal e humana (2018), os primeiros casos autóctones foram detectados na cidade de Salvador- Bahia até março de 2018. Entre março e dezembro de 2018, 289 casos suspeitos foram relatados em animais (92% felinos), ilustrando como é importante a notificação de esporotricose. Desde 2014, casos de esporotricose felina e humana foram diagnosticados no Paraná, principalmente na cidade de Curitiba (capital do estado) e, segundo dados da Unidade de Vigilância de Zoonoses, entre janeiro de 2016 a agosto de 2019, 793 casos de felinos com esporotricose foram relatados (GREMIÃO et al., 2020a). Foi descrito um cão em Mossoró, RN (FILGUEIRA, 2009), outro em Juiz de Fora (SOUZA et al., 2009) e um gato relatado no Recife (SILVA et al., 2018), Mato Grosso (FERNANDES et al., 2004) e recentemente em Belém no Pará (SILVA et al., 2022).

Atualmente, *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *Sporothrix humicola* são os conhecidos agentes causadores da esporotricose felina. Casos de esporotricose felina foram relatados nos EUA, México, Argentina, Paraguai, Malásia, Espanha, Alemanha, Austrália, Japão, Tailândia, Reino Unido e Brasil (GREMIÃO et al., 2017; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2019). No Brasil, um impressionante e exponencial número de casos felinos foi documentado em vários estados, sendo o principal agente etiológico o *S. brasiliensis*. Neste país, dos 521 de isolados *Sporothrix* spp. de gatos 99,62% correspondiam ao *S. brasiliensis* e 0,38% ao *S. schenckii* (RABELLO et al., 2021). Em contraste, em alguns países asiáticos, *S. schenckii* foi descrito como o agente causal de esporotricose em gatos (GREMIÃO et al., 2020a; LOPES-BEZERRA et al., 2018).

No Brasil, a notificação compulsória dos casos humanos e animais só é feita nos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco e Distrito Federal, além dos municípios de

Guarulhos (SP), Conselheiro Lafaiete e Belo Horizonte (MG), Salvador e Camaçari (BA), Natal (RN) e João Pessoa (PB). Mesmo em regiões onde a notificação obrigatória não é realizada, os veterinários devem notificar o Departamento de Saúde local quando ocorrem casos de esporotricose animal. O Rio de Janeiro foi o primeiro estado onde a esporotricose humana e animal se tornou uma doença de notificação obrigatória (2013 e 2014, respectivamente). Desde então, todos os casos suspeitos de esporotricose humana e animal devem ser registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) de acordo com as diretrizes e rotinas estabelecidas pela Secretaria Estadual de Saúde, Departamento do Rio de Janeiro (GREMIÃO et al., 2020a). Uma das principais ações tomadas no controle da esporotricose é a castração de felinos visto que diminuem a exposição às brigas e circulam menos, minimizando os riscos de disseminação (BISON; PARENTONI; BRASIL, 2020).

A redução dos riscos para a saúde pública devido aos surtos zoonóticos, principalmente em áreas urbanas de alta densidade populacional, requer prevenção e estratégias de controle. A frequência de zoonoses aumentou nas últimas décadas e pode estar relacionado à pobreza, saneamento precário e mudanças antropogênicas no meio ambiente (GREMIÃO et al., 2020b). Um estudo mais recente utilizando 16 bancos de dados (incluindo MEDLINE e EMBASE) com pesquisas em inglês, espanhol e português que foram publicadas desde 2008 com informações sobre a *S. brasiliensis*, constatou que houve uma mudança epidemiológica da esporotricose, com um aumento drástico dos casos transmitidos por gatos e devido a sua natureza zoonótica constata-se muitas barreiras para evitar sua propagação. O conhecimento limitado deste patógeno emergente entre médicos e veterinários também torna-se uma ameaça aos esforços de contenção. Atrasos ou erros no diagnóstico e tratamentos inadequados são um potencial para a propagação da doença. Desta forma, opções de ferramentas de diagnóstico disponíveis e manejo adequado da esporotricose, devem fazer parte de campanhas educacionais com o objetivo de fornecer aos profissionais de saúde, informações com ênfase na interconexão das estratégias de controle da doença em humanos e animais. Da mesma forma, a conscientização do público e educação sobre a criação responsável de animais e principais aspectos da transmissão em áreas endêmicas são ferramentas importantes para conter futuros surtos e limitar as fronteiras em expansão (RODRIGUES et al., 2020; ROSSOW et al., 2020).

1.1.3. Manifestações clínicas

1.1.3.1 Esporotricose felina

As lesões cutâneas nodulares e/ou ulceradas são os principais sinais clínicos observados na esporotricose felina e podem estar localizadas por toda superfície corporal, com destaque para região cefálica, membros locomotores e cauda (GREMIÃO et al., 2015). O resultado da infecção em gatos varia desde lesões cutâneas solitárias até a doença disseminada fatal (MIRANDA et al., 2018). A gravidade da infecção irá depender da espécie de *Sporothrix* infectante e da imunidade do animal (ROSSOW et al., 2020). No entanto, as lesões cutâneas podem estar ausentes em alguns casos. Mucosa nasal, conjuntival, oral e genital também podem ser acometidas. Os sinais respiratórios como espirros, dispnéia e corrimento nasal são frequentes e podem ser observados em gatos sem lesão cutânea ou precedê-las. Além disso, o aumento dos linfonodos é geralmente observado, enquanto a linfangite nodular ascendente é menos frequente quando comparada ao descrito em seres humanos (PEREIRA et al., 2015; SCHUBACH et al., 2004).

O diagnóstico diferencial da esporotricose felina deve incluir neoplasias (principalmente carcinoma de células escamosas), dermatose eosinofílica, piodermite bacteriana, prototecose, micobacteriose, criptococose, histoplasmose, feo-hifomicose e leishmaniose tegumentar americana, entre outros. Os médicos veterinários devem estar atentos a possibilidade da existência paralela de esporotricose e outras dermatopatias (PEREIRA et al., 2015).

1.1.3.2 Esporotricose canina

Os cães apresentam lesões parecidas com as dos gatos, porém mais brandas. Existem três formas reconhecidas da doença: a forma cutânea localizada ou fixa, forma cutâneo-linfática e disseminada ou sistêmica. Lesões na cavidade nasal e trato respiratório superior são geralmente observados nos casos mais graves (DUANGKAEW et al., 2019).

1.1.3.3 Esporotricose humana

Em humanos a esporotricose pode se manifestar em vários locais da pele, mucosa ou osteoarticular. Com menos frequência, a infecção pode ocorrer por inalação,

resultando em doença pulmonar, porém tanto imunocompetentes quanto pacientes imunocomprometidos podem ser afetados (QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019).

1.2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA ESPOROTRICOSE EM GATOS E CÃES

O método padrão de referência para o diagnóstico da esporotricose é a cultura micológica (RIPPON et al., 1988). Entretanto, os exames citopatológico e histopatológico são utilizados rotineiramente principalmente no diagnóstico da esporotricose felina (SILVA et al., 2018).

O diagnóstico precoce da esporotricose permite a pronta implementação do tratamento antifúngico, o que pode melhorar o prognóstico em muitos casos e, notadamente em gatos, pode haver a redução da carga fúngica e potencialmente da sua habilidade de transmissão *Sporothrix* spp. (MIRANDA et al., 2018). Nesse sentido, a utilização de métodos de diagnóstico não invasivos, de fácil execução, menor custo e maior sensibilidade é desejável (MIRANDA et al., 2018; SILVA et al., 2015). Contudo o tratamento prévio com medicamentos antifúngicos tópicos ou sistêmicos pode reduzir a sensibilidade dos exames micológicos para o diagnóstico da esporotricose (GREMIÃO et al., 2020b).

1.2.1 Cultura fúngica

Essa técnica se baseia no isolamento de *Sporothrix* spp. em meios de cultura nos quais foi semeada a amostra biológica. A identificação do fungo é realizada por parâmetros morfológicos e a conversão da fase micelial para a fase de levedura (RIPPON et al., 1988). É considerado o método de referência para diagnóstico da esporotricose, por ser o mais sensível e específico e por permitir a detecção de formas viáveis do fungo. Para realização da cultura, a amostra pode ser coletada com um *swab* estéril ou por biópsia cutânea e semeada no ágar *Sabouraud* dextrose com cloranfenicol e amicacina e ágar Mycosel, incubado a 25°C, e observada por até quatro semanas. Os isolados são subcultivados em batata ágar dextrose a 25°C e o dimorfismo é confirmado por conversão para a fase de levedura no caldo de infusão cérebro-coração (ágar Brain Heart Infusion) a 37°C.

Entretanto, esse método nem sempre está disponível e o resultado pode demorar semanas, retardando o início do tratamento antifúngico (GONSALES, 2018;

LÓPEZ-ROMERO et al., 2011). A demora no resultado pode ocorrer, pois isolados de *Sporothrix* spp. por vezes tem um crescimento lento e esse método de diagnóstico requer a conversão da fase micelial do fungo para a fase de levedura por subcultura a 37°C. Isto representa um tempo médio para o diagnóstico em torno de 30 dias (GREMIÃO et al., 2020b). Outras desvantagens deste método de diagnóstico são a necessidade de um laboratório nível 2 de biossegurança e a contaminação microbiana da cultura não é incomum, devido à possibilidade de amostras estarem contaminadas secundariamente por bactérias e outros fungos. Ademais, a cultura micológica apesar de ser o padrão de referência, com sensibilidade de 95,2% (MACÊDO-SALES et al., 2018), pode apresentar resultados falso-negativos (GONSALES et al., 2020; SILVA et al., 2015).

1.2.2 Exame citopatológico

É uma das técnicas laboratoriais rotineiramente utilizadas para o diagnóstico presuntivo da esporotricose felina, com sensibilidade variável, possibilitando a detecção de *Sporothrix* spp. em aproximadamente 78 a 95% dos casos em gatos (PEREIRA et al., 2011; REDIGUIERI et al., 2022; SILVA et al., 2018). Porém, em cães possui baixa sensibilidade. Seu objetivo é a detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em *imprints* de lesão cutânea examinados em microscópio óptico, além de diagnosticar e/ou diferenciar outras doenças infecciosas, inflamatórias, proliferativas e neoplásicas (MASCARENHAS et al., 2019; MIRANDA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015). Em situações epizoóticas, o resultado positivo no exame citopatológico por apresentar sensibilidade boa, permite o início do tratamento antifúngico antes do isolamento do *Sporothrix* spp. pela cultura, especialmente quando há dificuldades na realização da cultura. A qualidade do *imprint* na lâmina de vidro é fundamental para uma boa identificação no microscópio. O exame citopatológico apresentando resultado negativo não exclui a infecção por *Sporothrix* spp. sendo recomendada a utilização de outras ferramentas de diagnóstico quando há forte suspeita clínica de esporotricose (GREMIÃO et al., 2020b; REDIGUIERI et al., 2022).

Em animais com esporotricose, o exame citopatológico do exsudato de lesões cutâneas geralmente revela células semelhantes a leveduras que podem ser ovais, arredondadas ou em forma de charuto, com um diâmetro de 3 a 5 µm e um comprimento

de 5 a 9 μm . Essas estruturas podem estar localizadas dentro de macrófagos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas ou livres, sendo circundadas por um halo incolor e pode ser semelhante aos observados no gênero *Histoplasma* ou *Cryptococcus* (PEREIRA et al., 2011). Em gatos, normalmente são observadas numerosas estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. (MIRANDA et al., 2018).

Os métodos de coloração usados rotineiramente em exames citopatológicos para o diagnóstico de esporotricose são do tipo Romanowsky (método Panóptico Rápido) e/ou Gram. A lâmina corada deve ser analisada sob microscopia óptica em objetivas de 40x e de 100x, para observação e identificação precisa de estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* spp. (SILVA et al., 2018).

O exame citopatológico corado pelo panótico rápido apesar de ser uma opção sensível e rápida para o diagnóstico da esporotricose felina, tem como desvantagem possuir sensibilidade variável de acordo com a carga fúngica nas lesões cutâneas dos animais examinados (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2018), além de ser necessário ter precisão e experiência na identificação do *Sporothrix* spp. (MIRANDA et al., 2018). Em cães, por eles apresentarem geralmente uma baixa carga fúngica nas lesões, a sensibilidade do exame citopatológico é baixa (MIRANDA et al., 2011). O tratamento com antifúngicos geralmente reduz a carga fúngica e conseqüentemente a sensibilidade do exame citopatológico (MACÊDO-SALES et al., 2018; MIRANDA et al., 2018).

O exame citopatológico apresenta as seguintes vantagens: baixo custo; fácil execução; resultado fornecido rapidamente; não requer treinamento técnico sofisticado ou estrutura de laboratório complexa; pode ajudar no acompanhamento terapêutico (MIRANDA et al., 2018; SILVA et al., 2015). Sua boa sensibilidade e rapidez para diagnóstico da esporotricose felina permite a implementação de medidas preventivas e de controle precoces para esta zoonose, portanto em regiões endêmicas onde há dificuldades de realização da cultura fúngica, esta técnica é fortemente recomendada em gatos (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015).

O gato doente apresenta elevado potencial zoonótico pela elevada carga fúngica geralmente encontrada nas lesões cutâneas, o que o difere de outras espécies (MIRANDA et al., 2018). O exame citopatológico pode ser usado para quantificar a carga fúngica de lesões cutâneas durante o tratamento felino. Em um estudo realizado com 130 gatos com esporotricose virgens de tratamento medicados com itraconazol isoladamente ou associado ao iodeto de potássio, após 12 semanas de tratamento

observou-se a diminuição da carga fúngica mensurada pelo exame citopatológico para zero. Foi relatado que a alta carga fúngica estava relacionada à falha no tratamento, desta forma este método pode ser um indicador do prognóstico e um parâmetro para a indicação de protocolo de tratamento (MIRANDA et al., 2018).

1.2.3. Exame histopatológico

O exame histopatológico é uma ferramenta muito útil para a rotina e diagnóstico presuntivo da esporotricose em gatos e cães. Além de ser uma ferramenta para detecção de formas de levedura de *Sporothrix* na amostra de tecido, essa técnica fornece informações sobre a resposta inflamatória e outras alterações microscópicas relacionadas à lesão cutânea (PEREIRA et al., 2015).

O objetivo da técnica é detectar estruturas leveduriformes de *Sporothrix* por meio do exame por microscopia ótica de amostras teciduais coletadas por biopsia ou necropsia e fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina. Essas amostras teciduais são submetidas a colorações para visualização das estruturas fúngicas e alterações histológicas associadas.

A biópsia de pele deve ser obtida das bordas das lesões ativas com punção (3-4 mm), após antissepsia local com álcool 70% e anestesia com cloridrato de lidocaína a 2%. Em gatos, a sedação é fortemente recomendada. As amostras são fixadas em formalina tamponada a 10%, incorporadas em blocos de parafina, seccionadas em 5 µm de espessura em micrótomo e coradas (CARSON; HLADICK, 2009). A hematoxilina-eosina (HE) é a coloração de rotina recomendada para observar células inflamatórias e alterações patológicas associadas a infecção por *Sporothrix* spp. No entanto, a coloração HE não permite uma boa visualização de células leveduriformes de *Sporothrix* sp., as quais podem ser confundidas com outros fungos patogênicos e protozoários (SCHUBACH; MENEZES; WANKE, 2012). Além disso, as alterações microscópicas observadas não são específicas da doença, por essas razões, as colorações específicas da histoquímica, como impregnação pela prata de Grocott (IPG) e ácido periódico-Schiff (PAS) devem ser usadas para identificar estruturas leveduriformes de *Sporothrix* spp. (SCHUBACH et al., 2004).

Um estudo incluiu 184 gatos com esporotricose confirmados pela cultura micológica, e mostrou uma sensibilidade do exame histopatológico corado pela IPG de 91,3%. A coloração com IPG apresentou o melhor desempenho ao ser comparada com

outras duas técnicas de diagnóstico, na citologia com o panótico rápido e na imuno-histoquímica (IHQ) (SILVA et al., 2018). Apesar do PAS e IPG em amostras humanas terem baixa sensibilidade, em gatos por apresentarem carga fúngica muito maior, a identificação das leveduras é possível com ampliação de 400x a 1000x e sua sensibilidade pode variar de 79% a 91,3%. Suas vantagens são: o baixo custo, resultados rápidos e sua fácil execução, não necessitando de treinamento técnico avançado ou laboratório com estrutura complexa, tornando uma técnica frequentemente usada no diagnóstico de rotina da esporotricose felina.

Por ser um processo invasivo, a realização de biópsia cutânea traz uma desvantagem ao exame histopatológico. Além disso, o diagnóstico histopatológico é mais demorado que o exame citopatológico, pois tem um maior número de etapas no processamento da amostra. Outra desvantagem é a baixa sensibilidade na detecção de leveduras de *Sporothrix* spp. em cães, diferente dos gatos. E em cães, segundo estudo feito com 87 animais a sensibilidade da IPG (43,7%) e PAS (19,5%) foi bem inferior à da imuno-histoquímica (80,5%) devido às baixas cargas fúngicas (MIRANDA et al., 2011).

1.2.4. Imuno-histoquímica

É um método que tem como objetivo detectar antígenos de *Sporothrix* spp. em tecidos fixados em formalina tamponada a 10% ou congelados por meio da reação antígeno-anticorpo. Amostras teciduais do animal são coletadas por biópsia ou necropsia e fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina. Cortes de 5 µm de espessura são colocados em lâminas silanizadas, em seguida são desparafinizados e reidratados para começar as etapas do processamento da detecção da reação antígeno-anticorpo. Nos casos positivos para *Sporothrix* são detectadas estruturas leveduriformes coradas em castanho ou marrom, azul, rosa, vermelho, etc (dependendo do cromógeno) por meio de exame realizado em microscópio óptico com ampliação de 400x ou 1000x.

A IHQ apresenta como vantagem uma alta sensibilidade, de cerca de 88% em gatos (SILVA et al., 2018). No diagnóstico da esporotricose canina, a imuno-histoquímica apresenta sensibilidades melhores do que as das técnicas histológicas (MIRANDA et al., 2011). Como desvantagem, é um método que ainda não foi implementado na rotina clínica e é utilizado principalmente na pesquisa (GREMIÃO et

al., 2020b), não tendo ainda sido testada a sua especificidade. Também, não há anticorpos comerciais disponíveis e os anticorpos utilizados são produzidos *in house*, o que dificulta a sua padronização. Outras desvantagens são a utilização de amostras de tecido coletadas por biópsia, que é um método invasivo, e a necessidade de uma elevada infraestrutura laboratorial e de treinamento técnico avançado.

1.2.5 PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem como princípio ensaios moleculares baseados na amplificação e identificação da sequência de DNA do agente etiológico. Essa técnica constitui uma alternativa promissora para o diagnóstico da esporotricose animal. Vários protocolos moleculares são descritos em diferentes publicações, como PCR real-time, sequenciamento de calmodulina, replicação por círculo rolante e outros. Ensaios estes que foram avaliados para o diagnóstico de diferentes espécies *Sporothrix*, cuja maioria dos protocolos têm como alvo o gene da calmodulina (considerado o padrão de referência) ou espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear. Sua principal vantagem é a alta sensibilidade que varia de 50% a 98,5% e especificidade de 100% em amostras de lesões cutâneas de gatos com esporotricose (Tabela 1). Como desvantagem, que sua utilização é limitada devido à falta de padronização dos métodos entre laboratórios e a necessidade de uma avançada infraestrutura laboratorial, além do limitado número de estudos para validação em amostras clínicas, sobretudo de animais (ROSSOW et al., 2020).

1.2.6 Sorologia

A sorologia tem como princípio a identificação de anticorpos ou antígenos no soro sanguíneo. Técnicas sorológicas têm sido recentemente adotadas como ferramentas auxiliares para o diagnóstico de esporotricose em seres humanos e gatos, porém até o momento não existem estudos em cães (VIANA, 2016).

Recentemente, um teste sorológico foi disponibilizado em laboratórios privados para o diagnóstico preliminar de esporotricose felina. Com base em resultado promissor, o teste ELISA de humano (SsCBF-ELISA) foi adaptado e validado com 62 soros de gatos infectados (confirmados pela cultura fúngica e exame citopatológico). O teste ELISA detecta anticorpos IgG contra um antígeno purificado de *Sporothrix spp.* e

recentemente foi validado para esporotricose felina em todas suas formas clínicas, contribuindo para a expansão do painel diagnóstico (MONTI, 2019).

1.2.7 Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em cães e gatos

As sensibilidades das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em gatos em amostras de lesões cutâneas encontram-se na tabela 1, enquanto na tabela 2, estão descritos os resultados referentes aos cães.

Tabela 1: Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em gatos em amostras de lesões cutâneas e com a utilização da cultura fúngica como padrão de referência.

Técnica	Forma de coleta da lesão cutânea	Nº de amostras	Sensibilidade: positivos	Referências
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	806	650 (78,9%)	Pereira et al. (2011)
IPG	Biópsia ^a	86	79 (94,0%)	Miranda et al. (2013)
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	244	191 (84,9%)	Silva et al. (2015)
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	184	160 (87,0%)	Silva et al. (2018)
IPG	Biópsia ^a		168 (91,3%)	
IHQ	Biópsia ^a		163 (88,6%)	
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	130	121 (93,0%)	Miranda et al. (2018)
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	196	102 (52,6%)	Macêdo-Sales et al. (2018)
IHQ	<i>Esfoliação</i> **	38	38 (100%)	Gonsales et al. (2018)
IHQ	Biópsia ^a	24	24 (100%)	
PCR	<i>Swab</i>	70	46 (65,7%)	Gonsales et al. (2020)
PCR	<i>Swab</i>	70	69 (98,5%)	Della Terra et al. (2021)
Panótico rápido	<i>Imprint</i>	154	146 (95%)	Redigueri et al. (2022)
PCR	Biópsia ^a	10	5 (50%)	Luiz et al. (2022)

Nota: PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; IHQ= imuno-histoquímica. ** Esfoliação de lesão cutânea com escova cervical para obtenção de cell block.

^aAmostras de lesão cutânea fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina.

Tabela 2: Sensibilidade das diferentes técnicas de diagnóstico laboratorial da esporotricose em cães em amostras de lesões cutâneas e com a utilização da cultura fúngica como padrão de referência.

Técnica	Forma de coleta da lesão cutânea	Nº de amostras	Sensibilidade: positivos	Referências
PAS	Biópsia	41	7 (17%)	Santos et al. (2007)
IPG	Biópsia		7 (17%)	
Giemsa	Biópsia	28	9 (23%)	
PAS	Biópsia	87	17 (19,5%)	Miranda et al. (2011)
IPG	Biópsia		38 (43,7%)	
IHQ	Biópsia		57 (65,5%)	

Nota: PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; IHQ= imuno-histoquímica.

1.3 TRATAMENTO DA ESPOROTRICOSE

A esporotricose em cães geralmente apresenta prognóstico favorável e com boa efetividade terapêutica. No entanto, a esporotricose felina tende a uma evolução grave, de ocorrência sistêmica e com resposta terapêutica variável (GREMIÃO et al., 2015; PEREIRA et al., 2010). Em estudo de revisão sistemática, a taxa de cura nos tratamentos da esporotricose felina avaliada em 1.324 gatos foi de 56,72%, a taxa de mortalidade de 24,32%, o abandono ao tratamento ocorreu em 13,07% dos casos, e a resistência ao tratamento foi de 5,89% (RABELLO et al., 2021). O tempo de tratamento é longo, a administração dos medicamentos por via oral é complicada e a adesão do responsável pelo gato ao tratamento é baixa. A cura, a falência terapêutica, a recorrência e os efeitos adversos ocorrem independentes do esquema terapêutico utilizado (VIANA, 2016). O diagnóstico rápido e correto é determinante para melhorar as taxas de cura e reduzir o potencial zoonótico. Portanto, o início do tratamento da esporotricose deve ser realizado baseado em um diagnóstico preciso (GREMIÃO et al., 2020a).

1.3.1 Felinos

Gatos em terapia antifúngica sistêmica, devido à consequente redução da carga fúngica, não parecem desempenhar um papel fundamental no ciclo de transmissão *Sporothrix* spp. (MIRANDA et al., 2018). Portanto, o início do tratamento da

esporotricose felina deve ser realizado precocemente com base em um diagnóstico rápido e acurado. A condição clínica geral do gato, a ocorrência de sinais respiratórios, bem como o número, extensão e localização das lesões e carga fúngica são fatores que podem influenciar o prognóstico (SOUZA et al., 2018).

Um dos maiores estudos sobre tratamento da esporotricose felina foi realizado no Brasil, na região metropolitana do Rio de Janeiro, no qual foram avaliados diferentes esquemas terapêuticos com iodeto de sódio, cetoconazol e itraconazol para tratamento de 266 gatos doentes, no qual a cura clínica foi obtida em 68 (25,4%) e a duração do tratamento variou de 16 a 80 semanas, sendo que os efeitos adversos mais comumente observados foram anorexia, vômito e diarreia (SCHUBACH et al., 2004).

Um estudo em 2018 com 52 gatos diagnosticados com esporotricose (*S. brasiliensis*) indica um bom resultado com o uso do itraconazol por até 36 semanas. Um total de 71% dos gatos foram curados clinicamente, embora quadros com o envolvimento da mucosa nasal, sinais respiratórios e alta carga fúngica nas lesões cutâneas foram preditores de falha do tratamento (SOUZA et al., 2018).

O tratamento da esporotricose felina continua sendo um desafio e relatos de falha terapêutica são frequentes, mesmo quando protocolos estabelecidos com itraconazol (medicamento de primeira escolha) são usados. Dentro deste contexto, a combinação de itraconazol e iodeto de potássio em cápsulas para o tratamento da esporotricose felina mostrou alta taxa de cura e surgiu como uma opção de tratamento efetiva. A cura completa de lesões ocorre mais cedo em gatos tratados com itraconazol e iodeto de potássio comparado ao itraconazol em monoterapia, sugerindo que a combinação de medicamentos é mais efetiva no processo de cicatrização e, conseqüentemente, na redução do potencial zoonótico. Além disso, a alta carga fúngica detectada antes do tratamento não afetou o processo de cicatrização. Embora os mecanismos pelos quais o iodeto de potássio media este processo ainda sejam pouco claros, este medicamento não só melhorou a chance de cura, mas também foi relacionado ao controle imediato da carga fúngica (MIRANDA; SILVA et al., 2018).

Porém, as dificuldades em relação ao tratamento de esporotricose felina, como tempo de tratamento prolongado, alto custo, formas de dosagem de medicamentos e isolamento dos animais, muitas vezes contribuem para seu abandono, com eventual óbito (MACÊDO-SALES et al., 2018). Gatos refratários ao tratamento com o itraconazol podem também ser conseqüências dessas barreiras, tornando-se um desafio para os médicos veterinários (SILVA et al., 2022).

O tratamento em gatos pode ser realizado com iodeto de sódio e potássio. Porém, pode-se utilizar também, os fármacos imidazóis e os triazóis até a cicatrização das lesões e até que as culturas se tornem negativas. O uso do medicamento deve estender-se por no mínimo 30 dias após a cura clínica. Dentre os triazóis, o itraconazol, derivado triazólico sintético, apresenta largo espectro de ação contra micoses sistêmicas e superficiais. O cetoconazol é um antifúngico do grupo dos imidazóis e tem amplo espectro de ação contra micoses sistêmicas. Quando comparado ao cetoconazol, o itraconazol tem maior espectro de ação, é mais efetivo em doses menores e apresenta menos efeitos adversos (PEREIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2009). O procedimento cirúrgico é outra opção para o tratamento de felinos com esporotricose (GREMIÃO et al., 2006).

O tratamento tópico antifúngico isoladamente não é recomendado. O uso de medicamentos tópicos, como por exemplo pomada repelente de mosca, deve ser feito com cautela em animais doentes devido ao risco da transmissão zoonótica. Em casos de infecção bacteriana concomitante, é necessário introduzir antibioticoterapia sistêmica. Glicocorticoides ou medicamentos imunossupressores são contraindicados porque a doença pode piorar ou reaparecer (GREMIÃO et al., 2020b). Com as reações adversas no quadro clínico e/ou laboratorial (náusea, anorexia, vômito, aumento ALT sérica), é importante a suspensão temporária do medicamento até que o apetite retorne e/ou enzimas hepáticas voltam aos níveis de referência (geralmente 1 a 2 semanas). Assim o monitoramento clínico e bioquímico é fortemente recomendado (GREENE et al., 2012).

1.3.2 Caninos

A esporotricose canina é uma doença de bom prognóstico, pois os cães geralmente respondem bem ao tratamento sistêmico com azólicos. Além disso, foram descritos cinco casos nos quais foi observada cura clínica espontânea que permaneceram livres de lesões por até quatro anos de acompanhamento (VIANA, 2016).

O uso de terbinafina mostrou alta atividade antifúngica *in vitro* contra os isolados caninos de *Sporothrix*. No tratamento com terbinafina de dois cães com esporotricose causada por *Sporothrix brasiliensis*, esses animais tiveram boa resposta ao tratamento, com remissão de todos os sinais inicialmente apresentados, com alto grau de

tolerância, sem efeitos adversos clínicos e sem alterações hematológicas e bioquímicas relevantes associados ao tratamento. Os resultados descritos até o momento indicam que este medicamento pode surgir como uma opção terapêutica para esporotricose canina (VIANA et al., 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Há duas décadas, uma endemia/hiperendemia de esporotricose com transmissão zoonótica tendo gatos doentes como principal fonte de infecção de *Sporothrix* spp. ocorre na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro, tendo sido diagnosticados milhares casos em humanos e felinos no INI/FIOCRUZ/RJ desde 1998 (GREMIÃO et al., 2015; GREMIÃO et al., 2020a; PEREIRA et al., 2014).

A dificuldade em se estabelecer um diagnóstico rápido e seguro para a esporotricose felina e canina predispõe ao retardo no tratamento, onde o custo e praticidade do exame também devem ser levados em consideração. Nesse sentido, a utilização de métodos de diagnóstico não invasivos, de fácil execução, menor custo e maior sensibilidade é desejável (MIRANDA; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2015). O método padrão de referência para diagnóstico da esporotricose consiste na cultura fúngica, mas esse método nem sempre está disponível e o resultado pode demorar até um mês, retardando o início do tratamento (LÓPEZ-ROMERO et al., 2011).

Sabe-se que para o diagnóstico presuntivo da esporotricose, as técnicas especiais de coloração PAS e IPG aumentam a sensibilidade do diagnóstico histopatológico em cães e gatos e que a coloração panótico rápido usada na citopatologia possui boa sensibilidade em gatos. Porém, em cães e em gatos com baixa carga fúngica, a sensibilidade geralmente é baixa (MIRANDA et al., 2011; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2022). Ademais, o diagnóstico histopatológico é mais demorado e possui coleta de amostra mais invasiva que o exame citopatológico, requerendo uso de técnicas anestésicas (local e/ou sedação).

Nesse contexto, o exame citopatológico é uma boa opção para o diagnóstico presuntivo da esporotricose felina. Entretanto, que seja pelo nosso conhecimento, estudos abordando o desempenho do exame citopatológico utilizando as colorações específicas de PAS e IPG no diagnóstico da esporotricose em cães e gatos não estão disponíveis, bem como há raros estudos sobre o desempenho do exame citopatológico em cães (SANTOS et al., 2007) e em animais em tratamento (MACÊDO-SALES et al., 2018; MIRANDA et al., 2018). Supomos que colorações específicas para fungos quando utilizadas no exame citopatológico possam elevar a sensibilidade desse

método, devido à maior possibilidade de detecção de estruturas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* spp., tal qual é observado no exame histopatológico de lesões cutâneas. Caso nossa hipótese se confirme, serão descritas novas técnicas de diagnóstico para esporotricose animal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação do exame citopatológico corado pelos métodos panótico rápido, ácido periódico de Schiff e impregnação pela prata de Grocott e da cultura fúngica no diagnóstico da esporotricose felina e canina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a frequência de positividade dos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de cães e gatos com esporotricose corados pelo panótico rápido, PAS e IPG com a cultura fúngica;
- Comparar a sensibilidade dos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães com esporotricose corados pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG, usando a cultura fúngica como método padrão de referência;
- Comparar a frequência de positividade do exame citopatológico corado pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG e da cultura fúngica em amostras de lesões cutâneas ulceradas entre gatos com esporotricose virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos;
- Comparar a sensibilidade dos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos com esporotricose corados pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG entre animais virgens de tratamento e com tratamento prévio de antifúngicos, usando a cultura fúngica como método padrão de referência;
- Comparar a frequência de positividade do exame citopatológico corado pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG e da cultura fúngica em amostras de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães com esporotricose, de acordo com a distribuição das lesões e estado clínico geral;

- Comparar o tempo de leitura de lâminas para detecção de estruturas fúngicas compatíveis com *Sporothrix* spp. (leveduras, hifas ou pseudohifas) no exame citopatológico em *imprints* de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães com esporotricose corado pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG;
- Avaliar a concordância interobservador dos exames citopatológicos de coloração pelo panótico rápido, PAS e IPG em *imprints* de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães com esporotricose;

4 MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Foi realizado um estudo prospectivo em uma coorte de gatos e cães com esporotricose assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz), no período de março a dezembro de 2021. Foi utilizada uma amostra de conveniência de 32 gatos, sendo 23 tratados previamente (18 machos e 5 fêmeas) e 9 virgens de tratamento (7 machos e 2 fêmeas), e 4 cães (todos fêmeas), sendo 3 virgens de tratamento e 1 tratado previamente, para realização do exame citopatológico e da cultura fúngica.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

A população alvo foi constituída de gatos e cães que preencheram os seguintes critérios de elegibilidade:

Crítérios de inclusão - presença de lesão cutânea ulcerada compatível com diagnóstico de esporotricose; tutores que aceitaram participar do estudo mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - anexo).

Crítério de exclusão - animais com resultado negativo em todos os métodos de diagnóstico utilizados no presente estudo (exame citopatológico corado pelos métodos panótico rápido, ácido periódico de Schiff e impregnação pela prata de Grocott e cultura fúngica).

4.3 EXAME CLÍNICO

Foi realizado histórico/anamnese e exame físico. O exame físico compreendeu a avaliação do estado geral, palpação de linfonodos, pesagem do animal e inspeção de mucosas, pelos e pele, sempre observando o aspecto clínico, a localização e o número de lesões. As informações referentes aos dados clínico-epidemiológicos, tais como: quantidade, localização e características das lesões; estado clínico; idade, raça, sexo; animais previamente tratados ou virgens de tratamento e procedência, foram registradas em um formulário padronizado (anexo).

A classificação da distribuição das lesões cutâneas foi seguindo a nomenclatura de L1, L2 e L3, e somente nos gatos visto que em cães não se encontra esta descrição na literatura; onde L1, os gatos com lesões cutâneas em apenas um local; L2, os gatos com lesões cutâneas em dois locais não contíguos; e L3, gatos com lesões cutâneas em três ou mais locais não contíguos (SCHUBACH et al., 2004), assim como o estado geral do gato e cão sendo classificado como bom, regular ou ruim. Bom estado geral foi considerado com ausência de sinais clínicos como dispneia, conjuntivite, perda de peso, desidratação, mucosas pálidas e prostração; a presença desses sinais de forma leve, indicaram estado geral regular; e quando esses sinais clínicos eram acentuados, estado geral ruim (MIRANDA et al., 2013).

4.3.1 Animais previamente tratados

Foram considerados animais em tratamento prévio aqueles em tratamento antifúngico oral e/ou tópico no momento da coleta da amostra e os que interromperam o tratamento com antifúngico oral e/ou tópico há 2 meses no máximo antes da primeira coleta.

4.4 COLETA DE AMOSTRAS

Foi selecionada para coleta de exsudato para realização de cultivo fúngico e exame citopatológico uma lesão cutânea ulcerada, evitando-se as que apresentavam possíveis sinais de infecção bacteriana secundária (presença de secreção purulenta). Em caso de lesão cutânea ulcerada recoberta por crosta, esta era removida cuidadosamente com utilização de compressa de gaze para permitir a coleta do exsudato (figura 1A). Os animais foram contidos mecanicamente sem a necessidade de sedação.

4.4.1 Cultura fúngica

Foram utilizados *swabs* estéreis para coletar o exsudato da lesão cutânea selecionada (figura 1B). Imediatamente após a coleta do exsudato para realização da cultura fúngica, foi feita a semeadura da amostra nos meios ágar Sabouraud dextrose (acrescido de cloranfenicol e amicacina) e ágar Mycosel. Em seguida, os tubos contendo os meios de cultura semeados foram enviados para o Laboratório de

Micologia/INI/Fiocruz para processamento, onde os tubos foram incubados a 25°C. Inicialmente, nos casos positivos, as colônias geralmente apresentam tonalidade creme, mas após algumas semanas podem se tornar marrons ou pretas. O dimorfismo térmico deste fungo foi demonstrado por meio da conversão da fase filamentosa para a leveduriforme pela incubação dos tubos contendo as culturas a 37°C em meio Brain Heart Infusion (BHI) e posterior visualização microscópica da morfologia do fungo, o que finalizou o diagnóstico.

4.4.2 Exame citopatológico

Após a coleta de exsudato para o cultivo fúngico, procedeu-se a coleta do exsudato das lesões para realização dos exames citopatológicos (figura 1C). Para tanto, foram utilizadas lâminas de vidro para microscopia de borda fosca, previamente limpas e secas. O procedimento consistiu na confecção de uma lâmina para cada coloração contendo três impressões sequenciais sobre a lesão (figura 2). Nas lesões de grande diâmetro a coleta foi feita da borda, enquanto nas lesões menores a coleta cobriu a lesão inteira.

A coloração da lâmina do exame citopatológico pelo método panótico rápido foi realizada no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz após a coleta, seguindo as instruções do fabricante do *kit* de coloração. A fixação das lâminas para realização das técnicas PAS e IPG foi feita em metanol durante cinco minutos logo após a coleta. Em seguida, as lâminas foram secas ao ar e armazenadas em caixa em temperatura ambiente. Por sua vez, as colorações foram realizadas de duas horas à quinze dias após a coleta do material. A coloração das lâminas do exame citopatológico pelos métodos PAS e IPG foram realizadas no Serviço de Anatomia Patológica/INI/Fiocruz, seguindo as instruções do fabricante dos *kits* de coloração.

Figura 1 - Procedimentos de coleta de amostras para realização da cultura fúngica e dos exames citopatológicos em lesão cutânea ulcerada de gato. (A) Limpeza da lesão na orelha com gaze a fim de retirar resíduos e crostas hemáticas; (B) Coleta do material exsudativo da lesão cutânea com auxílio de *swab* estéril para o exame de cultura micológica; (C) Coleta do material exsudativo por meio de *imprint* da lesão cutânea em lâmina de vidro para os exames citopatológicos corados pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG.

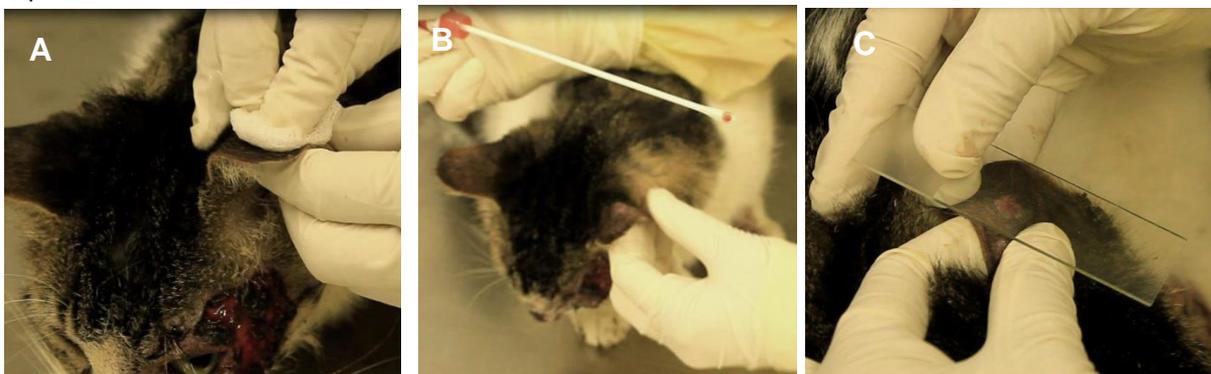
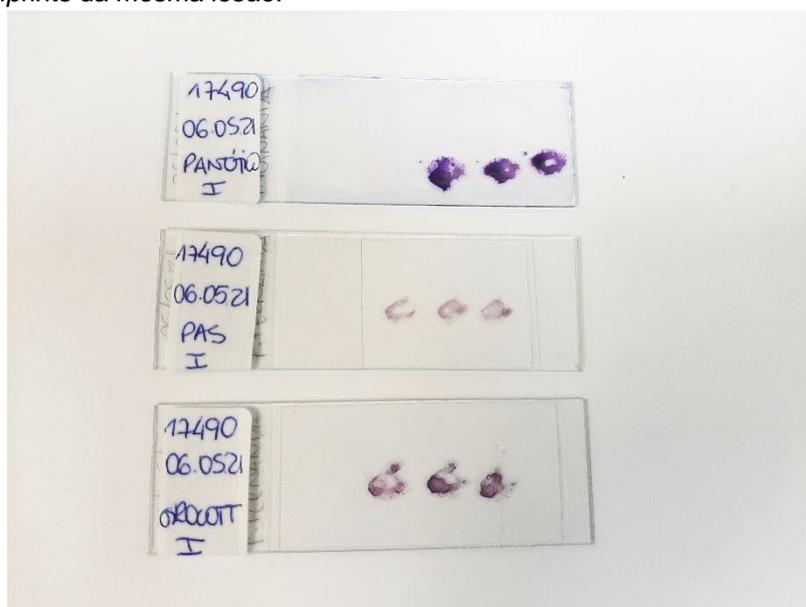


Figura 2 - Três lâminas de material exsudativo de lesão cutânea coletadas por meio de *imprint* dessa lesão, sendo uma para o panótico rápido, uma para o PAS e uma para o IPG. Em cada lâmina foram realizados três *imprints* da mesma lesão.



4.4.2.1 Kits de coloração e equipamentos necessários

O *kit* utilizado para realização do método panótico rápido foi o corante hematológico panótico rápido (Romanowsky), líquido, da marca LB Laborclin, Pinhais/PR - Brasil. Para realização do PAS foi utilizado o HISTOKIT, PAS – RUO de Ácido Periódico de Schiff P.A.S. (Periodic Acid Schiff P.A.S), da marca EasyPath, Indaiatuba/SP – Brasil. O HISTOKIT, GROCOTT - RUO de Grocott, da marca

EasyPath, Indaiatuba/SP – Brasil (acompanha literatura com o método) foi o *kit* utilizado para realização do método de IPG.

Em relação aos *kits* de coloração utilizados, os equipamentos necessários, o tipo de armazenamento, o custo, a quantidade de colorações estimada, a quantidade de corante, a validade e o tempo de execução para a realização das colorações encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 – Equipamentos necessários, tipo de armazenamento do *kit*, custo do *kit*, quantidade de colorações que o *kit* realiza, quantidade de corante do *kit*, validade do *kit* e tempo de execução para a realização das colorações pelo panótico rápido: Romanowsky da marca LB Laborclin; PAS: HISTOKIT, PAS – RUO de Ácido Periódico de Schiff da marca EasyPath e IPG: HISTOKIT, GROCOTT - RUO de Grocott da marca EasyPath.

Variáveis	PR	PAS	IPG
Equipamentos	Microscópio óptico	Microscópio óptico	Microscópio óptico, geladeira e estufa
Armazenamento	Temperatura ambiente	Temperatura ambiente	2 à 8°C geladeira
Custo <i>kit</i> (R\$)	60,00	460,00	460,00
Rendimento	Média 1200 colorações	Mínimo 60 colorações	60 a 120 colorações
Quantidade (ml)	500	30	30
Validade	4 anos e 6 meses	2 anos	2 anos
Tempo de execução (minutos)	2 a 3	45 a 50	90 a 120

Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

4.4.2.2 Procedimento técnico da coloração do panótico rápido

Após a coleta do material biológico em uma lesão cutânea ulcerada foram feitas as seguintes etapas:

1. Submersão das lâminas em triarilmetano e metanol para fixação, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 10 imersões de 1 segundo cada e deixar escorrer bem;

2. Submersão das lâminas em xantenos para pigmentação de estruturas citoplasmáticas e eritrócitos, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 imersões de 1 segundo cada e deixar escorrer bem;
3. Submersão das lâminas em tiazinas para pigmentação de estruturas nucleares das células, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem;
4. Lavagem da lâmina com água corrente, secagem, ao ar na posição vertical.

4.4.2.3 Procedimento técnico da coloração do PAS

Após a coleta do material biológico em uma lesão cutânea ulcerada e sua fixação em metanol, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Lavagem da lâmina em água corrente;
2. Cobertura do *imprint* com o reagente A (ácido periódico) → 10 minutos;
3. Lavagem em água corrente → 3 minutos;
4. Lavagem em água destilada e secar;
5. Cobertura do *imprint* com o reagente B (reativo de Schiff) → 15 minutos (ou até aparecer a pigmentação);
6. Lavagem em água corrente → 3 minutos, depois secar;
7. Cobrir o *imprint* com o reagente C (hematoxilina de Harris para coloração de fundo) → 3 minutos;
8. Lavagem em água corrente → 3 minutos, depois secar;

9. Desidratação em 4 trocas em álcool absoluto (10 imersões por cuba);
10. Clareamento em 4 trocas de xilol (10 imersões por cuba);
11. Montagem com entellan utilizando lamínula e evitando bolhas.

4.4.2.4 Procedimento técnico da coloração da IPG

Após a coleta do material biológico em uma lesão cutânea ulcerada e sua fixação em metanol, foram realizadas as seguintes etapas:

1. Lavagem da lâmina em água destilada → alguns segundos, depois secar;
2. Cobertura do *imprint* com o reagente A (ácido crômico a 4%) → 10 minutos;
3. Lavagem em água corrente → 3 minutos, depois secar;
4. Imersão da lâmina em solução obtida com a junção de 40ml água destilada + 40 gotas reagente B (prata amoniacal) + 20 gotas reagente C (bórax), levar a estufa a 60°C → 60 à 90 minutos (ou até aparecer a pigmentação);
5. Lavagem em água destilada → alguns segundos, depois secar;
6. Cobertura do *imprint* com o reagente D (cloreto de ouro) → 1 minuto;
7. Lavagem em água corrente → alguns segundos, depois secar;
8. Cobertura do *imprint* com o reagente E (verde luz) → 2 minutos;
9. Passar rapidamente na água;
10. Desidratar em 4 trocas em álcool absoluto (10 imersões por cuba);

11. Clarear em 4 trocas de xilol (10 imersões por cuba);

12. Montagem com entellan utilizando lamínula e evitando bolhas.

Foram utilizados controles positivo e negativo de lâminas de IHQ do Serviço de Anatomia Patológica/INI/Fiocruz nas três técnicas.

4.5 LEITURA DAS LÂMINAS DE CITOPATOLOGIA

Todas as lâminas de vidro coradas foram examinadas em microscópio óptico, percorrendo inicialmente todos os campos correspondentes as três impressões/lâmina, em aumento de 400x. Para confirmação da detecção de estruturas fúngicas sugestivas de *Sporothrix* spp. (leveduras, hifas ou pseudohifas), foi utilizado aumento de 1000X. O tempo de leitura de cada lâmina foi mensurado em segundos. Posteriormente, foi calculada a sensibilidade de cada uma das técnicas de coloração, utilizando a cultura fúngica como padrão de referência, bem como as frequências de positividade de cada técnica.

As amostras foram consideradas positivas ao exame citopatológico, quando foi detectada pelo menos uma estrutura fúngica com aspectos morfológicos compatíveis com *Sporothrix* spp. (forma, tamanho e afinidade tintorial), e considerando-se também a sua localização. Foram consideradas compatíveis com *Sporothrix* spp. leveduras ovais, arredondadas ou em forma de charuto, com um diâmetro de 3 a 5 μm e um comprimento de 5 a 9 μm , hifas septadas ou pseudohifas quando presentes juntamente com essas leveduras, com citoplasma corado em azul e núcleo corado em rosa a violeta na coloração panótico rápido (figura 3), coradas em púrpura magenta na coloração PAS (figura 4) ou impregnadas em negro ou castanho escuro na IPG (figura 5). Essas estruturas deveriam estar localizadas dentro de macrófagos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas ou livres; sendo circundadas por um halo incolor ou observava-se a parede celular.

Figura 3 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea de gato corado pelo método panótico rápido com presença de leveduras arredondadas ou em formato de charuto no citoplasma de macrófagos ou extracelulares, compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta). As leveduras apresentavam núcleo rosa a violeta redondo, citoplasma azul, com halo incolor ao redor.

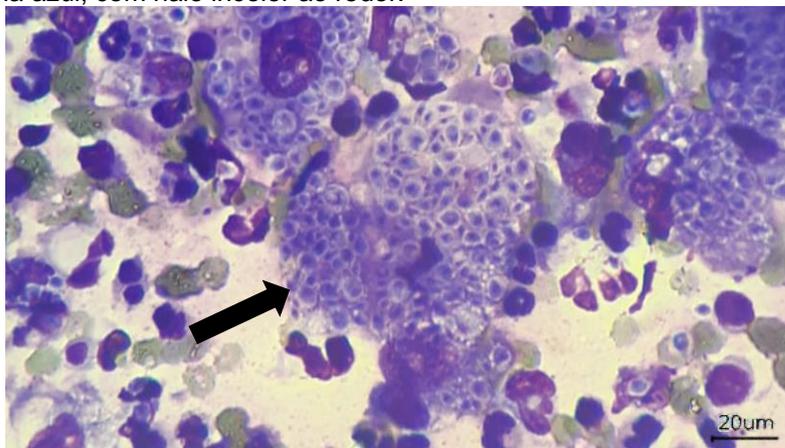


Figura 4 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea ulcerada de gato corado pelo PAS com presença de leveduras de coloração púrpura-magenta, arredondadas, algumas com unibrotamento de base estreita, ou em forma de charuto compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta).

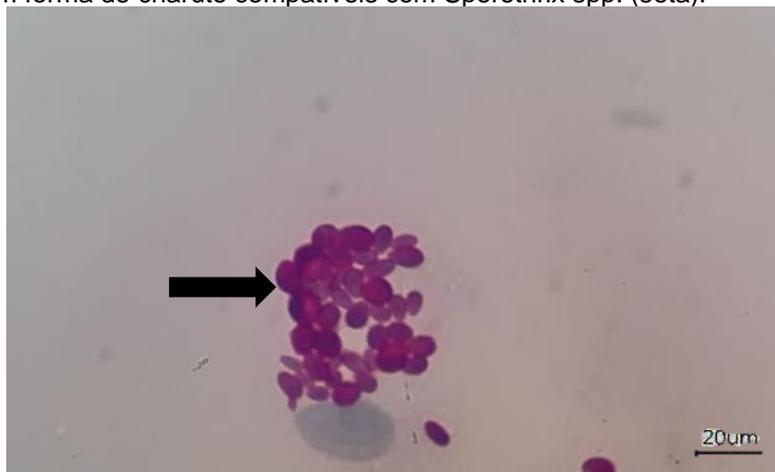
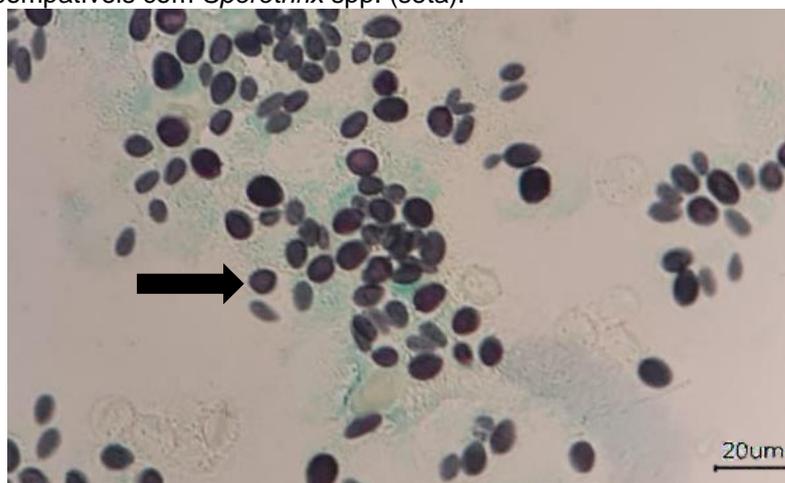


Figura 5 - Exame citopatológico positivo de lesão cutânea de gato corado pelo IPG com presença de estruturas leveduriformes negras, arredondadas, algumas com unibrotamento de base estreita, ou em forma de charuto compatíveis com *Sporothrix* spp. (seta).



A interpretação microscópica foi realizada por dois observadores:

A) Observador 1: médico veterinário do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI/FIOCRUZ, com ampla experiência no diagnóstico citopatológico de doenças infecciosas, especialmente esporotricose. Foi considerado o observador mais experiente.

B) Observador 2: médica veterinária, aluna do Curso de Mestrado Profissional em Pesquisa Clínica (MPPC) do INI/Fiocruz, com recente experiência no diagnóstico citopatológico de esporotricose. Foi considerada o observador menos experiente.

As lâminas examinadas no microscópio óptico tiveram seus resultados finais por consenso dos dois observadores.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados no *software* Statistical Package for Social Sciences - SPSS (versão 2.0) para Windows e analisados usando o *software* R Project for Statistical Computing for Windows software (versão 3.3). As sensibilidades foram calculadas usando a cultura micológica como técnica padrão de referência. A concordância interobservadores em cada técnica avaliada foi estimada pelo índice Kappa (LANDIS; KOCH, 1977).

4.8 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO E TERAPÊUTICO

O exame clínico inicial, a coleta de amostras para diagnóstico laboratorial, bem como o acompanhamento clínico e terapêutico dos animais foi feito no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz. O esquema terapêutico foi prescrito conforme o quadro clínico apresentado, com os medicamentos de eleição rotineiramente utilizados para o tratamento de esporotricose felina (itraconazol ou associação de itraconazol e iodeto de potássio) e canina (cetoconazol, itraconazol ou associação de itraconazol e iodeto de potássio) no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz. As medicações foram fornecidas conforme a disponibilidade dos mesmos pelo Serviço de Farmácia Clínica/INI/Fiocruz, sendo administradas pelos tutores nos seus domicílios.

5 ASPÉCTOS ÉTICOS

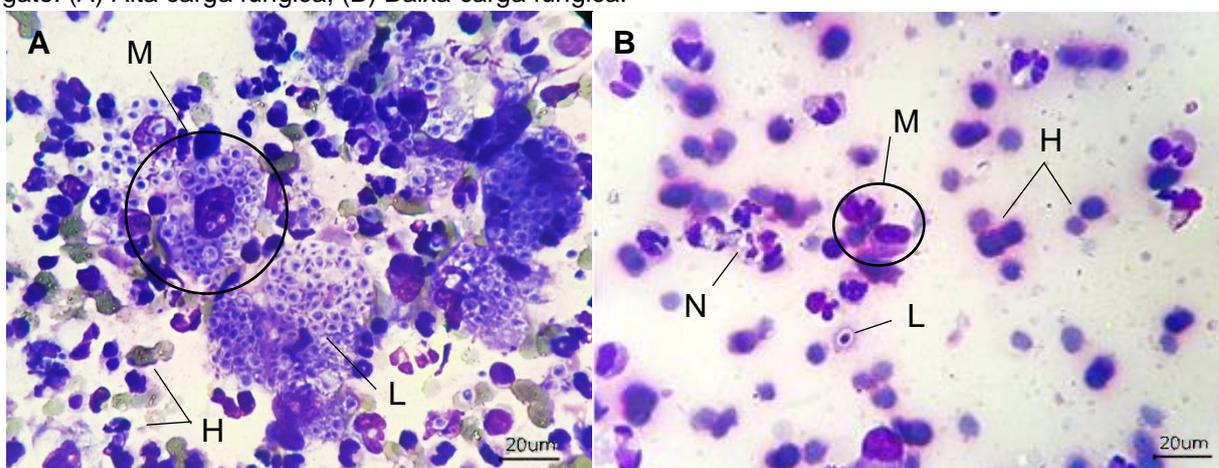
Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), FIOCRUZ, pela licença LW-1/21 (anexo). Todos os tutores que concordaram com a participação de seus animais assinaram o TCLE (anexo).

6 RESULTADOS

6.1 RESULTADO DAS COLORAÇÕES

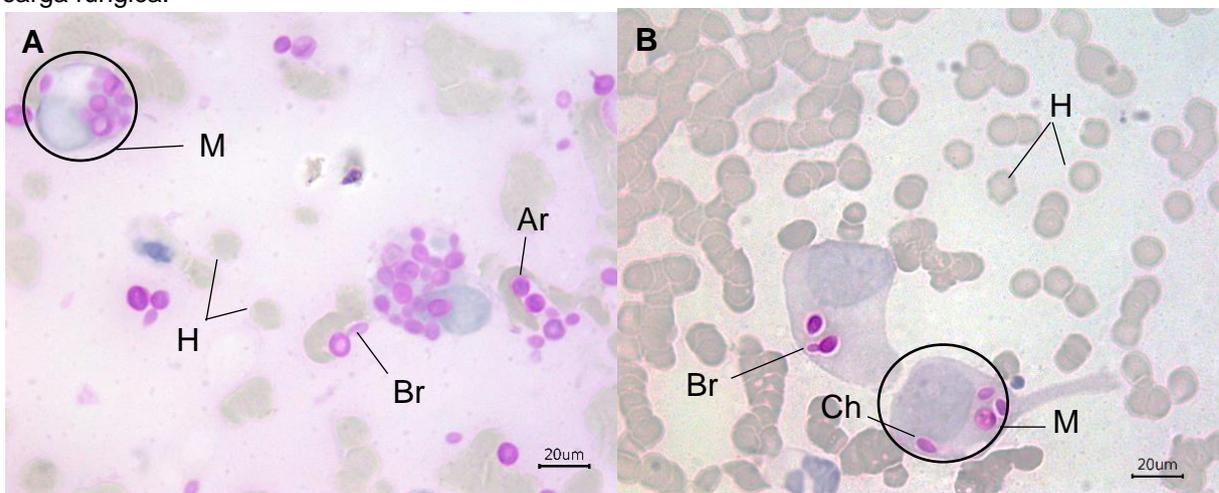
Os resultados positivos para levedura de *Sporothrix* spp. dos exames citopatológicos corados pelo panótico rápido, PAS e IPG são mostrados nas figuras 6, 7 e 8.

Figura 6 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada corado pelo panótico rápido e positivo para leveduras de *Sporothrix* spp. que apresentavam citoplasma azul, núcleo rosa e halo incolor ao redor, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.



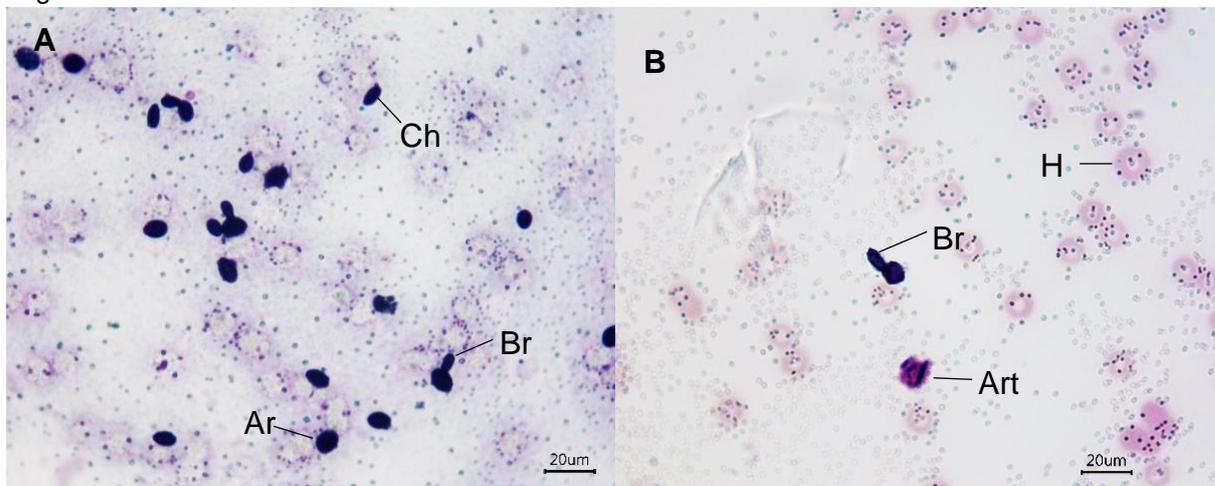
Nota: Leveduras de *Sporothrix* spp. (L); macrófago (M); neutrófilo (N) e hemácia (H).

Figura 7 - Exames citopatológicos de *imprint* de lesão ulcerada corado pelo PAS e positivos para leveduras de *Sporothrix* spp. marcadas em púrpura magenta, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.



Nota: Leveduras de *Sporothrix* spp. em formato de charuto (Ch), arredondada (Ar) e com brotamento (Br); macrófago (M) e hemácia (H).

Figura 8 - Exames citopatológicos de *imprint* de lesão ulcerada corados pelo IPG e positivos para leveduras de *Sporothrix* spp. marcadas em negro, em gato. (A) Alta carga fúngica; (B) Baixa carga fúngica.



Nota: Leveduras de *Sporothrix* spp. em formato de charuto (Ch), arredondada (Ar) e com brotamento (Br); hemácia (H) e artefato (Art).

6.2 ALTERAÇÕES INDESEJADAS NAS LÂMINAS

Algumas lâminas ficaram com excesso de exsudato e/ou hemácias, tornando o *imprint* espesso e ocasionando alterações nas três colorações demonstradas nas figuras 9 e 10.

Figura 9 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada de gato corado pelo panótico rápido mostrando levedura de *Sporothrix* spp. (seta) e excesso de hemácias (círculo).

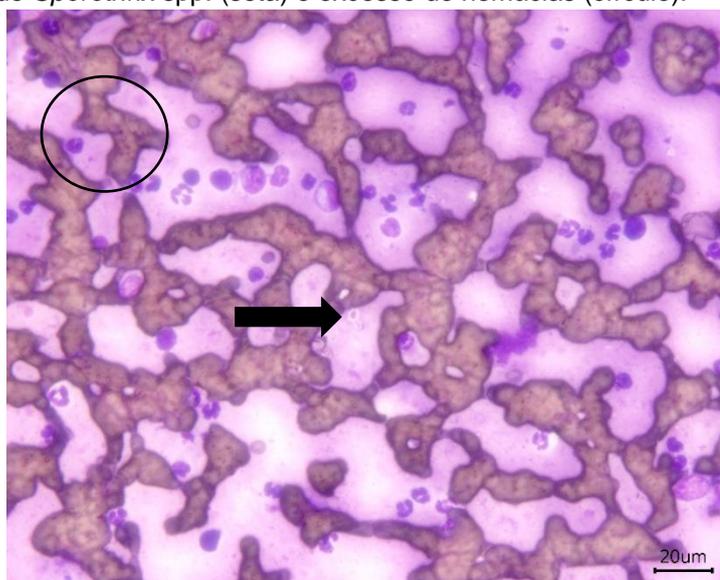
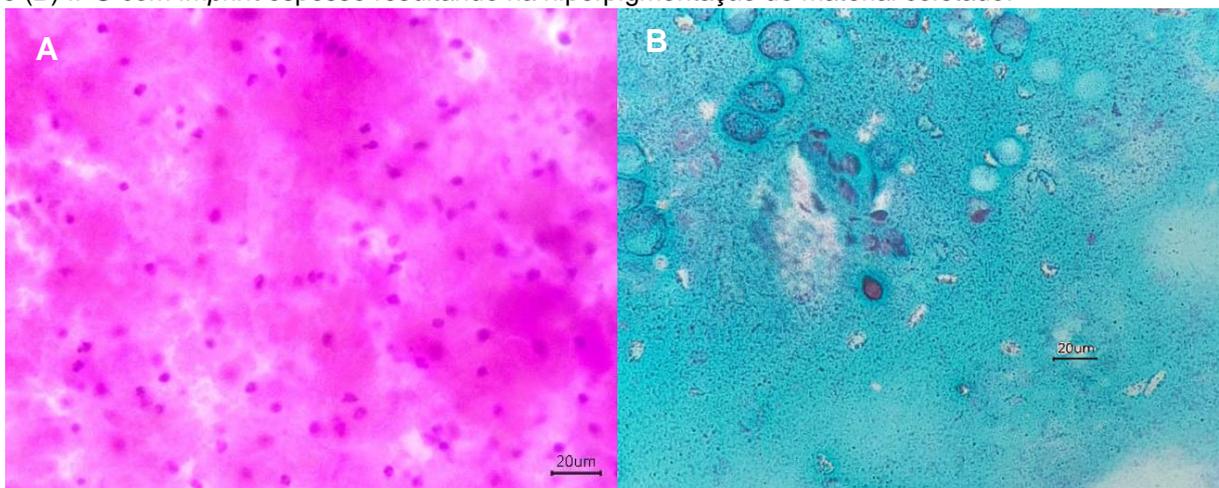


Figura 10 - Exame citopatológico de *imprint* de lesão ulcerada de gato corado pelo PAS e IPG. (A) PAS e (B) IPG com *imprint* espesso resultando na hiperpigmentação do material coletado.

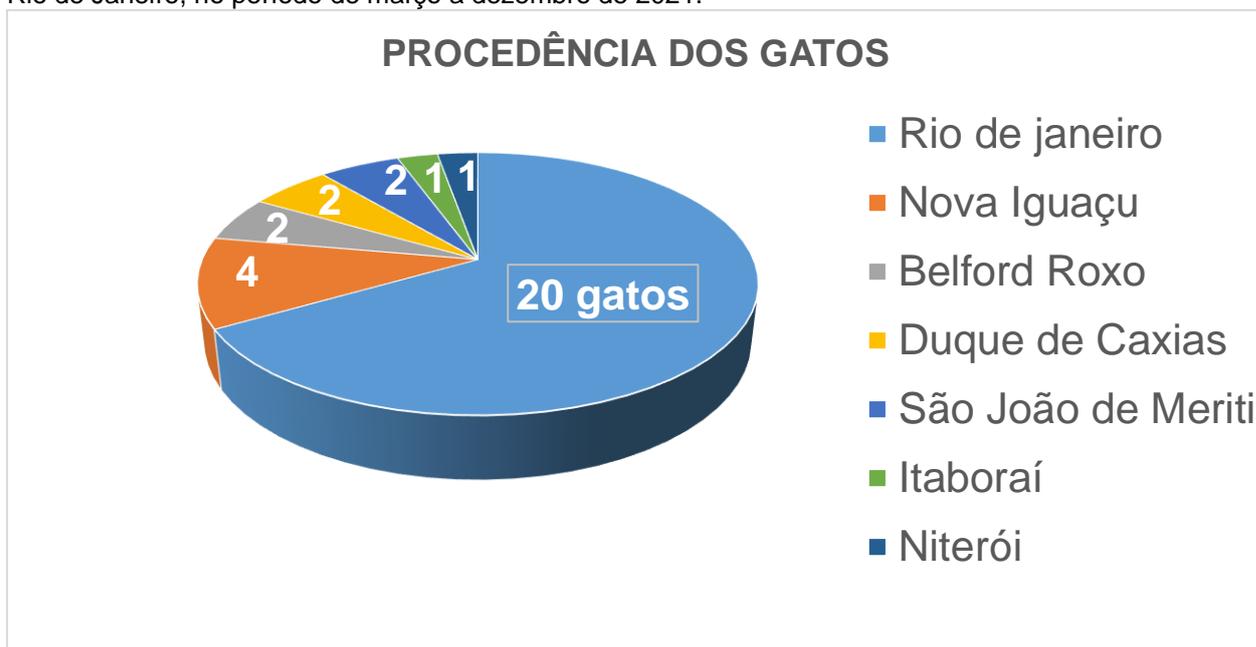


6.3 RESULTADOS NOS GATOS

6.3.1 Dados demográficos dos gatos

Foram coletadas neste estudo amostras de 32 gatos, sendo 25 machos e 7 fêmeas, todos sem raça definida. A média de idade nos machos foi de 43 meses (3 anos e meio) e das fêmeas 49 meses (4 anos). Na figura 11 são mostrados os dados do local de origem dos gatos de acordo com o município do estado do Rio de Janeiro.

Figura 11 - Número de gatos incluídos no estudo de acordo com os municípios de origem no estado do Rio de Janeiro, no período de março a dezembro de 2021.



6.3.2 Local da coleta das lesões no gato

Na tabela 4 são descritas as frequências das localizações anatômicas de onde as amostras foram coletadas, com predominância de orelhas. Das 32 amostras coletadas das lesões cutâneas dos gatos, 21 foram provenientes de úlcera (figura 12A) e 11 de nódulo ulcerado (figura 12B e 13 A-B).

Tabela 4 – Localização anatômica das lesões cutâneas ulceradas nas quais foram procedidas as coletas de amostras em gatos. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.

Localização anatômica	Número de amostras (N=32)	
	n	%
Orelha	11	34,3
Nariz	7	21,8
Tórax	4	12,5
Escápula	3	9,3
Cauda	2	6,2
Pálpebra	1	3,1
Membro torácico	1	3,1
Membro pélvico	1	3,1
Abdômen	1	3,1
Região mentoniana	1	3,1

Nota: N= número total de amostras examinadas; n= número de amostras examinadas em cada localização anatômica.

Figura 12 - Tipos de lesões cutâneas causadas por *Sporothrix* spp. em gatos. (A) Lesão ulcerada com crosta hemática e melicélica na ponte nasal; (B) Nódulos ulcerados na região nasal. Animais diagnosticados com esporotricose: positivos na cultura fúngica, PAS e IPG.

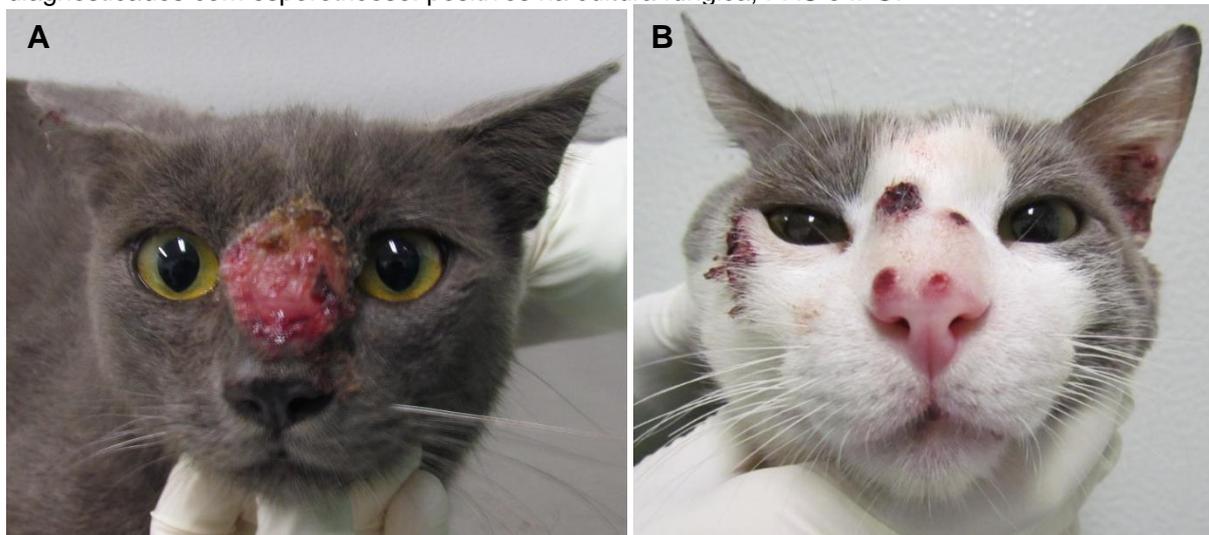
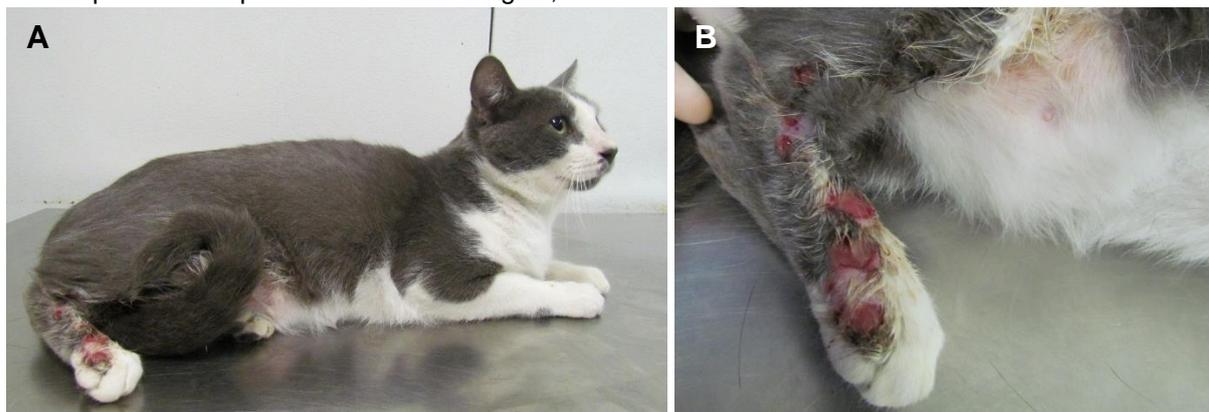


Figura 13 – Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em gatos (A) Nódulos ulcerados seguindo trajeto de vasos linfáticos (Linfangite nodular ascendente) em membro pélvico. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica, PAS e IPG.



6.3.3 Frequência de positividade para *Sporothrix* spp. das técnicas panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica nos gatos com tratamento prévio com antifúngicos e virgens de tratamento

No total dos 32 gatos examinados, as frequências de positividade para *Sporothrix* spp. foram 90,6% (n= 29) na cultura fúngica, 68,7% (n= 22) na IPG, 65,6% (n= 21) no PAS e 56,2% (n= 18) no panótico rápido. Os resultados da cultura fúngica, panótico rápido, PAS, IPG para detecção de *Sporothrix* spp. nas lesões cutâneas ulceradas de gatos previamente tratados (n= 23) e nos gatos virgens de tratamento (n= 09) encontram-se na tabela 5. A figura 14 A-B mostra gato com tratamento prévio com

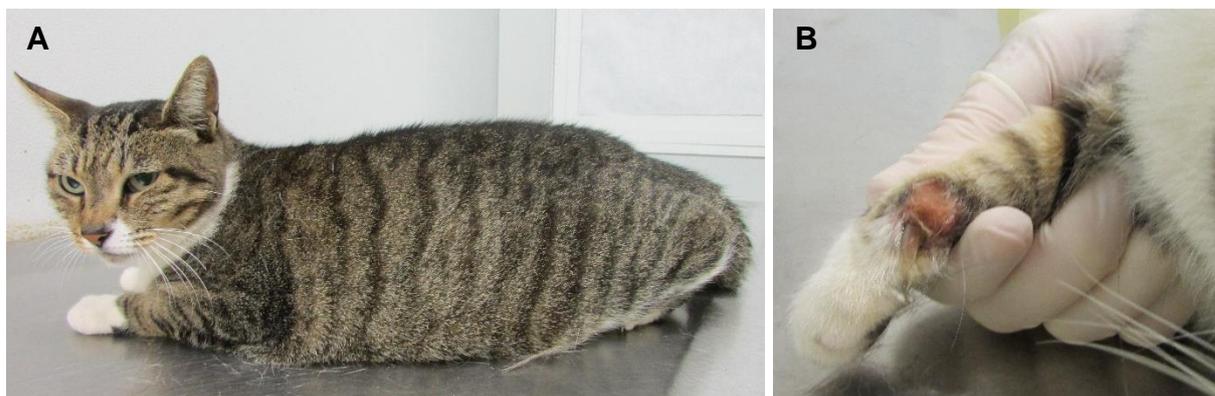
antifúngicos e lesão cutânea ulcerada, positivo para *Sporothrix* spp. na IPG (figura 14B) e negativo para *Sporothrix* spp. na cultura fúngica.

Tabela 5 – Resultados dos exames micológicos realizados em amostras oriundas de lesões cutâneas ulceradas de gatos previamente tratados e virgens de tratamento após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Gatos	Resultados	Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tratamento prévio (N= 23)	Positivo	21	91,3	14	60,8	16	69,5	16	69,5	67	72,8
	Negativo	2	8,7	9	39,2	7	30,5	7	30,5	25	27,2
Sem tratamento (N= 9)	Positivo	8	88,8	4	44,5	5	55,5	6	66,6	23	63,8
	Negativo	1	11,2	5	55,5	4	44,5	3	33,4	13	36,2

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas ou negativas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

Figura 14 – Gato com esporotricose apresentando lesão cutânea ulcerada no dígito 1 do membro torácico direito em tratamento prévio com antifúngico oral. Resultado positivo no exame citopatológico corado pela IPG e resultado negativo na cultura fúngica. (A) Bom estado clínico geral. (B) Lesão ulcerada no dígito do membro torácico.



Nas tabelas 6 e 7 encontram-se as informações individuais dos gatos em tratamento prévio e virgens de tratamento, respectivamente, incluídos no estudo. Essas informações são referentes aos resultados das diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas para a detecção de *Sporothrix* spp. e dados do animal: idade, início da doença, tempo de tratamento, se o animal estava em tratamento no momento da coleta, quanto tempo parou o tratamento, tipo de tratamento, estado geral, número de lesões e distribuição das lesões.

Tabela 6 – Dados clínicos, epidemiológicos, terapêuticos dos gatos com esporotricose previamente tratados com antifúngicos e o resultado das técnicas de diagnóstico avaliadas. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.

Gato	Sexo	Idade (meses)	Cultura	PR	PAS	IPG	Tempo de tto. (dias)	Tratando no momento	Tempo q parou tto(dias)	Tipo de tto.	Medicação	Estado geral	Nº lesões	Distribuição lesões
1	M	36	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	21	Sim	0	Oral	Itraconazol	Regular	9	L3
2	M	36	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	4	Não	60	Oral	Itraconazol	Regular	16	L3
3	F	12	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	30	Sim	0	Tópico	Cetoconazol	Ruim	7	L3
4	M	12	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	30	Sim	0	Tópico	Cetoconazol	Ruim	6	L3
5	F	23	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	150	Sim	0	Oral	Itraconazol	Bom	5	L3
6	M	48	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	1	Sim	0	Oral	Itraconazol	Regular	3	L3
7	M	19	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	160	Sim	0	Oral	Itraconazol	Bom	5	L3
8	M	132	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	30	Não	30	Oral	Itraconazol	Bom	1	L1
9	M	36	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	30	Não	60	Tópico	Cetoconazol	Regular	16	L3
10	M	30	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	150	Sim	0	Tópico	Cetoconazol	Regular	2	L2
11	M	36	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	10	Sim	0	Oral	Itraconazol	Bom	3	L3
12	M	30	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	15	Não	30	Oral	Itraconazol	Ruim	10	L3
13	M	60	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	30	Não	30	Oral	Itraconazol	Regular	15	L3
14	M	30	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	30	Sim	0	Oral	Itraconazol	Regular	12	L3
15	M	180	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	30	Não	30	Oral	Itraconazol	Regular	2	L1
16	M	18	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	30	Não	60	Oral	Itraconazol	Bom	1	L1
17	M	60	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	30	Sim	0	Oral	Itraconazol	Bom	3	L1
18	F	60	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	1	Não	30	Oral	Itraconazol	Regular	4	L3
19	M	24	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	7	Sim	0	Oral	Itraconazol	Ruim	8	L2
20	F	40	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	90	Sim	0	Tópico	Cetoconazol	Bom	3	L2
21	M	12	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	7	Sim	0	Oral	Itraconazol	Regular	13	L3
22	F	60	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	240	Sim	0	Oral	Itraconazol	Bom	1	L1
23	M	44	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	15	Não	30	Oral	Itraconazol	Bom	8	L3

Nota: Pos.= positivo; Neg.= negativo; M= macho; F= fêmea; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; tto= tratamento.

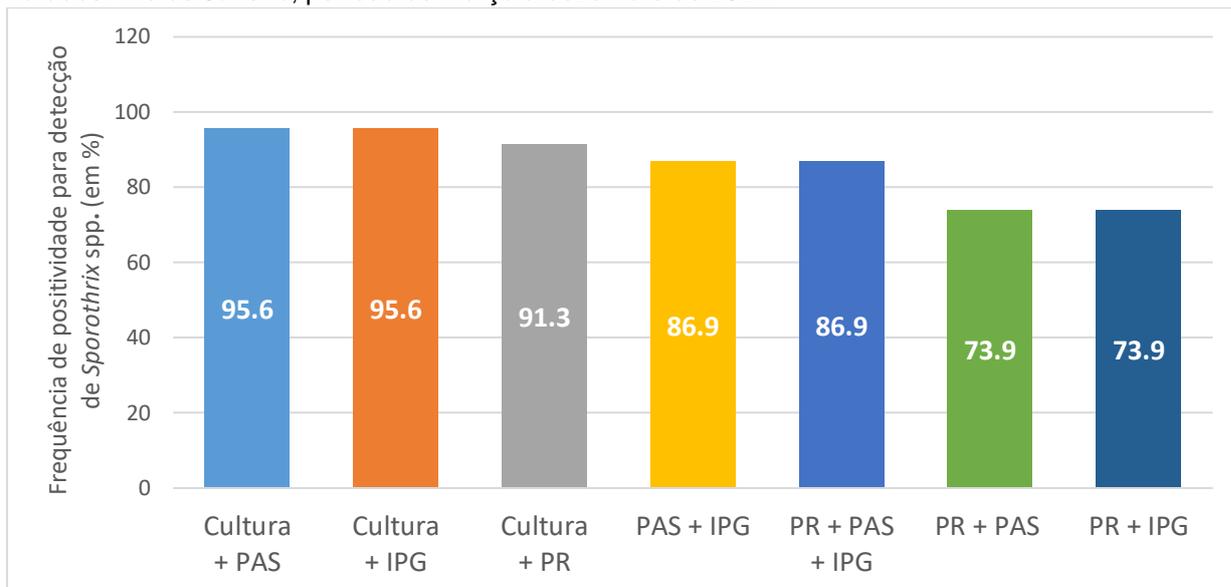
Tabela 7 – Dados clínicos, epidemiológicos, terapêuticos dos gatos com esporotricose virgens de tratamento antifúngico e o resultado das técnicas de diagnóstico avaliadas. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.

Gato	Sexo	Idade (meses)	Cultura	PR	PAS	IPG	Estado geral	Nº lesões	Distribuição lesões
1	M	24	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Bom	17	L3
2	M	24	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Regular	3	L3
3	M	36	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Bom	4	L1
4	M	16	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Regular	1	L1
5	M	18	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Regular	5	L3
6	F	30	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Bom	1	L1
7	M	60	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	Ruim	6	L3
8	M	24	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Bom	5	L1
9	F	144	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Bom	1	L1

Nota: Pos= positivo; Neg.= negativo; M= macho; F= fêmea; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; tto= tratamento.

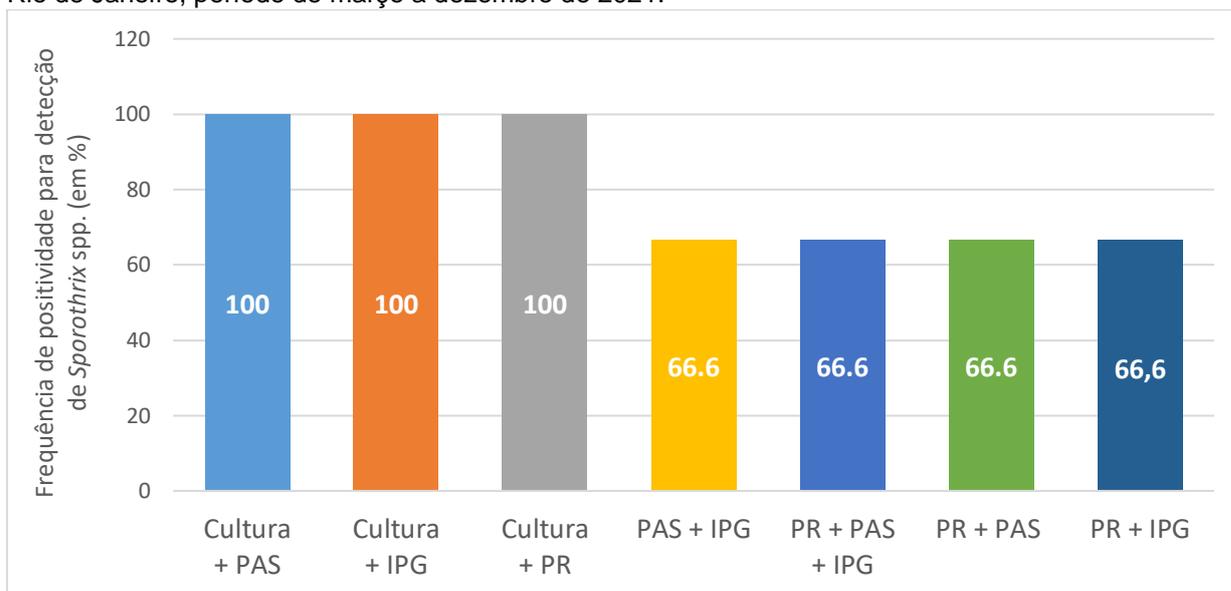
Os resultados de frequência de positividade para *Sporothrix* spp. combinando as diferentes técnicas citológicas e de cultura para o diagnóstico da esporotricose felina nos gatos previamente tratados, virgens de tratamento e no somatório desses dois grupos são mostrados nas figuras 15, 16 e 17, respectivamente.

Figura 15 - Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em gatos previamente tratados. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.



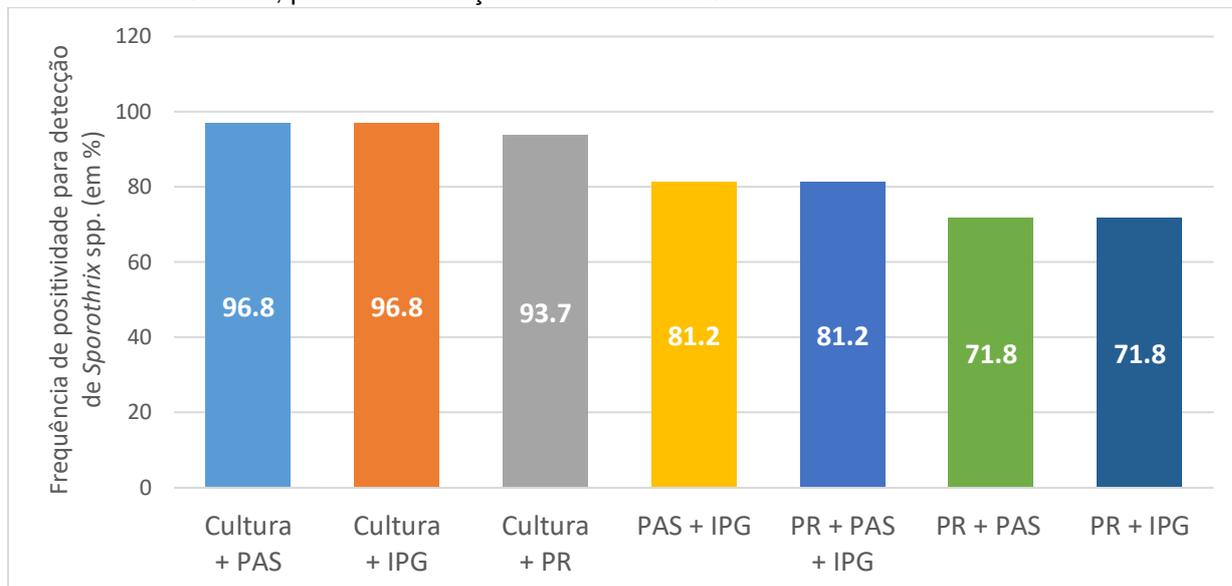
Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

Figura 16 - Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em gatos sem tratamento. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.



Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

Figura 17 - Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pela combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose nos 32 gatos incluídos no estudo. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.



Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.3.5 Frequência de positividade das técnicas citológicas e cultura de acordo com a distribuição das lesões cutâneas de esporotricose nos gatos

Considerando a distribuição das lesões nos gatos examinados com tratamento prévio, das 23 amostras coletadas, 15 (65,2%) foram obtidas de lesões de gatos classificados como L3, 5 (21,8%) em gatos L1 e 3 (13%) em gatos L2. Nos gatos virgens de tratamento, das 9 amostras coletadas, 5 (55,5%) foram obtidas de gatos L1, 4 (44,5%) em gatos L3 e nenhum gato L2. A distribuição das lesões cutâneas nos gatos com tratamento prévio e virgens de tratamento no momento da coleta da amostra encontra-se na tabela 8. O somatório dos resultados dos 2 grupos (32 gatos) encontra-se na tabela 9.

Tabela 8 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pelas técnicas de diagnóstico utilizadas (citológicas e cultura) de acordo com a distribuição das lesões cutâneas de esporotricose nas amostras de lesão cutânea coletadas dos gatos virgens de tratamento e com tratamento prévio no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Gatos	Distrib. das lesões	Frequência de positividade para <i>Sporothrix</i> spp.									
		Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tratamento prévio (N= 23)	L1 (N=5)	4	80,0	0	0	1	20,0	2	40,0	7	35,0
	L2 (N=3)	3	100,0	1	33,3	1	33,3	2	66,6	7	46,6
	L3 (N=15)	14	93,3	13	86,6	14	93,3	12	80,0	53	88,3
Sem tratamento (N= 9)	L1 (N=5)	5	100,0	1	20,0	3	60,0	3	60,0	12	60,0
	L3 (N=4)	3	75,0	3	75,0	2	50,0	3	75,0	11	68,7

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott. L1= lesões cutâneas e/ou mucosas em 1 local; L2= lesões cutâneas e/ou mucosas em 2 locais não contíguos; L3= lesões cutâneas e/ou mucosas em 3 ou mais locais não contíguos. Total= frequência de positividade por pelo menos uma das técnicas.

Tabela 9 – Frequências de positividade para *Sporothrix* spp. pelas técnicas de diagnóstico utilizadas (citológicas e cultura) de acordo com a distribuição das lesões cutâneas de esporotricose nas amostras de lesão cutânea dos gatos no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Distribuição das lesões	Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
L1 (N= 10)	9	90,0	1	10,0	4	40,0	5	50,0	19	47,5
L2 (N= 3)	3	100,0	1	33,3	1	33,3	2	66,6	7	58,3
L3 (N= 19)	17	89,4	16	84,2	17	89,4	15	78,9	65	85,5

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott. L1= lesões cutâneas e/ou mucosas em 1 local; L2= lesões cutâneas e/ou mucosas em 2 locais não contíguos; L3= lesões cutâneas e/ou mucosas em 3 ou mais locais não contíguos. Total= frequência de positividade por pelo menos uma das técnicas.

.6.3.6 Frequência de positividade das técnicas citológicas e cultura de acordo com o estado clínico dos gatos examinados

Considerando o estado clínico dos gatos examinados com tratamento prévio, das 23 amostras coletadas, 10 (43,5%) estavam em estado regular, 9 (39,1%) com bom estado clínico e 4 (17,4%) em estado ruim. Nos gatos virgens de tratamento, das 9 amostras coletadas, 5 (55,5%) estavam em bom estado geral, 3 (33,3%) com estado geral regular e 1 (11,2%) em estado ruim. As frequências de positividade para *Sporothrix* spp. do panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica em relação ao estado clínico dos gatos com tratamento prévio e virgens de tratamento no momento da coleta da amostra encontram-se na tabela 10. O somatório dos 2 grupos (32 gatos) encontra-se na tabela 11.

Tabela 10 – Frequência de positividade das técnicas Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica de acordo com o estado clínico dos gatos virgens de tratamento e com tratamento prévio no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Gatos	Estado clínico	Frequência de positividade para <i>Sporothrix</i> spp.									
		Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Tratamento prévio (N= 23)	Bom (N= 9)	7	77,7	3	33,3	5	55,5	4	44,4	19	52,7
	Reg. (N= 10)	10	100,0	8	80,0	8	80,0	9	90,0	35	87,5
	Ruim (N= 4)	4	100,0	3	75,0	3	75,0	3	75,0	13	81,2
Sem tratamento (N= 9)	Bom (N= 5)	4	80,0	2	40,0	4	80,0	4	80,0	14	70,0
	Reg. (N= 3)	3	100,0	1	33,3	0	0	1	33,3	5	41,6
	Ruim (N= 1)	1	100,0	1	100,0	1	100,0	1	100,0	4	100,0

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; Reg.= regular.

Tabela 11 – Frequência de positividade das técnicas Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica de acordo com o estado clínico dos gatos no momento da coleta da amostra. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Estado clínico	Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Bom (N= 14)	11	78,5	5	35,7	9	64,2	8	57,1	33	58,9
Regular (N= 13)	13	100,0	9	69,2	8	61,5	10	76,9	40	76,9
Ruim (N= 5)	5	100,0	4	80,0	4	80,0	4	80,0	17	85,0

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.3.7 Sensibilidade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de gatos

Os resultados de sensibilidade do exame citopatológico para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas ulceradas pelos métodos IPG, PAS e panótico rápido nos gatos previamente tratados foram de 71,4%, 71,4% e 66,6% respectivamente, nos gatos sem tratamento foram de 50%, 50% e 37,5% respectivamente e no total dos 29 gatos examinados, as sensibilidades foram 65,5%, 65,5% e 58,6% respectivamente. O número de casos positivos e negativos para as técnicas citopatológicas em comparação com a cultura fúngica encontram-se descritas na tabela 12 e 13.

Tabela 12 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em gatos previamente tratados. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Técnicas	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
PR positivo	14	0	14
PR negativo	7	2	9
PAS positivo	15	1	16
PAS negativo	6	1	7
IPG positivo	15	1	16
IPG negativo	6	1	7
Total	21	2	23

Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

Tabela 13 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em gatos sem tratamento. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Técnicas	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
PR positivo	3	1	4
PR negativo	5	0	5
PAS positivo	4	1	5
PAS negativo	4	0	4
IPG positivo	4	1	5
IPG negativo	4	0	4
Total	8	1	9

Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.3.8 Frequências de positividade das técnicas citopatológicas para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de gatos de acordo com os observadores 1 e 2

A frequência de positividade entre observador 1 e 2 encontra-se na tabela 14.

Tabela 14 – Frequência de positividade de *Sporothrix* spp. nos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos corados por diferentes técnicas de acordo com os observadores 1 e 2. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Observadores	PR		PAS		IPG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Observador 1 (N= 96)	18	56,2	21	65,6	22	68,7	61	63,5
Observador 2 (N= 96)	22	68,7	30	93,7	31	96,8	83	86,4

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.4 RESULTADOS NOS CÃES

6.4.1 Dados demográficos dos cães

Foram coletadas neste estudo amostras de 4 cães, sendo todos fêmeas, dois deles de raça (Pastor Alemão e Pitbull). A média de idade foi de 99 meses (8,2 anos). Todos os cães eram do município do Rio de Janeiro.

6.4.2 Local da coleta das lesões no cão

Na tabela 15 são descritas as frequências das localizações anatômicas de onde as amostras foram coletadas. As lesões ulceradas na orelha, tórax (figura 18A) e membro torácico (figura 19A) foram as predominantes e em todas as amostras dos cães foram feitas *imprints* em úlcera (figuras 18B e 19B).

Tabela 15 - Local de coleta das lesões nos cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Localização anatômica	Número de amostras (N=4)	
	n	%
Tórax	2	50,0
Orelha	1	25,0
Membro torácico	1	25,0

Nota: N= número total de amostras examinadas; n= número de amostras examinadas em cada localização anatômica

Figura 18 –Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em cães. (A) Cão fêmea em bom estado clínico geral com lesões na região torácica; (B) Três lesões ulceradas. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica e PAS.

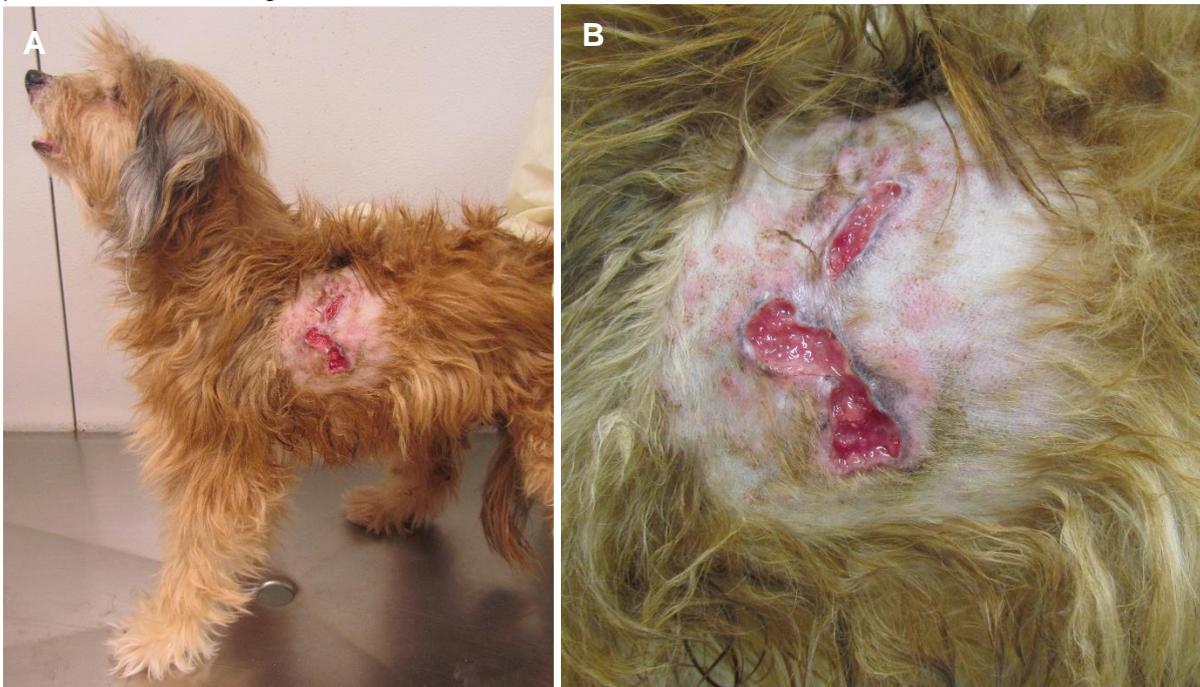


Figura 19 – Tipo de lesão causada pelo *Sporothrix* spp. em cães. (A) Cão fêmea em bom estado clínico geral com lesão no metacarpo do membro torácico direito; (B) Uma lesão ulcerada. Animal diagnosticado com esporotricose: positivo na cultura fúngica e PAS.



6.4.3 Frequência de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de cães

A frequência de positividade para *Sporothrix* spp. na cultura fúngica, PAS, IPG e panótico rápido nos cães foram de 75%, 50%, 25% e 0% respectivamente. O número de casos positivos e negativos para cada técnica avaliada encontra-se descrito na tabela 16.

Tabela 16 – Casos positivos e negativos para *Sporothrix* pelas técnicas de Panótico Rápido, PAS, IPG e cultura fúngica nos cães após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Resultados	Cultura (N= 4)	PR (N= 4)	PAS (N= 4)	IPG (N= 4)
Positivo	3	0	2	1
Negativo	1	4	2	3

Nota: N= número de amostras; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.4.4 Informações gerais dos cães

A tabela 17 demonstra os cães com as informações de sexo, idade, início da doença, tratamento prévio ou não, tempo de tratamento, tipo de tratamento, estado geral, número de lesões e os resultados positivo ou negativo da cultura fúngica, panótico rápido, PAS e IPG.

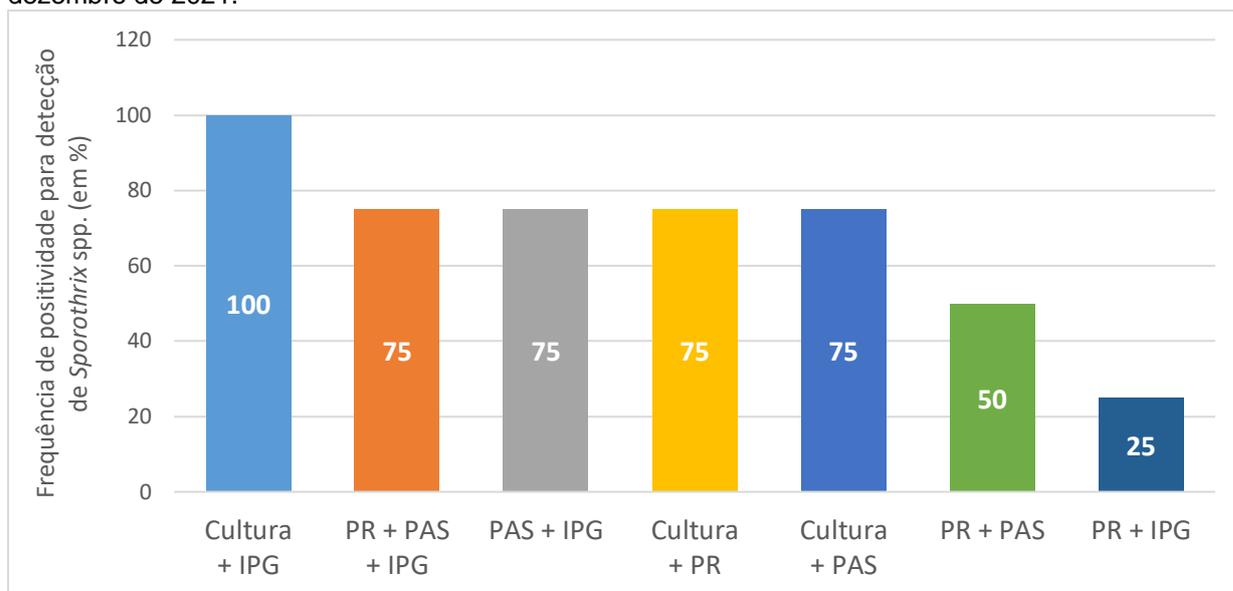
Tabela 17 – Quadro com dados dos cães. Rio de Janeiro, RJ, período de março a dezembro de 2021.

Cão	Sexo	Idade (meses)	Cultura	PR	PAS	IPG	Tto. prévio	Tempo de tto. (dias)	Tipo de tto.	Medicação	Estado geral	Nº de lesões
1	F	96	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Não	0	0	0	Bom	2
2	F	132	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Não	0	0	0	Bom	2
3	F	60	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Não	0	0	0	Regular	7
4	F	108	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Sim	21 - atual	Tópico	Cetoconazol	Bom	3

Nota: F= fêmea; M= macho; Pos.= positivo; Neg.= negativo; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; tto= tratamento.

Na figura 20 encontram-se os resultados de frequência de positividade para *Sporothrix* spp. combinando as diferentes técnicas citológicas e de cultura para o diagnóstico da esporotricose canina.

Figura 20 - Frequências de positividade da combinação entre as técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica para diagnóstico da esporotricose em cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.



Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.4.5 Sensibilidade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de cães

Os resultados de sensibilidade do exame citopatológico para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas ulceradas pelos métodos PAS, IPG e panótico rápido nos cães foram de 66,6%, 0% e 0% respectivamente. O número de casos positivos e negativos para as técnicas citopatológicas em comparação com a cultura fúngica encontram-se descritas na tabela 18.

Tabela 18 – Número de casos positivos e negativos das técnicas de panótico rápido, PAS e IPG usando a cultura fúngica positiva como padrão de referência no diagnóstico da esporotricose em cães. Resultado obtido após consenso dos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Técnicas	Cultura positiva	Cultura negativa	Total
PR positivo	0	0	0
PR negativo	3	1	4
PAS positivo	2	0	2
PAS negativo	1	1	2
IPG positivo	0	1	1
IPG negativo	3	0	3
Total	9	3	12

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.4.6 Frequência de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de cães virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos

A tabela 19 compara as três técnicas de coloração estudadas e cultura fúngica com cães virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos.

Tabela 19 – Frequência de positividade para *Sporothrix* pelas técnicas de panótico rápido, PAS, IPG e cultura fúngica após consenso dos dois observadores em cães incluídos virgens de tratamento e com tratamento prévio com antifúngicos. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

	Cultura		PR		PAS		IPG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sem tratamento	3	100,0	0	0	2	66,6	0	0	3	75,0
Tratamento prévio	0	0	0	0	0	0	1	33,3	1	25,0

Nota: N= número de amostras examinadas; n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.4.7 Frequências de positividade das técnicas citopatológicas e cultura fúngica para detecção de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. em lesões cutâneas de cães de acordo com o observador 1 e 2

A frequência de positividade entre os observadores 1 e 2 encontra-se na tabela 20.

Tabela 20 – Frequência de positividade entre observador 1 e 2, nos cães. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

	PR		PAS		IPG		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Observador 1	0	0	2	25,0	1	12,5	3	12,5
Observador 2	2	25,0	6	75,0	7	87,5	15	62,5

Nota: n= número de amostras positivas; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.5 TEMPO DE LEITURA DAS LÂMINAS CONTENDO *IMPRINTS* DE LESÃO CUTÂNEA ULCERADA DE GATOS E CÃES POR TÉCNICA DE EXAME CITOPATOLÓGICO PARA A DETECÇÃO DE ESTRUTURAS LEVEDURIFORMES DE *Sporothrix* spp..

Os resultados do tempo de leitura realizado pelos dois observadores no exame citopatológico pelos métodos panótico rápido, PAS e IPG encontram-se descritos na tabela 21.

Tabela 21 – Média do tempo de leitura das lâminas coradas pelas técnicas de panótico rápido, PAS e IPG para detecção de *Sporothrix* spp. pelos dois observadores. Rio de Janeiro, período de março a dezembro de 2021.

Observadores	Média do tempo de leitura (s)		
	PR	PAS	IPG
Observador 1	244	175	237
Observador 2	301	186	250
Total	545	361	487

Nota: s= segundos; PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott.

6.6 ÍNDICE DE CONCORDÂNCIA INTER OBSERVADORES NOS RESULTADOS DAS LEITURAS DOS EXAMES CITOPATOLÓGICOS DE LESÕES CUTÂNEAS ULCERADAS DE GATOS E CÃES CORADOS PELOS MÉTODOS PANÓTICO RÁPIDO, PAS E IPG

A concordância inter observadores dos resultados dos exames citopatológicos de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães realizados é descrita na tabela 22, segundo o grau de concordância (valor Kappa).

Tabela 22 - Concordância Inter observadores dos valores de kappa para as técnicas de panótico rápido, PAS e IPG no diagnóstico da esporotricose canina e felina em *imprint* de lesões cutâneas. Rio de Janeiro no período de março a dezembro de 2021.

OBSERVADOR 1 X 2		
Técnica	Valor Kappa	Grau de concordância
PR	0,560	moderada
PAS	0,266	razoável
IPG	0,231	razoável

Nota: PR= panótico rápido; PAS= ácido periódico de Schiff; IPG= impregnação pela prata de Grocott; Valor de kappa= 0,2 a 0,4 (concordância razoável); valor de kappa= 0,40-0,59 (concordância moderada); valor de kappa= 0,60-0,79 (concordância substancial); valor de kappa: 0,80-1,00 (concordância quase perfeita).

7 DISCUSSÃO

No cenário epidemiológico da esporotricose felina e canina no Brasil, principalmente em regiões hiperendêmicas como o estado do Rio de Janeiro, alternativas para o diagnóstico dessa micose são recomendáveis, considerando que o método padrão de referência, a cultura fúngica, nem sempre está disponível, o resultado pode ser demorado, há a possibilidade da ocorrência de resultado falso-negativo, além de problemas de contaminação por ácaros e microrganismos. Nesse contexto, o presente estudo compara pela primeira vez o exame citopatológico em *imprints* de lesões cutâneas corados pelo panótico rápido, PAS e IPG com a cultura fúngica no diagnóstico da esporotricose em cães e gatos. Foi descrita nova forma de coleta (*imprint*) para técnicas de diagnóstico animal utilizando as colorações específicas PAS e IPG no exame citopatológico para detecção de *Sporothrix* spp. As técnicas de IPG e PAS foram comparadas com o exame citopatológico tradicional e com a cultura fúngica, visando melhorar a sensibilidade do exame citopatológico para diagnóstico da esporotricose felina e canina, principalmente nos casos de baixa carga fúngica.

A avaliação da sensibilidade do exame citopatológico para o diagnóstico da esporotricose felina pelo método panótico rápido já foi descrita anteriormente como observamos em alguns estudos como Macêdo-Sales et al. (2018), Pereira et al. (2011), Redigueri et al. (2022), Silva et al. (2015) e Silva et al. (2018). Entretanto, os exames citopatológicos utilizando os métodos de coloração PAS e IPG ainda não haviam sido analisados no diagnóstico da esporotricose animal. No presente estudo, avaliamos os gatos tratados previamente separadamente dos animais virgens de tratamento afim de compararmos o desempenho dos exames citológicos usando três colorações nesses dois grupos de animais.

A frequência de positividade para *Sporothrix* spp. nos gatos previamente tratados e nos virgens de tratamento pelas colorações IPG (69,5%, 66,6%, respectivamente) e PAS (69,5%, 55,5%, respectivamente) foi maior quando comparados ao panótico rápido (60,8%, 44,5%, respectivamente). A cultura fúngica reafirma sua importância como método padrão de referência no diagnóstico da esporotricose com uma positividade de 91,3% nos gatos previamente tratados e 88,8% nos gatos virgens de tratamento ao ser comparada com o PAS, IPG e panótico rápido (GREMIÃO et al., 2020a; LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2018;). No entanto, a cultura

fúngica não possui uma sensibilidade absoluta e o crescimento do *Sporothrix* spp. pode não ocorrer da forma desejada resultando em exames falso-negativos, como relatam Gonsales et al. (2020), Macêdo-Sales et al. (2018), Redigueri et al. (2022) e Silva et al. (2015). Esses autores detectaram *Sporothrix* spp. na PCR (GONSALES et al., 2020; MACÊDO-SALES et al., 2018) e citopatologia utilizando a coloração panótico rápido (REDIGUIERI et al., 2022; SILVA et al., 2015) em gatos com a cultura negativa. A detecção de *Sporothrix* pelos exames citopatológicos em amostras negativas na cultura fúngica foi observado igualmente neste estudo em três amostras: duas de gatos previamente tratados (uma pelo PAS, uma pela IPG) e uma em gato virgem de tratamento (positivo nas 3 colorações). Em duas dessas amostras, o gato estava em tratamento com anti-fúngico oral, fato semelhante relatado por Macêdo-Sales et al. (2018), o que pode ter causado a negatividade da cultura por redução da carga fúngica e/ou inibição do crescimento fúngico e, no gato virgem de tratamento, uma provável contaminação microbiana da cultura, má coleta, transporte e/ou armazenamento inadequados, pois foi observado uma grande quantidade de leveduras de *Sporothrix* spp. nos exames citopatológicos panótico rápido, PAS e IPG.

Nos gatos com tratamento prévio e virgens de tratamentos, as colorações PAS e IPG apresentaram melhor sensibilidade na detecção de *Sporothrix* spp. quando comparadas ao panótico rápido tendo a cultura fúngica como padrão de referência. Esse resultado quanto ao desempenho das técnicas no diagnóstico da esporotricose felina está de acordo com os observados nesse estudo quanto às frequências de positividade dos exames citopatológicos. De forma semelhante, Silva et al. (2018) também encontraram uma melhor sensibilidade da técnica de IPG (91,3%), porém utilizando o exame histopatológico, comparada ao exame citopatológico corado pelo panótico rápido (87%). A sensibilidade encontrada pelos métodos de coloração nos gatos com tratamento prévio e virgens de tratamento pelo IPG (71,4% e 50% respectivamente) e PAS (71,4% e 50%, respectivamente) foi considerada satisfatória comparada ao menos sensível panótico rápido (66,6% e 37,5%, respectivamente). Entretanto, Miranda et al. (2018), Pereira et al. (2011), Redigueri et al. (2022), Silva et al. (2015) e Silva et al. (2018) relataram valores mais altos de sensibilidade da técnica do panótico rápido (93%, 78,9%, 95%, 84,9% e 87% respectivamente) em exames citopatológicos de *imprints* de lesão cutânea para o diagnóstico da esporotricose felina. Embora a cultura fúngica tenha sido também utilizada como padrão de referência, o critério de seleção das amostras nos estudos de Miranda et al. (2018), Redigueri et al.

(2022), Silva et al. (2015) e Silva et al. (2018) foi diferente do presente estudo, devido à exclusão de animais em tratamento, o que pode ter influenciado na maior sensibilidade observada dessas pesquisas em comparação ao presente estudo. De forma semelhante à presente pesquisa, Pereira et al. (2011) e Macêdo-Sales et al. (2018) (panótico rápido com sensibilidade 52,6%) incluíram gatos tratados e não tratados e obtiveram sensibilidade menor comparado aos demais trabalhos. Na pesquisa de Pereira et al. (2011) é possível que a maioria dos gatos eram virgens de tratamento o que seria uma hipótese para explicar a sensibilidade do panótico rápido mais elevada do que no presente estudo, pois não menciona quantos gatos foram tratados ou eram virgens de tratamento. No entanto, Macêdo-Sales et al. (2018) relataram que somente 41,2% dos gatos estavam em tratamento e obtiveram a menor sensibilidade comparando as pesquisas aqui citadas, sendo provável que a duração do tratamento de até cinco anos tenha influenciado na sensibilidade, visto que no presente estudo o máximo foram 2 meses. Como no presente estudo 72% das amostras foram provenientes de gatos em tratamento no momento da coleta ou anteriormente, provavelmente a redução da carga fúngica pelo tratamento esteve relacionada à menor sensibilidade não somente no panótico como no PAS e IPG comparada à literatura. Em gatos com alta carga fúngica, as células leveduriformes são facilmente encontradas independente do método utilizado. Porém, nos gatos com baixas cargas fúngicas a detecção das estruturas fúngicas é mais difícil, sobretudo nos gatos em tratamento, em bom estado geral ou com poucas lesões (MIRANDA et al., 2013; MIRANDA et al., 2018), questionando o uso da citopatologia pelo panótico rápido como recurso único para confirmação do diagnóstico da esporotricose felina (MACÊDO-SALES et al., 2018).

Uma das vantagens dos métodos citopatológicos com coloração PAS e IPG quando comparados à histopatologia com as mesmas colorações e a imunohistoquímica é a coleta da amostra biológica de forma não invasiva, sem realização de biópsia, não havendo necessidade de uso de anestésico local e sedativo (GONSALES et al., 2019; LUIZ et al., 2022; MIRANDA et al., 2013; REDIGUIERI et al., 2022; SILVA et al., 2018). Outra vantagem com relação à histopatologia (PAS e IPG) e IHQ é o fato do exame citopatológico ser mais rápido, menos laborioso e necessitar de menos equipamentos, pois não há as etapas de processamento de tecidos para emblocamento em parafina e de realização de cortes histológicos. Portanto, o custo do exame citopatológico é também inferior ao das técnicas histológicas. Entretanto, a

histopatologia usando a IPG apresenta uma maior sensibilidade, variando entre 91 e 94% (MIRANDA et al., 2013; SILVA et al., 2018), quando comparado ao exame citopatológico no diagnóstico da esporotricose felina. Entretanto, deve ser considerado que nos estudos de Miranda et al. (2013) e Silva et al. (2018) os gatos examinados eram virgens de tratamento, o que pode ter contribuído para a sensibilidade mais elevada do que os exames citopatológicos realizados no presente estudo. Outra desvantagem do exame citopatológico com relação às técnicas histológicas é a ocorrência de alterações indesejadas nas lâminas como *imprint* espesso (excesso de exsudato ou sangue) ou presença de crostas hemáticas resultando em lâminas com falso-negativo. E na IPG os artefatos são frequentes e podem ser confundidos com as estruturas fúngicas especialmente em casos de baixa carga fúngica (MIRANDA et al. 2011), tornando desejável a assepsia adequada da lesão no momento da coleta do material e a experiência profissional necessária para uma coleta adequada do *imprint* da lesão.

A combinação entre os métodos de diagnóstico da esporotricose em gatos confirma uma melhora do diagnóstico através de diversos arranjos (GONSALES et al. 2020; SILVA et al. 2018). A cultura fúngica apresenta uma maior positividade em gatos com tratamento prévio e virgens de tratamento quando associada aos exames citopatológicos com as colorações PAS (95,6% e 100%), IPG (95,6% e 100%), e panótico rápido (91,3% e 100%). No estudo de Gonsales et al. (2020) a combinação da cultura e PCR em swab de lesão teve uma frequência de positividade de 87,1%, superior à da cultura (71,4%) e da PCR (81,4%) isoladamente. As combinações dos exames citopatológicos corados pelo PAS e IPG ou PAS, IPG e panótico rápido foram os métodos de coloração com maior frequência de positividade neste estudo nos gatos (81,2%), tornando a combinação PAS e IPG mais desejável ao corresponder ao mesmo resultado sem a necessidade de mais uma coloração. Silva et al. (2018) combinaram o panótico rápido e IPG (exame histopatológico) no diagnóstico da esporotricose felina, resultando na sensibilidade de 96,7%, superior à sensibilidade do presente estudo com a mesma combinação (71,8%). Essa diferença de sensibilidade pode ter sido causada pelo critério de exclusão de gatos anteriormente tratados com antifúngico, que foi adotado por Silva et al. (2018). Portanto, considerando os resultados do presente estudo e das outras pesquisas supracitadas, a combinação de técnicas para o diagnóstico da esporotricose felina é desejável, pois proporciona aumento da

sensibilidade do diagnóstico, sobretudo quando a cultura parasitológica é associada a outro método.

A coloração pelos métodos citopatológicos PAS e IPG possui um tempo de execução e um custo maior quando comparado ao panótico rápido, contudo o resultado dos exames fica pronto em até duas horas e o custo não é inviável para uso em clínicas e laboratórios, e apenas a IPG necessita de geladeira para armazenamento e estufa para uma das etapas do processamento, diferentemente da cultura fúngica cujo resultado demora no mínimo sete dias e necessita de um laboratório de alta complexidade (nível 2 de biossegurança), com custos e equipamentos de valores elevados (GONSALES et al., 2018; LÓPEZ-ROMERO et al., 2011; MACÊDO-SALES et al., 2018; RIPPON et al., 1988).

A idade, raça, sexo e procedência dos gatos foram avaliados. Foi encontrada uma população predominante de machos (78,1%) em idade reprodutiva (3,6 anos), com acesso à rua (85%) e mestiços (100%), o que está de acordo ao perfil de gatos com esporotricose encontrados em outras pesquisas (ALMEIDA et al., 2018; MACÊDO-SALES et al., 2018; MIRANDA et al., 2013; REDIGUIERI et al., 2022; SILVA et al., 2015; SILVA et al., 2022). A maior ocorrência da esporotricose nos gatos com essas características está relacionada à exposição em brigas com arranhaduras e mordeduras por disputa de território e de fêmeas, o que aumentam a chance de infecção por *Sporothrix* nesses animais (BARROS, PAES, SCHUBACH, 2011; BISON, PARENTONI, BRASIL, 2020; REDIGUIERI et al., 2022). Com relação à procedência dos gatos, a maioria foi proveniente da zona norte do município do Rio de Janeiro (BISON, PARENTONI, BRASIL, 2020; FREITAS et al., 2014; GREMIÃO et al., 2020a; MACÊDO-SALES et al., 2018; RABELLO et al., 2021; SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2021).

De acordo com a classificação pela distribuição de lesões L1, L2 e L3 foi observado que nos gatos previamente tratados quanto maior a distribuição de úlceras e/ou nódulos ulcerados maior a frequência de positividade nas técnicas de coloração. Esse resultado foi semelhante aos de outros autores tanto na técnica citopatológica pelo panótico rápido com amostra por *imprint* observado por Silva et al. (2015) demonstrando sensibilidade de L1= 75% e L3= 88,5%, quanto por Miranda et al. (2013) na técnica histopatológica usando a IPG em biópsias onde observaram uma crescente positividade de L1 para L3 (L1= 14,3%, L2= 17,9% e L3= 67,9%). Esses resultados provavelmente estão relacionados a maior carga fúngica nos gatos L3 em comparação

a L1 (MIRANDA et al., 2013; SILVA et al., 2022).O presente estudo demonstra que a sensibilidade da IPG (50%), comparada a do PAS (40%) e panótico rápido (10%), foi a melhor para diagnóstico citopatológico da esporotricose em gatos com L1 .Nos gatos virgens de tratamento a frequência de positividade maior nos animais L1 quando comparado à L3, pode ter sido decorrente do número pequeno da amostra (N= 9).

Com relação ao estado clínico dos gatos com tratamento prévio observou-se que nos estados regular e ruim comparado ao estado bom, houve maior frequência de positividade nas três colorações. Estudos recentes relatam que gatos com estado clínico ruim apresentam a distribuição das lesões em L3, assim como no presente estudo, e associam esses resultados à possível alta carga fúngica que pode estar relacionada com falhas, resistência ou ausência do tratamento ou comorbidades (MACÊDO-SALES et al., 2018; MIRANDA et al., 2013; MIRANDA et al., 2018; SILVA et al., 2022).

A frequência de positividade entre os observadores 1 e 2 demonstra a diferença da experiência na leitura das lâminas, como Silva et al. (2015) com a tendência do pesquisador menos experiente apresentar resultados falso-positivos. No presente estudo a divergência foi maior nas colorações PAS e IPG, demonstrando que o treinamento é imprescindível para leitura nessas colorações, que podem corar de forma não específica e os polissacarídeos e/ou a contaminação com leveduras podem confundir o leitor menos experiente. A importância do aprimoramento é observada na prática com o ajuste entre observadores e a necessidade de observar tamanho, intensidade da coloração, forma, localização e presença da parede celular para a correta identificação da levedura do *Sporothrix* spp.

A idade média dos cães neste estudo foi de 5 à 11 anos, relatando uma idade adulta ou avançada, dependendo da raça e porte. A idade avançada para alguns animais contribui com a baixa da imunidade, podendo aumentar a possibilidade de contrair a esporotricose por via sapronótica, fato esse que necessitaria de mais estudos. Contudo, a transmissão zoonótica como principal fonte de contaminação dos cães é amplamente relatada (BARROS, PAES, SCHUBACH, 2011; MIRANDA et al., 2010; SANTOS et al., 2007). No presente estudo um cão teve contaminação por arranhadura/mordedura por gato infectado com *Sporothrix* spp. e os demais não tinham contato direto com outros animais ou acesso à rua, porém residiam em casas com quintal e com felinos peridomiciliados, assim como descrito por Filgueira (2009) e residiam em área endêmica do estado do Rio de Janeiro (FREITAS et al., 2014;

GREMIÃO et al., 2020a; RABELLO et al., 2021; SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 2021).

Nos cães, o estudo de comparação do exame citopatológico em *imprints* de lesões cutâneas corados pelo panótico rápido, PAS e IPG com a cultura fúngica no diagnóstico da esporotricose canina revelou em um total de 4 cães, uma frequência de positividade superior do PAS (50%) e IPG (25%) quando comparados ao panótico rápido (0%). A frequência de positividade da cultura fúngica (75%) foi superior nos cães quando comparada à obtida pelos métodos citopatológicos, porém a frequência de positividade foi bem inferior a encontrada em gatos (90,6%). Santos et al. (2007) e Miranda et al. (2011) também encontraram baixas frequências de positividade para *Sporothrix* spp. em biópsias de pele de lesão de cães com esporotricose que foram processadas pelo exame histopatológico corado pelo PAS e IPG. Santos et al. (2007) encontraram uma sensibilidade de 17% pelo PAS e IPG e Miranda et al. (2011) observaram uma sensibilidade de 19,5% pelo PAS e 43,7% pelo IPG. Esses resultados e os do presente estudo, confirmam a dificuldade de diagnóstico da esporotricose canina mesmo utilizando amostra mais invasiva como a biópsia, que normalmente tem melhores resultados que amostra coletada por *imprint* ou *swab* de lesão. Entretanto, no presente estudo o PAS apresentou uma sensibilidade maior (66,6%) do que a técnica de histopatologia usando PAS e IPG (MIRANDA et al., 2011; SANTOS et al., 2007), o que pode ter sido influenciado pelo baixo número de amostras testadas no presente estudo.

Na cultura fúngica, a coleta da amostra de cães através de *swab* (que apresenta sensibilidade inferior à coleta por biópsia), a frequente baixa carga fúngica em cães e o risco de contaminação na coleta ou transporte, predispõe à sensibilidade inferior dessa técnica para o diagnóstico da esporotricose canina quando comparada ao desempenho no diagnóstico da esporotricose felina (SANTOS et al., 2018; SCHUBACH, MENEZES, WANKE, 2012). No presente estudo conseguimos detectar pelo *imprint* da lesão ulcerada na coloração pela IPG a levedura de *Sporothrix* spp. em um cão negativo na cultura, mostrando a necessidade de combinar as técnicas visando aumentar a sensibilidade do diagnóstico da esporotricose canina. Nesse sentido, a associação do PAS e IPG com as demais técnicas citológicas e de cultura pode representar uma opção diante da dificuldade de diagnóstico da esporotricose canina. Assim, a cultura fúngica somada ao PAS ou IPG apresenta uma sensibilidade de cerca de 4 a 5 vezes superior (75% e 100%) à sensibilidade de 19,5% encontrada por Miranda

et al. (2011) para PAS em amostras de pele com lesão fixadas em formalina tamponada a 10% e emblocadas em parafina. Contudo, novos estudos com número maior de amostras devem ser realizados para confirmar esses resultados.

O Lapclin-Dermzoo vem observando um crescente número de casos em cães no estado do Rio de Janeiro desde 1998 (MIRANDA et al., 2010; SANTOS et al., 2007;). Neste presente estudo, todos os cães eram da cidade do Rio de Janeiro e com predominância da Zona Norte, semelhante ao estudo realizado por Santos et al. (2007).

O maior número de lesões foi encontrado no tórax, orelha e membro torácico, confirmando os achados de outros estudos (SANTOS et al., 2007; SOUZA et al., 2009). Souza et al. (2009) descrevem que os locais mais frequentes das lesões da esporotricose canina são: orelhas, cabeça e tronco. A forma cutânea da esporotricose canina mais comumente observada no presente estudo foi caracterizada por nódulos firmes e múltiplos, placas ulceradas com bordas elevadas ou áreas anulares com crostas e alopecias, não dolorosas nem pruriginosas, corroborando com os achados de outras pesquisas em cães com esporotricose (FILGUEIRA, 2009; SANTOS et al., 2007).

A relação do número de lesões com o aumento da frequência de positividade dos métodos de diagnóstico fica prejudicada devido ao número baixo de amostras. Contudo, foi possível observar que em cães com mais de uma lesão, as colorações PAS e IPG apresentaram frequência de positividade maior que o panótico rápido.

Nos cães examinados no presente estudo, a maioria apresentava um bom estado clínico (75%), assim como Santos et al. (2007) que relataram um predomínio do bom estado geral (90,2%) em 74 cães com esporotricose. Nas colorações dos exames citológicos, somente o PAS (66,6%) e a IPG (33,3%) conseguiram alguma positividade comparada a coloração pelo panótico rápido (0%) nos cães com estado clínico bom e com os menores números de lesões, reforçando a maior frequência de positividade dessas colorações na citopatologia para o diagnóstico da esporotricose em cães.

Nos cães sem tratamento (n= 3), houve uma frequência de positividade do PAS (n= 2) superior à IPG e panótico rápido, que não apresentaram nenhuma positividade. Por sua vez, em cães com tratamento prévio a frequência de positividade da IPG (n= 1) foi superior ao PAS e panótico rápido (ambos n= 0). Portanto, nos cães com ou sem tratamento é observada uma frequência de positividade na coloração pelo PAS e IPG superior à do panótico rápido, reafirmando a aplicabilidade dessas colorações, embora seja uma limitação o número baixo das amostras. Os cães virgens de tratamento

possuem maior carga fúngica facilitando o cultivo *in vitro* do *Sporothrix* spp. no laboratório e favorecendo uma maior positividade no resultado da cultura fúngica (GONSALES et al., 2020; MIRANDA et al., 2018). A cultura fúngica neste estudo apresenta uma maior frequência de positividade nos cães virgens de tratamento (n= 3) ao compararmos com os previamente tratados (n= 0).

Ao compararmos as técnicas de coloração, o maior tempo para leitura das lâminas foi observado no panótico rápido e o mais curto no PAS, com média dos dois observadores. No panótico rápido é possível identificarmos as células inflamatórias e hemácias, o que atrapalha a visualização das leveduras. Porém, no PAS e IPG as células inflamatórias e hemácias ficam pouco visíveis e as leveduras ficam coradas e evidentes, melhorando não somente a sensibilidade como o tempo de leitura. O menor tempo de leitura é uma vantagem do IPG e PAS, pois aumentam a produtividade do laboratório.

A comparação dos resultados da leitura das lâminas dos exames citopatológicos interobservador, mostraram uma maior concordância do panótico rápido e uma menor concordância para técnicas de PAS e IPG. Esses resultados demonstram que as colorações pelo PAS e IPG exigem maior experiência no conhecimento da levedura do *Sporothrix* spp. Como cita Macêdo-Sales et al., (2018) a baixa carga fúngica exige busca criteriosa em todos os campos da lâmina além do treinamento prévio e experiência para a identificação do *Sporothrix* spp. As técnicas de PAS e IPG são colorações específicas usadas na histopatologia (MIRANDA et al., 2011; MIRANDA et al., 2013; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2018) e leveduras de outras espécies (*Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans*), artefatos (precipitado de coloração) restos celulares e microrganismos colonizadores podem confundir facilmente o observador ocasionando um resultado falso-positivo (SILVA et al. 2015). Esses fatores de confundimento acima descritos, podem ter levado a um maior número de casos falso-positivos pelo observador 2, menos experiente, levando a uma baixa concordância com relação ao observador 1 mais experiente. As frequências de positividade dos exames citopatológicos foram diferentes entre os observadores neste estudo, levando a uma baixa concordância interobservadores, talvez pelos distintos níveis de experiência entre eles, que podem ser minimizados por treinamento.

No presente estudo, tanto em gato como no cão, a sensibilidade do exame citopatológico corado pelo PAS e IPG foi superior ao panótico rápido. De acordo com os resultados do presente estudo, exames citopatológicos corados pelas técnicas PAS

e IPG (*imprint*), contribuem para um diagnóstico citopatológico, mais rápido e sensível comparado ao exame citopatológico convencional, o que permite um tratamento mais precoce de cães e gatos doentes. Esse tratamento mais precoce, aumenta as chances de cura clínica e conseqüentemente, reduz o risco de transmissão do *Sporothrix* spp. aos humanos e outros animais (GREMIÃO et al., 2020b; MIRANDA et al., 2011; SILVA et al., 2022). Considerando o elevado potencial de transmissão do *Sporothrix* spp. em gatos, o aumento crescente dos casos em cães (MIRANDA et al., 2011) e conseqüentemente todos os riscos à saúde pública visto que a esporotricose está em quase todo território nacional (RABELLO et al., 2021), destacamos a importância desse diagnóstico rápido, acurado, financeiramente viável e não complexo da esporotricose. A resposta positiva permite que o PAS e IPG possam beneficiar o diagnóstico da esporotricose animal nos casos onde haja suspeita da presença do *Sporothrix*. Uma vez que animais com alta carga fúngica são mais fáceis de diagnosticar e a maioria dos exames já estudados possuem boa sensibilidade nestes casos, foi observado a carência de estudos nos casos de baixa carga fúngica, seja pelo tratamento prévio ou não. Contudo, encorajamos fortemente o aprofundamento de novas pesquisas nesta linha.

8 CONCLUSÕES

1. O exame citopatológico corado pelas técnicas de PAS e IPG nos gatos e cães, revelou maior frequência de positividade para o diagnóstico da esporotricose em *imprints* de lesões cutâneas ulceradas quando comparada ao panótico rápido, sendo importante suas utilizações para melhoria do diagnóstico dessa micose.
2. O PAS mostrou ser a técnica de coloração mais vantajosa para o exame citopatológico de cães e gatos com esporotricose por ser a mais sensível e comparada à IPG foi mais rápida, menos laboriosa, sem necessidade de equipamentos além do microscópio óptico e de custo inferior, podendo ser utilizada em nível ambulatorial.
3. A IPG mostrou ser a segunda técnica de coloração mais sensível após o PAS para o exame citopatológico de cães e gatos com esporotricose, porém necessita de estufa e é mais laboriosa, sendo recomendada para clínicas e hospitais veterinários.
4. A cultura fúngica possui alta frequência de positividade, em cães e gatos, mesmo em animais tratados, que foi superior ao exame citopatológico utilizando diferentes colorações, confirmando ser o padrão de referência. Entretanto, não detectou alguns casos positivos no citopatológico, seu processo é demorado, necessita de equipamentos e maior infraestrutura laboratorial.
5. A combinação de técnicas sobretudo cultura + PAS ou IPG melhora consideravelmente a detecção do *Sporothrix* spp. ampliando a positividade nos casos dos gatos e cães previamente tratados, sobretudo em gatos previamente tratados.
6. Nos gatos e cães virgens de tratamento e com tratamento prévio os exames citopatológicos corados pelo PAS e IPG demonstraram frequência de positividade

superior ao panótico rápido confirmando utilidade para sua inclusão na rotina diagnóstica da esporotricose nesses animais.

7. A frequência de positividade para *Sporothrix* spp. nas técnicas citopatológicas encontradas nos gatos foi maior no PAS e IPG quando comparadas ao panótico rápido em L1 e L2, demonstrando uma maior utilidade dessas colorações em gatos com lesões cutâneas e/ou mucosas em menos de três locais não contíguos.
8. A frequência de positividade das técnicas de coloração de acordo com o estado clínico foi maior no PAS e IPG em gatos e cães com estado clínico bom, e nos gatos com o estado clínico ruim as três colorações se apresentaram de forma semelhante.
9. O tempo de leitura de lâminas para detecção de estruturas fúngicas sugestivas de *Sporothrix* spp. foi inferior no PAS e IPG em gatos e cães quando comparado ao panótico rápido, sugerindo uma maior facilidade desses métodos na detecção da levedura causadora da esporotricose e possibilitando uma maior produtividade e resposta mais rápida no diagnóstico.
10. A concordância interobservador dos exames citopatológicos de coloração pelo panótico rápido, PAS e IPG em *imprints* de lesões cutâneas ulceradas de gatos e cães com esporotricose foi razoável, sobretudo no PAS e a IPG, demonstrando a necessidade de treinamento do leitor.
11. O exame citopatológico corado pelos métodos PAS e IPG em *imprints* de lesões cutâneas ulceradas, por terem melhorado a sensibilidade do exame panótico rápido, que é comumente utilizado, pode ser implementado na rotina do Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz como mais uma ferramenta no diagnóstico da esporotricose felina e canina.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. J.; REIS, N. F.; LOURENÇO, C. S. et al. Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos dos Goytacazes, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 38, n. 7, p.1438-1443, 2018.
- ALMEIDA, F.; SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S. et al. Statistical data on sporotrichosis; analysis of 344 cases. **Anais Brasileiros de Dermatologia e Sifilografia**, v. 30, p. 9–12, 1955.
- BARROS, M. B. D. L.; PAES, R. A.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633–654, 2011. <http://cmr.asm.org/cgi/doi/10.1128/CMR.00007-11>.
- BENTO, A. O.; COSTA, A. S. S.; LIMA, S. L. et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009693>
- BISON, I.; PARENTONI, R. N.; BRASIL, A. W. L. Metanálise de esporotricose felina: um destaque para sua ocorrência no Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 4, p. 301, 2020. <http://www.arsveterinaria.org.br/ars/article/view/1303>.
- BOECHAT, J. S.; OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R. et al. A. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170407>.
- CARSON, F.L.; HLADICK, C. Histotechnology: a self-instructional text, 3rd edn. **ASCP Press**, Chicago, 2009.
- FERNANDES, C.G.; MOURA, S.T.; DANTAS, A.F.M. et al. Feline sporotrichosis: clinical and epidemiological aspects: case reports (Cuiabá, Mato Grosso, Brazil) **MedVep Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais**.; v. 2, p. 39–43, 2004.
- DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, n. 1, p. 165–191, 2016. <https://www.ingentaconnect.com/content/10.1016/j.simyco.2016.07.001>.
- DELLA TERRA, P. P.; GONSALES, F. F.; CARVALHO, J. A. et al. Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. **Wiley - Transboundary and Emerging Diseases**, 2021. <https://wileyonlinelibrary.com/journal/tbed>

- DUANGKAEW, L.; YURAYART, C.; LIMSIVILAI, O.; CHEN, C.; et al. Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, v. 23, p. 46–49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.12.003>.
- FILGUEIRA, K. D. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 5, 2009.
- FILHO, J. E.; SANTOS, I. B. dos; REIS, C. M. S.; et al. A novel *Sporothrix brasiliensis* genomic variant in Midwestern Brazil: evidence for an older and wider sporotrichosis epidemic. **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 2515–2525, 2020. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/22221751.2020.1847001>.
- FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; SILVA, M. B. T.; et al. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003110>.
- GONSALES, F. F.; FERNANDES, N. C. C. A.; MANSO, W.; et al. Direct PCR of lesions suggestive of sporotrichosis in felines. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 5, p. 2002–2006, 2020. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000502002&tlng=en.
- GONSALES, F. F.; FERNANDES, N. C. C. A.; MANSO, W. Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. **Veterinary Clinical Pathology**, 48, p. 143–147, 2018.
- GREENE, C.E. Antifungal chemotherapy In: Infectious diseases of the dog and cat 4rd edn. Saunders Elsevier, Philadelphia, p. 579–588, 2012.
- GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M. P.; et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2015. <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myu061>.
- GREMIÃO, I.D.; MIRANDA, L.H.; REIS, E.G. et al. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathogens**, p. 13, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077>
- GREMIÃO, I. D. F.; OLIVEIRA, M. M. E.; MIRANDA, L. H.; et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020a. http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/3/19-0803_article.htm.
- GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M. et al. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221, 2006. <https://seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/15281>.
- GREMIAO, I. D. F.; ROCHA, E. M. S.; MONTENEGRO, H. et al. A Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2020b. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00365-3>.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977.

LOPES-BEZERRA, L.M.; MORA-MONTES, H.M.; ZHANG, Y., et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, p. 126–43, 2018. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx103>

LÓPEZ-ROMERO, E.; REYES-MONTES, M. del R.; PÉREZ-TORRES, A. et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 85–102, 2011. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.157>.

LUIZ, R. L. F.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A. et al. Nested PCR for the diagnosis of feline sporotrichosis from formalin-fixed and paraffin-embedded samples using different dna extraction protocols. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 755897, 2022. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2021.755897/full>

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos. **Revista de Medicina**, v. 21, p. 433–450, São Paulo, 1907.

MACÊDO-SALES, P. A.; SOUTO, S. R. L. da S.; DESTEFANI, C. A.; et al. Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por *imprint*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, 2018. http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232018000200013.

MACÊDO-SALES, P. A.; SOUTO, S. R. L. S.; DESTEFANI, C. A.; et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC Veterinary Research**, v. 14, n. 1, p. 19, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1340-4>.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007. <https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07>.

MASCARENHAS, M. B.; BOTELHO, C. B.; MANIER, B. S. M. L. et al. An unusual case of feline otitis externa due to sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 5, n. 1, 2019. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/2055116919840810>.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ALIMENTAÇÃO, Brasil. Viajando com animais de estimação, 2019. <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/animais-estimacao>

MIRANDA, L.; CONCEIÇÃO, S. F.; QUINTELLA, L. P. et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 4, p. 425–432, 2013. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147957113000210>. Acesso em: 15 abr. 2020.

- MIRANDA, L. H. M.; MELI, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. et al. Co-infection with feline retrovirus is related to changes in immunological parameters of cats with sporotrichosis. **PLoS One**, v. 13, n. 11, 2018. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0207644>.
- MIRANDA, L. H. M.; QUINTELLA, L. P.; MENEZES, R. C. et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 190, n. 3, p. 408–411, 2011. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023310004193>.
- MIRANDA, L. H. M.; QUINTELLA, L. P.; SANTOS, I. B. et al. Comparative histopathological study of sporotrichosis and american tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro. **Journal of Comparative Pathology**, v. 143, n. 1, p. 1–7, 2010. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021997509004058>.
- MIRANDA, L. H. M.; SILVA, J.; GREMIÃO, I. et al. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 92, 2018. <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/3/92>.
- MONTI, F. Diagnostic and therapeutic approach to sporotrichosis in domestic cats (*Felis catus domesticus*) **Thesis Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR)**, 2019.
- OLIVEIRA, M. M. E. Identificação e análise filogenética de espécies do gênero *sporothrix* isoladas em área endêmica de esporotricose no estado do Rio de Janeiro. 2009. 67 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas), **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2009.
- PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000300392&lng=en&tlng=en.
- PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C. Sporotrichosis in animals: zoonotic transmission. **Springer**, Rio de Janeiro, p. 83–102, 2015.
- PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F. et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220–223, 2011. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1016/j.jfms.2010.10.007>.
- PEREIRA, S. A.; PASSOS, S. R. L.; SILVA, J. N. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290–294, 2010. <http://veterinaryrecord.bmj.com/cgi/doi/10.1136/vr.166.10.290>.
- QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis In Immunocompromised Hosts. **Journal of Fungi** (Basel, Switzerland), v. 5, n. 1, 2019. <https://doi.org/10.3390/jof5010008>.

- RAMOS, A. C. M. O.; OLIVEIRA, I. V. P. M.; REIS-LIMA, R. K. et al. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 11, p. 79–84, 2017.
- RABELLO, V. B. S.; ALMEIDA, M. A.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. The Historical burden of sporotrichosis in Brazil: a systematic review of cases reported from 1907 to 2020. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2021. <https://link.springer.com/10.1007/s42770-021-00658-1>
- RACHMAN, R.; LIGA, J. M.; CHINTHAPALLI, S. et al., Zoonotic acquisition of cutaneous *Sporothrix brasiliensis* infection in the UK. **BMJ Case Reports**, 5^a ed., v. 15, p. 24, 2022.
- REDIGUIERI, B. C.; BAHIENSE, I. C.; Carvalho, J. A. et al. Clinical, Epidemiological, and Epizootic Features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **EcoHealth**, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10393-022-01578-8>
- RIO DE JANEIRO (RJ). Secretaria de Estado de Saúde. **Boletim Epidemiológico Esporotricose 2019 a 2020**. Rio de Janeiro, 2021.
- RIPPON, J. W. Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actionmycetes. **WB Saunders**, 3^a ed. Filadélfia, p. 325-352, 1988.
- RODRIGUES, A.M.; CRUZ, C. R.; FERNANDES, G.F.; et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**. 120, v. 2, p. 246–64, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.006>
- RODRIGUES, A. M.; DELLA TERRA, P. P.; GREMIÃO, I. D. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**. 185, p. 813–842. 2020. <https://doi.org/10.1007/s11046-020-00425-0>
- RODRIGUES, A. M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G. S. et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002281>
- ROSSOW, J. A.; QUEIROZ-TELLES, F.; CACERES, D. H. et al. A one health approach to combatting *sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020. <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/4/247>.
- SANTOS, A. F.; ROCHA, B. D. Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. p. 12, 2018. .
- SANTOS, I. B. dos; SCHUBACH, T. M. P.; LEME, L. R. P. et al. Sporotrichosis - the main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 1, p. 1–6, 2007. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401706004493>.

SCHENCK, B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **John Hopkins Hospital**, v. 9, p. 286–290, 1898.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, p. 1623–1629, 2004.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T. 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.; MENEZES, R.C.; WANKE, B. Sporotrichosis. in: greene ce (ed) infectious diseases of the dog and cat, 4th edn. **Saunders Elsevier**, Philadelphia, p. 645–650, 2012.

SILVA, B. W. L.; MAUÉS, M. A. C.; BARROZO, P. H. M. et al. First report of fungal *Sporothrix schenckii* complex isolation from feline with possible zoonotic transmission in the city of Belém, Pará, Brazil: Case report. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, 2022. <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/25551>.

SILVA, F. S.; CUNHA, S. C. S.; MORAES, V. A. et al. Refractory feline sporotrichosis: a comparative analysis on the clinical, histopathological, and cytopathological aspects. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 42, p. e06923, 2022. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2022000100401&tlng=en.

SILVA, J. N.; MIRANDA, L. H. M.; MENEZES, R. C. et al. Comparison of the sensitivity of three methods for the early diagnosis of sporotrichosis in cats. **Journal of Comparative Pathology**, v. 160, p. 72–78, 2018.

SILVA, G.M.; HOWES, J.C.F.; LEAL, C.A.S. et al. Feline sporotrichosis outbreak in the metropolitan region of Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1767–71, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5027>

SILVA, J.; PASSOS, S. R. L.; MENEZES, R. C. et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 8, p. 880–884, 2015. <https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myv038>.

SILVA, M. B. T.; COSTA, M. M. M.; TORRES, C. C. S. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, 2012. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-311X2012001000006&lng=en&nrm=iso&tlng=pt.

SINGER, J.I.; MUNCIE, J.E. Sporotrichosis: etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State Journal of Medicine**, v. 52, p. 2147–2153, 1952.

SOUZA, E. W. Esporotricose felina: resposta ao tratamento, alterações histológicas cutâneas e identificação de *sporothrix* spp. no estado do Rio de Janeiro - Brasil. 2015.

128 f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas), **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 2015.

SOUZA, E. W.; BORBA, C. M.; PEREIRA, S. A. et al. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9074–9074, 2018. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-27447-5>.

SOUZA, N. T.; NASCIMENTO, A. C. B. M.; SOUZA, J. O. T. et al. Esporotricose canina: relato de caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 572–576, 2009. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352009000300008&lng=pt&tlng=pt.

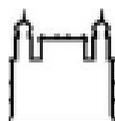
VALERIANO, C. A. T.; LIMA-NETO, R. G. de; INÁCIO, C. P. et al. Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, p. e0008151, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008151>.

VIANA, P. G. Esporotricose canina: estudo epidemiológico, clínico e terapêutico na região metropolitana do rio de janeiro (2004 – 2014). 2016. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas), **Fundação Oswaldo Cruz**, 2016.

VIANA, P. G.; FIGUEIREDO, A. B. F.; GREMIÃO, I. D. F. et al. Successful treatment of canine sporotrichosis with terbinafine: case reports and literature review. **Mycopathologia**, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018. <http://link.springer.com/10.1007/s11046-017-0225-6>.

WALLER, S. B.; DALLA LANA, D. F.; QUATRIN, P. M. et al. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 73–80, 2020. <https://link.springer.com/10.1007/s42770-020-00307-z>.

10 ANEXOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo CruzVice-Presidência de Pesquisa e Coleções
Biológicas - VPPCBComissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-1/21

Certificamos que o protocolo (P-24/20.2), intitulado "Comparação da sensibilidade do exame citopatológico de lesão cutânea ulcerada corado por três métodos no diagnóstico da esporotricose canina e felina", sob a responsabilidade de RODRIGO CALDAS MENEZES, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 09/11/2023 e inclui o uso total de:

Felis sylvestris catus

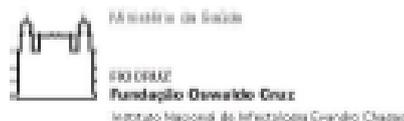
- 70 machos, idade: adultos.
- 30 fêmeas, idade: adultos.

Canis familiaris

- 20 machos, idade: adultos.
- 10 fêmeas, idade: adultos.

Rio de Janeiro, 09 de novembro de 2020.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/Fiocruz



TERMO DE CONSENTIMENTO

**INSTITUIÇÃO: INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA EVANDRO CHAGAS (INI)/
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (Fiocruz)**

Coordenador da Pesquisa: Fernanda Prado Roque Ferreira

CRMV-RJ 6355

Endereço: Avenida Brasil, 4365 – Mangueiras – Rio de Janeiro / RJ – CEP 21045-900
Telefones (0XX21) 3865-9536 e 3865-9553

Nome do Projeto: Comparação da sensibilidade do exame citopatológico de lesão cutânea ulcerada corado por três métodos no diagnóstico da esporotricose canina e felina.

Nome do animal: _____ Prontuário: _____

Nome do responsável: _____

Por que este estudo está sendo realizado?

A esporotricose é uma doença causada por fungos, com elevado número de casos no Brasil. É a micose subcutânea com maior distribuição pelo mundo, com casos relatados em praticamente todos os continentes, que acomete humanos e animais, principalmente cães e gatos.

Na maioria dos casos felinos, a infecção é adquirida após brigas e contato com outros gatos infectados e ambiente contaminado. Já em cães, a infecção ocorre quando esses animais entram em contato com lascas de madeira ou espinhos contaminados. Entretanto, no Brasil, a maioria dos casos, ocorre após contato prévio com gatos com esporotricose.

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

Você está sendo convidado(a) a participar de uma investigação clínica que será realizada no INI/Fiocruz, com o seguinte objetivo: Comparar a sensibilidade de três técnicas de diagnóstico citopatológico da esporotricose em cães e gatos.

A participação de seu animal neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a permitir a participação dele no estudo ou retirá-lo a qualquer instante. O médico veterinário também poderá interromper a participação do seu animal a qualquer momento, se julgar necessário.

Para que seu animal participe desse projeto, você deverá autorizar a realização do exame clínico e dos exames laboratoriais. Serão realizadas fotografias de seus animais na primeira consulta para a identificação. Os exames serão oferecidos de forma gratuita pela Instituição.

Os resultados dessa pesquisa serão publicados, preservando o anonimato e em caso de necessidade, as informações médicas dos animais estarão disponíveis para toda a equipe médica veterinária envolvida, para a Comissão de Ética no Uso de Animais da Flocruz, 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 animal participe dos estudos, assim como durante o tratamento.

Procedimentos, exames e testes que poderão ser utilizados:

O animal deverá ser trazido ao Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) para a realização de exame clínico geral e coleta de amostras biológicas (na primeira consulta) para exames laboratoriais (exame citopatológico e cultura micológica). Será selecionada uma lesão de pele para a coleta de secreção utilizando um swab (cotonete) e três lâminas de vidro, a qual serão pressionadas sobre a lesão (Imprint).

Os animais receberão acompanhamento clínico e terapêutico mensalmente no ambulatório do Lapclin-Dermzoo de forma gratuita.

Inconvenientes e riscos principais conhecidos atualmente:

A coleta de amostras das lesões de pele podem causar um leve desconforto passageiro nesses locais.

Caso o animal apresente algum problema após a realização dos procedimentos, você deve entrar em contato com a equipe de médicos veterinários do Lapclin-Dermzoo, Fernanda Prado R. Ferreira, Rodrigo Caldas Menezes, Isabella Gremião, Sandro Antônio Pereira, Isabella Maria Antônio ou Maria Comêa Lopes, nos telefones (0XX21) 3865-9536, 3865-9553, 974626155.

Benefícios esperados:

Além de ser diagnosticado, acompanhado e tratado para a esporotricose Lapclin-Dermzoo/Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/Flocruz, a participação de seu(s) animal(is) de estimação (cães e gatos) no projeto, permitirá a obtenção de novas informações sobre o diagnóstico do fungo, que no futuro poderão beneficiar outros animais com a mesma doença.

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

Divulgação dos resultados do estudo:

Os resultados deste estudo serão compartilhados com a comunidade científica em forma de publicação, bem como a divulgação das fotografias de seus animais. As informações que coletarmos terão o seu nome, nome do seu animal e endereço removidos para que você não possa ser reconhecido(a) em nenhuma publicação do estudo. Essa publicação é muito importante para fornecer informações mais precisas sobre um precoce diagnóstico da esporotricose canina e felina em amostras cutâneas.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será o(a) Dr(a) _____, inscrito(a) no CRMV-RJ sob o nº _____. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Fernanda Prado R. Ferreira também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal(is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos descritos acima.

Declaração de consentimento:

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Rio de Janeiro, ___/___/___

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Responsável:

Nome:

Documento de Identidade:

Identificação do(s) animal(is):

Nome:

Número de Identificação:

Espécie:

Raça:



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ficha do projeto nº _____

_____/_____/_____

**COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO EXAME CITOPATOLÓGICO
CORADO PELOS MÉTODOS PANÓTICO RÁPIDO, ÁCIDO PERIÓDICO
DE SCHIFF E IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DE GROCOTT EM
IMPRINTS DE LESÕES CUTÂNEAS NO DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE EM CÃES E GATOS**

Dra. Fernanda Prado Roque Ferreira
CRMV-RJ 6355

**Ficha de Atendimento
GATO**

Nome do Animal: _____ Kg: _____
Espécie: felino Raça: _____ Pelagem: _____ Sexo: _____ Idade: _____
Proprietário: _____
Bairro/cidade: _____
Veterinário: _____ Prontoúário (secundário): _____
Número do Prontoúário (LAPCLIN-DERMZOO): _____

→ 1ª CONSULTA: ____/____/____

TCLE

HISTÓRIA DA DOENÇA: 1º Atendimento: SIM NÃO

Castrado: SIM NÃO Vacinado: SIM NÃO Vai na rua: SIM NÃO

Contactantes (outros animais contaminados na casa): Gatos nº: _____ Cães nº: _____

RECIDIVA DA PATOLOGIA: NÃO
 SIM, data da última lesão? _____

MEDICAMENTOS ATUAIS: Tratamento prévio c/ antifúngico: SIM NÃO LAPCLIN
Qual? Dose: _____

RECEITA PÓS CONSULTA:

ANAMNESE DIRIGIDA

ESTADO GERAL:

- Boa Agitado
 Regular Prostrado
 Ruim
 Péssimo

LESÃO:

- Úlcera Sem casca
 Goma ulcerada Com casca
 Seca
 Exsudato

ANIMAL:

- Calmo
 Agitado
 Agressivo
 Sedado: Obs: _____

CARACTERÍSTICAS DA(S) LESÃO(ÕES):

Nº de lesões cutâneas: _____

Classificação: L0 L1 L2 L3

LEGENDA:

L0: ausência de lesões cutâneas e/ou nódulos

L2: lesões cutâneas e/ou mucosas em 2 locais ã contínuos

L1: lesões cutâneas e/ou mucosas em 1 local

L3: lesões cutâneas e/ou mucosas em 3 locais ã contínuos

Descrição das lesões:

Descrição da lesão cutânea ulcerada **escolhida** (critério em caso de múltiplas lesões ulceradas: lesão c/ expectativa de maior carga fúngica):

Local da lesão escolhida: _____

Medida da lesão escolhida (paquímetro: larg. e alt.): _____

Área da lesão escolhida (área elipse): _____

CÁLCULO DA ÁREA ELIPSE:

eixo maior/2 X eixo menor/2 X π (=3,14), unidade mm²



FOTO: SIM
 NÃO

DESENHO DA LESÃO:

COLETA DO MATERIAL

PANÓTICO RÁPIDO:

1 Lâminas

GROCOTT:

2 Lâminas

PAS:

2 Lâminas

CULTURA:

1 Swab

OBSERVAÇÕES:

REVISÃO EM ____/____/____ HORA: _____

→ 2ª CONSULTA: ____ / ____ / ____ QUANTO TEMPO APÓS 1ª CONSULTA: _____

HISTÓRIA DA DOENÇA: 2º Atendimento: SIM NÃO

Castrado: SIM NÃO Vacinado: SIM NÃO Vai na rua: SIM NÃO

RECIDIVA DA PATOLOGIA: NÃO SIM, data da última lesão? _____

MEDICAMENTOS ATUAIS: Tratamento prévio c/ antifúngico: SIM NÃO LAPCLIN
Qual? Dose: _____

RECEITA PÓS CONSULTA:

ANAMNESE DIRIGIDA

ESTADO GERAL:

- Boa Agitado
 Regular Prostrado
 Ruim
 Péssimo

LESÃO:

- Úlcera Sem casca
 Goma ulcerada Com casca
 Seca
 Exsudato

ANIMAL:

- Calmo
 Agitado
 Agressivo
 Sedado: Obs: _____

CARACTERÍSTICAS DA(S) LESÃO(ÕES):

Nº de lesões cutâneas: _____

Classificação: L0 L1 L2 L3

Descrição das lesões: _____

Descrição da lesão cutânea ulcerada **escolhida** (critério em caso de múltiplas lesões ulceradas:
lesão c/ expectativa de maior carga fúngica): _____

Local da lesão escolhida: _____ Mesma lesão 1ª cons.: SIM NÃO

Medida da lesão escolhida (paquímetro: larg. e alt.): _____

Área da lesão escolhida (área elipse): _____

FOTO: SIM
 NÃO

DESENHO DA LESÃO:



COLETA DO MATERIAL

PANÓTICO RÁPIDO:

1 Lâminas

GROCOTT:

2 Lâminas

PAS:

2 Lâminas

CULTURA:

1 Swab

OBSERVAÇÕES: REVISÃO EM ____ / ____ / ____ HORA: _____

➔ 3ª CONSULTA: ____ / ____ / ____ QUANTO TEMPO APÓS 2ª CONSULTA: _____

HISTÓRIA DA DOENÇA: 3º Atendimento: SIM NÃO

Castrado: SIM NÃO Vacinado: SIM NÃO Vai na rua: SIM NÃO

RECIDIVA DA PATOLOGIA: NÃO SIM, data da última lesão? _____

MEDICAMENTOS ATUAIS: Tratamento prévio c/ antifúngico: SIM NÃO LAPCLIN
Qual? Dose: _____

RECEITA PÓS CONSULTA:

ANAMNESE DIRIGIDA

ESTADO GERAL:

- Boa Agitado
 Regular Prostrado
 Ruim
 Péssimo

LESÃO:

- Úlcera Sem casca
 Goma ulcerada Com casca
 Seca
 Exsudato

ANIMAL:

- Calmo
 Agitado
 Agressivo
 Sedado: Obs: _____

CARACTERÍSTICAS DA(S) LESÃO(ÕES):

Nº de lesões cutâneas: _____

Classificação: L0 L1 L2 L3

Descrição das lesões: _____

Descrição da lesão cutânea ulcerada **escolhida** (critério em caso de múltiplas lesões ulceradas:
lesão c/ expectativa de maior carga fúngica): _____

Local da lesão escolhida: _____ Mesma lesão 1ª e 2ª cons.: SIM NÃO

Medida da lesão escolhida (paquímetro: larg. e alt.): _____

Área da lesão escolhida (área elipse): _____

FOTO: SIM
 NÃO

DESENHO DA LESÃO:



COLETA DO MATERIAL

PANÓTICO RÁPIDO:

1 Lâminas

GROCOTT:

2 Lâminas

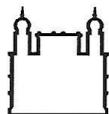
PAS:

2 Lâminas

CULTURA:

1 Swab

OBSERVAÇÕES: REVISÃO EM ____ / ____ / ____ HORA: _____



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

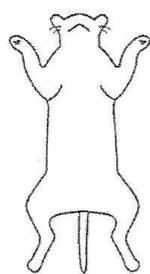


SILHUETAS PARA EXAME DERMATOLÓGICO FELINO

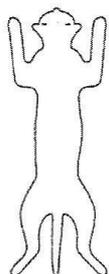
Registro Zoo: _____

Data: ____/____/____

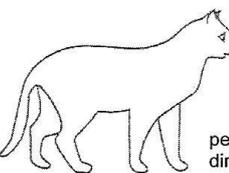
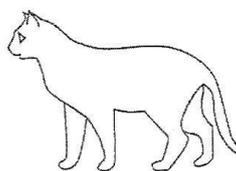
Nome: _____



ventre



dorso



perfil direito

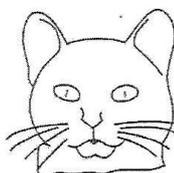
perfil esquerdo



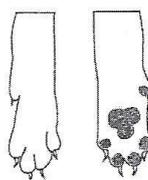
perfil direito



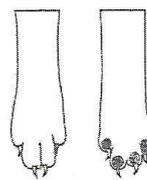
perfil esquerdo



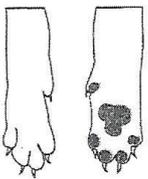
cara



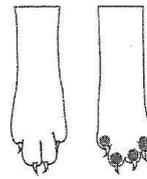
pata anterior direita



pata posterior direita



pata anterior esquerda



pata posterior esquerda



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ficha do projeto n° _____

_____/_____/_____

**COMPARAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO EXAME CITOPATOLÓGICO
CORADO PELOS MÉTODOS PANÓTICO RÁPIDO, ÁCIDO PERIÓDICO
DE SCHIFF E IMPREGNAÇÃO PELA PRATA DE GROCOTT EM
IMPRINTS DE LESÕES CUTÂNEAS NO DIAGNÓSTICO DA
ESPOROTRICOSE EM CÃES E GATOS**

Dra. Fernanda Prado Roque Ferreira
CRMV-RJ 6355

**Ficha de Atendimento
CÃO**

Nome do Animal: _____ Kg: _____
Espécie: canino Raça: _____ Pelagem: _____ Sexo: _____ Idade: _____
Proprietário: _____
Bairro/cidade: _____
Veterinário: _____ Prontuário (secundário): _____
Número do Prontuário (LAPCLIN-DERMZOO): _____

→ 1ª CONSULTA: ____/____/____

TCLE

HISTÓRIA DA DOENÇA: 1º Atendimento: SIM NÃO

Castrado: SIM NÃO Vacinado: SIM NÃO Vai na rua: SIM NÃO

Contactantes (outros animais contaminados na casa): Gatos n°: _____ Cães n°: _____

RECIDIVA DA PATOLOGIA: NÃO
 SIM, data da última lesão? _____

MEDICAMENTOS ATUAIS: Tratamento prévio c/ antifúngico: SIM NÃO LAPCLIN
Qual? Dose: _____

RECEITA PÓS CONSULTA:

ANAMNESE DIRIGIDA

ESTADO GERAL:

- Boa Agitado
 Regular Prostrado
 Ruim
 Péssimo

LESÃO:

- Úlcera Sem casca
 Goma ulcerada Com casca
 Seca
 Exsudato

ANIMAL:

- Calmo
 Agitado
 Agressivo
 Sedado: Obs: _____

CARACTERÍSTICAS DA(S) LESÃO(ÕES):

Nº de lesões cutâneas: _____

Classificação: L0 L1 L2 L3

LEGENDA:

L0: ausência de lesões cutâneas e/ou nódulos

L2: lesões cutâneas e/ou mucosas em 2 locais ã contínuos

L1: lesões cutâneas e/ou mucosas em 1 local

L3: lesões cutâneas e/ou mucosas em 3 locais ã contínuos

Descrição das lesões:

Descrição da lesão cutânea ulcerada **escolhida** (critério em caso de múltiplas lesões ulceradas: lesão c/ expectativa de maior carga fúngica):

Local da lesão escolhida: _____

Medida da lesão escolhida (paquímetro: larg. e alt.): _____

Área da lesão escolhida (área elipse): _____

CÁLCULO DA ÁREA ELIPSE:

eixo maior/2 X eixo menor/2 X π (=3,14), unidade mm²



FOTO: SIM
 NÃO

DESENHO DA LESÃO:

COLETA DO MATERIAL

PANÓTICO RÁPIDO:

1 Lâminas

GROCOTT:

2 Lâminas

PAS:

2 Lâminas

CULTURA:

1 Swab

OBSERVAÇÕES:

REVISÃO EM ____/____/____ HORA: _____



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas



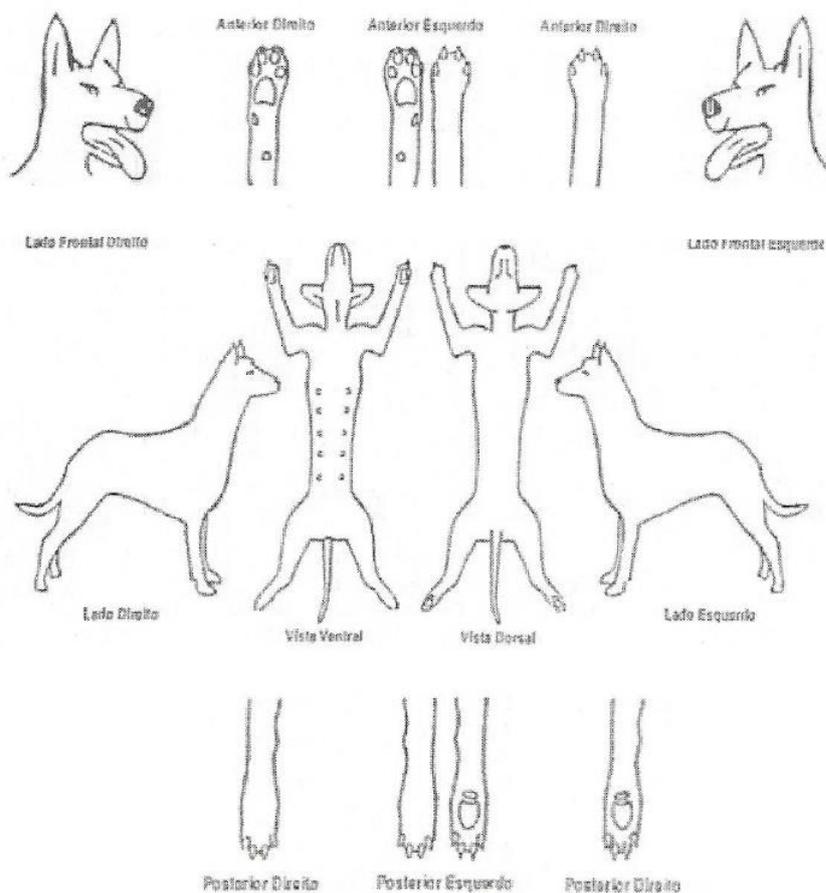
IPEC

SILHUETAS PARA EXAME DERMATOLÓGICO CANINO

Registro Zoo: _____

Data: ____/____/____

Nome: _____



 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz</p>	<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p>	 <p>INI Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas</p>
<p>POP 001 - PAS</p>		<p>CÓDIGO: LAPCLIN-DERMZOO-POP.001</p>
<p>EMIÇÃO: 01/02/2022</p>	<p>REVISÃO Nº ___ de ___/___/2022</p>	

01. OBJETIVO

Assegurar que o método de diagnóstico da esporotricose em cães e gatos por exame citopatológico corado pelo método Ácido Periódico de Schiff (PAS) em *imprints* de lesões cutâneas siga procedimentos controlados e normalizados.

02. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se no laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz.

03. SIGLAS

PAS - Ácido Periódico de Schiff
EPI – Equipamento de Proteção Individual
F DERMZOO – Formulário do laboratório LAPCLIN-DERMZOO
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

04. RESPONSABILIDADES

Profissionais do setor:

- Realizar a técnica de acordo com o descrito neste POP.
- Guardar e modificar os POPs do setor.

Chefe do setor:

- Aprovar os POPs.

05. FLUXOGRAMA

N.A.

06. PROCEDIMENTOS/ DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

- Limpar a lesão escolhida antes da coleta do material com gases e Clorexidina 2% degermante, afim de retirar possíveis resíduos e crostas hemáticas da ferida;
- Coletar o material de uma lesão cutânea ulcerada, preferencialmente a mais característica e com menor secreção purulenta, por contato em lâmina de vidro limpa e seca;
- Fixar a lâmina em metanol durante cinco minutos;
- Lavar em água corrente;
- Cobrir o *imprint* com o reagente A (Ácido Periódico) por 10 minutos;
- Lavar em água corrente por 3 minutos;
- Lavar em água destilada e secar;
- Cobrir o *imprint* com o reagente B (Reativo de Schiff) por 15 minutos (ou até aparecer a pigmentação);
- Lavar em água corrente por 3 minutos, depois secar;
- Cobrir o *imprint* com o reagente C (Hematoxilina de Harris para coloração de fundo) por 3 minutos;
- Lavar em água corrente por 3 minutos, depois secar;
- Desidratar em 4 trocas em álcool absoluto (10 imersões por cuba);
- Clarear em 4 trocas de xilol (10 imersões por cuba);
- Montar com entellan utilizando lamínula;
- Fazer a microscopia usando o microscópio de luz.

07. ANEXOS

Anexo A – Manual de instrução do kit HISTOKIT, PAS – RUO de Ácido Periódico Schiff P.A.S. (Periodic Acid Schiff P.A.S), da marca EasyPath.

08. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Planilha de resultados de leitura de citopatologia (F DERMZOO)

09. REFERÊNCIAS

Estatuto da FIOCRUZ;
Regimento Interno da FIOCRUZ;
Regimento Interno do LAPCLIN-DERMZOO;
Regulamentos do LAPCLIN-DERMZOO.

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	Nº DE CÓPIAS
Laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

Nº DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

12. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

ELABORAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	REVISÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	APROVAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO
RESPONSÁVEL PELA ELABORAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA REVISÃO	RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz</p>	<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p>	 <p>INI Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas</p>
<p>POP 002 - IPG</p>		<p>CÓDIGO: LAPCLIN-DERMZOO-POP.002</p>
<p>EMIÇÃO: 01/02/2022</p>	<p>REVISÃO Nº ___ de ___/___/2022</p>	

01. OBJETIVO

Assegurar que o método de diagnóstico da esporotricose em cães e gatos por exame citopatológico corado pelo método Impregnação pela Prata de Grocott (IPG) em *imprints* de lesões cutâneas siga procedimentos controlados e normalizados.

02. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se no laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz.

03. SIGLAS

IPG - Impregnação pela Prata de Grocott
EPI – Equipamento de Proteção Individual
F DERMZOO – Formulário do laboratório LAPCLIN-DERMZOO
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

04. RESPONSABILIDADES

Profissionais do setor:

- Realizar a técnica de acordo com o descrito neste POP.
- Guardar e modificar os POPs do setor.

Chefe do setor:

- Aprovar os POPs.

05. FLUXOGRAMA

N.A.

06. PROCEDIMENTOS/ DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

- Limpar a lesão escolhida antes da coleta do material com gases e Clorexidina 2% degermante, afim de retirar possíveis resíduos e crostas hemáticas da ferida;
- Coletar o material de uma lesão cutânea ulcerada, preferencialmente a mais característica e com menor secreção purulenta, por contato em lâmina de vidro limpa e seca;
- Fixar a lâmina em metanol durante cinco minutos;
- Lavar em água destilada por alguns segundos, depois secar;
- Cobrir o *imprint* com o reagente A (Ácido Crômico a 4%) por 10 minutos;
- Lavar em água corrente por 3 minutos, depois secar;
- Colocar a lâmina em solução obtida com a junção de 40ml água destilada + 40 gotas reagente B (Prata Amoniacal) + 20 gotas reagente C (Bórax), levar a estufa a 60°C por 40 à 60 minutos (ou até aparecer a pigmentação);
- Lavar em água destilada por alguns segundos, depois secar;
- Cobrir o *imprint* com o reagente D (Cloreto de Ouro) por 1 minuto;
- Lavar em água corrente por alguns segundos, depois secar;
- Cobrir o *imprint* com o reagente E (Verde Luz) por 2 minutos;
- Passar rapidamente na água;
- Desidratar em 4 trocas em álcool absoluto (10 imersões por cuba);
- Clarear em 4 trocas de xilol (10 imersões por cuba);
- Montar com entellan utilizando lamínula;
- Fazer a microscopia usando o microscópio de luz.

07. ANEXOS

Anexo A – Manual de instrução do kit HISTOKIT, GROCOTT - RUO de Grocott, da marca EasyPath.

08. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Planilha de resultados de leitura de citopatologia (F DERMZOO)

09. REFERÊNCIAS

Estatuto da FIOCRUZ;
Regimento Interno da FIOCRUZ;
Regimento Interno do LAPCLIN-DERMZOO;
Regulamentos do LAPCLIN-DERMZOO.

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	Nº DE CÓPIAS
Laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

Nº DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

12. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

ELABORAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	REVISÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	APROVAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO
RESPONSÁVEL PELA ELABORAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA REVISÃO	RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO

 <p>Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz</p>	<p>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRONIZADO</p>	 <p>INI Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas</p>
<p>POP 003 – Panótico Rápido</p>		<p>CÓDIGO: LAPCLIN-DERMZOO-POP.003</p>
<p>EMISSÃO: 01/02/2022</p>	<p>REVISÃO Nº ___ de ___/___/2022</p>	

01. OBJETIVO

Assegurar que o método de diagnóstico da esporotricose em cães e gatos por exame citopatológico corado pelo método Panótico Rápido em *imprints* de lesões cutâneas siga procedimentos controlados e normalizados.

02. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se no laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz.

03. SIGLAS

EPI – Equipamento de Proteção Individual
F DERMZOO – Formulário do laboratório LAPCLIN-DERMZOO
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

04. RESPONSABILIDADES

Profissionais do setor:

- Realizar a técnica de acordo com o descrito neste POP.
- Guardar e modificar os POPs do setor.

Chefe do setor:

- Aprovar os POPs.

05. FLUXOGRAMA

N.A.

06. PROCEDIMENTOS/ DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES

- Limpar a lesão escolhida antes da coleta do material com gases e Clorexidina 2% degermante, afim de retirar possíveis resíduos e crostas hemáticas da ferida;
- Coletar o material de uma lesão cutânea ulcerada, preferencialmente a mais característica e com menor secreção purulenta, por contato em lâmina de vidro limpa e seca;
- Submergir a lâmina na solução nº 1, para fixação, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 10 imersões de 1 segundo cada e deixar escorrer bem;
- Submergir a lâmina na solução nº 2, para pigmentação de estruturas citoplasmáticas e eritrócitos, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo durante 5 imersões de 1 segundo cada e deixar escorrer bem;
- Submergir a lâmina na solução nº 3, para pigmentação de estruturas nucleares das células, mantendo um movimento contínuo de cima para baixo ou para os lados durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e deixar escorrer bem;
- Lavar com água corrente, secar ao ar na posição vertical e com o final da extensão voltada para cima.
- Fazer a microscopia usando o microscópio de luz.

07. ANEXOS

Anexo A – Manual de instrução do kit corante hematológico panótico rápido, líquido, da marca LB Laborclin.

08. FORMULÁRIOS UTILIZADOS

Planilha de resultados de leitura de citopatologia (F DERMZOO)

09. REFERÊNCIAS

Estatuto da FIOCRUZ;
Regimento Interno da FIOCRUZ;
Regimento Interno do LAPCLIN-DERMZOO;
Regulamentos do LAPCLIN-DERMZOO.

10. DISTRIBUIÇÃO

ÁREA	Nº DE CÓPIAS
Laboratório de pesquisa LAPCLIN-DERMZOO do INI Fiocruz	01

11. HISTÓRICO DE REVISÕES

Nº DA REVISÃO	DATA	ITEM ALTERADO	DESCRIÇÃO DA ALTERAÇÃO	RESP. PELA ALTERAÇÃO	JUSTIFICATIVA

12. DESATIVAÇÃO

DATA	RESPONSÁVEL	MOTIVO DA DESATIVAÇÃO

ELABORAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	REVISÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO	APROVAÇÃO laboratório LAPCLIN-DERMZOO
RESPONSÁVEL PELA ELABORAÇÃO	RESPONSÁVEL PELA REVISÃO	RESPONSÁVEL PELA APROVAÇÃO