

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA**

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DE MICOSES E OOMICOSSES EM
ANIMAIS DOMÉSTICOS**

TESE DE DOUTORADO

Glauco José Nogueira de Galiza

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DE MICOSES E OOMICOSSES EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS**

Glauco José Nogueira de Galiza

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

Orientador: Prof^ª. Glaucia Denise Kommers

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Galiza, Glauco José Nogueira

Diagnóstico Histopatológico e Imuno-histoquímico de Micose e Oomicose em Animais Domésticos / Glauco José Nogueira Galiza.-2014.

71 p.; 30cm

Orientadora: Glaucia Denise Kommers

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2014

1. Ocorrência de micose e pitiose em animais domésticos: 230 casos 2. Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia 3. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais I. Kommers, Glaucia Denise II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DE MICOSES E OOMICOSSES EM ANIMAIS
DOMÉSTICOS**

elaborada por
Glauco José Nogueira de Galiza

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Glaucia Denise Kommers, PhD
(Presidente/Orientador)

Luiz Francisco Irigoyen Conrado, PhD (UFSM)

Rafael Almeida Fighera, Dr (UFSM)

Cristina Gevehr Fernandes, Dr^a (UFPeL)

Eliza Simone Viégas Sallis, Dr^a (UFPeL)

Santa Maria, 31 de março de 2014

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO E IMUNO- HISTOQUÍMICO DE MICOSES E OOMICOSSES EM ANIMAIS DOMÉSTICOS

AUTOR: GLAUCO JOSÉ NOGUEIRA DE GALIZA

ORIENTADORA: GLAUCIA DENISE KOMMERS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 31 de março de 2014.

Esta tese foi constituída de três partes que resultaram em três artigos científicos. O primeiro artigo foi o mais abrangente, onde todos os casos de micoses e pitiose diagnosticados em animais domésticos, provenientes de necropsias e biópsias entre 1990 e 2012, foram analisados. No período estudado foram revisados 9.487 protocolos de necropsias e 20.199 exames histopatológicos, totalizando 29.686 casos examinados no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (LPV-UFSM). Do total de protocolos analisados, em 230 foram diagnosticadas micoses ou pitiose (oomicose), sendo 179 casos (78%) de micoses e 51 casos (22%) de pitiose. As principais doenças diagnosticadas, em ordem decrescente de prevalência, foram: pitiose, candidíase, aspergilose, zigomicose, dermatofitose, malasseziose, criptococose, megabacteriose e esporotricose. Os equinos foram os mais acometidos pela pitiose e os animais de companhia (cães e gatos) foram os mais acometidos pelas micoses. O segundo artigo enfocou as características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico histopatológico da criptococose em cães e gatos. Pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) as leveduras eram arredondadas, com célula central contendo um núcleo, circundada por um halo claro (cápsula geralmente não corada). As técnicas histoquímicas do ácido periódico de Schiff (PAS), Grocott e Fontana-Masson (FM) foram utilizadas e evidenciaram a parede das células das leveduras. Pelo FM observou-se a melanina presente nessas células. As técnicas do azul Alciano e da mucicarmina de Mayer evidenciaram principalmente a cápsula polissacarídica das leveduras. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10,00 μm e o diâmetro total das leveduras encapsuladas variou entre 4,17 e 34,16 μm . Os brotamentos foram melhor visualizados através do PAS e ocorreram em base estreita, de forma única ou múltipla, principalmente em polos opostos das células das leveduras ou formando uma cadeia. O terceiro artigo enfocou um estudo imuno-histoquímico (IHQ) em casos de aspergilose e zigomicose, visando a otimização do uso da técnica de IHQ na detecção de *Aspergillus* spp. e zigomicetos em tecidos de animais. Utilizaram-se dois anticorpos monoclonais fungo-específicos em fragmentos de tecidos (fixados em formol e embebidos em parafina) com diagnóstico histomorfológico prévio de aspergilose e zigomicose, os quais foram submetidos a três sistemas de detecção diferentes (dois biotinizados e um não biotinizado). Os dois anticorpos apresentaram alta especificidade e sensibilidade nos tecidos examinados. Não ocorreram reações cruzadas entre os anticorpos utilizados e os agentes etiológicos avaliados (incluindo casos de aspergilose, zigomicose, candidíase e pitiose). No entanto, reações inespecíficas foram observadas nas hifas em alguns casos, porém foram eliminadas através de um dos sistemas de detecção utilizados. A técnica de IHQ mostrou-se uma ferramenta muito útil na detecção e confirmação dos casos de aspergilose e zigomicose neste estudo retrospectivo.

Palavras chave: micoses, pitiose, histomorfologia, histoquímica, imuno-histoquímica, reações inespecíficas.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DIAGNOSIS OF MYCOSES AND OOMYCOSES IN DOMESTIC ANIMALS

AUTHOR: GLAUCO JOSÉ NOGUEIRA DE GALIZA

ADVISER: GLAUCIA DENISE KOMMERS

Santa Maria, March 31, 2014.

This thesis was composed of three scientific papers. The first paper was the more comprehensive one. All necropsy and biopsy cases of mycoses and oomycosis diagnosed in domestic animals between 1990 and 2012 were analyzed. In the studied period, 29,686 exams (9,487 necropsy reports and 20,199 biopsy reports) performed at the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) were studied. Two hundred and thirty cases of mycosis or pythiosis (oomycosis) were found, being 179 cases (78%) of mycoses and 51 cases (22%) of pythiosis. The main diseases observed, in descending order of prevalence, were: pythiosis, candidiasis, aspergillosis, zygomycosis, dermatophytosis, mallasseziosis, cryptococcosis, megabacteriosis, and sporothricosis. Pythiosis affected mainly horses and the mycosis affected mainly dogs and cats. The second article focused on the histomorphological and histochemical characteristics determinant for the histopathological diagnosis of this condition in dogs and cats. By the hematoxylin-eosin (HE) stain, the yeasts were round, with a central cell containing a nucleus, surrounded by a clear halo (usually non-stained capsule). The techniques of periodic Schiff acid (PAS), Grocott, and Fontana-Masson (FM) were utilized and demonstrated the wall of the yeast cells. The FM stain showed the melanin present in these cells. The Alcian blue and Mayer's mucicarmin stains showed mainly the yeast polysaccharide capsule. The diameter of the cells ranged from 1.67 to 10.00µm and the full diameter of the encapsulated yeasts varied between 4.17 e 34.16µm. Yeast buddings were better observed through the PAS stain and were narrow based, simple or multiple, mainly in the opposite poles of the cells, or forming chains. The third article emphasized an immunohistochemical (IHC) study of cases of aspergillosis and zygomycosis aiming to optimize the use of the IHC technique in the detection of *Aspergillus* spp. and zygomycetes in animal tissues. Two fungal-specific monoclonal antibodies were utilized in tissue fragments (formalin-fixed paraffin-embedded) previously diagnosed as aspergillosis or zygomycosis. Tissues were submitted to three different detection systems (two biotinilated and one nonbiotinilated). Both antibodies showed high specificity and sensitivity in the examined tissues. No cross-reactions were observed between the antibodies utilized and the agents evaluated (including cases of aspergillosis, zygomycosis, candidiasis, and pythiosis). However, nonspecific reactions were observed in hyphae of some cases, but were eliminated by mean of one of the detection systems used. The IHC technique showed to be a useful tool detecting and confirming aspergillosis and zygomycosis in this retrospective study.

Key words: mycoses, pythiosis, histomorphology, histochemistry, immunohistochemistry, nonspecific reactions.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 ARTIGO 1- Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos	12
3 ARTIGO 2- Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia	32
4 ARTIGO 3- Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais.....	51
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÃO.....	66
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos eucariontes¹, uni ou pluricelulares e heterotróficos² pertencentes ao Reino Fungi (MEIRELES; NASCENTE, 2009). Diversos agentes fúngicos têm sido descritos como responsáveis por doenças em animais (CONNOLE, 1967; GARCIA; BLANCO, 2000; DIAL, 2007). As doenças causadas por fungos podem ser divididas em micoses superficiais, afetando a pele, pelos e unhas, e em micoses sistêmicas, afetando vários órgãos (ANTHONY, 1973; CHIHAYA et al., 1992). Nas micoses sistêmicas, a rota mais comum de infecção é a via respiratória, afetando primariamente a cavidade nasal, linfonodos mediastínicos e pulmão, seguida da via oral e da invasão exógena da pele e tecido subcutâneo (SMALL, 1969). Dentre as micoses que acometem animais domésticos destacam-se a aspergilose, as zigomicoses, a candidíase, a criptococose, a dermatofitose e a esporotricose.

Aspergilose é uma micose oportunista causada primariamente por *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. aviarius* e *A. terreus* (MADDY; BETHESDA, 1967; MEIRELES; NASCENTE, 2009). Esse fungo é encontrado habitando comumente o solo, o ar e na matéria orgânica em decomposição, penetrando no organismo principalmente pelo trato respiratório, através da inalação de esporos, pela ingestão de esporos ou por penetração nos tecidos previamente traumatizados (QUINN et al., 2011).

Zigomicose é uma doença de etiologia múltipla causada por fungos pertencentes à classe dos zigomicetos (MEIRELES; NASCENTE, 2009). Essa classe é dividida em três ordens: a *Mucorales* (composta principalmente pelos gêneros *Lichtheinia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Saksenaea*), a *Entomophthorales* (composta pelos gêneros *Basidiobolus* e *Conidiobolus*) e *Mortierellales* (composta pelo gênero *Mortierella*) (QUINN et al., 2011). Os zigomicetos são fungos saprófagos³ que apresentam distribuição cosmopolita e são isolados do solo, vegetação, ar, fezes de animais e alimentos velhos (QUINN et al.,

¹Eucariontes são organismos uni ou pluricelulares cujas células apresentam núcleo individualizado e delimitado por uma membrana celular (carioteca), e citoplasma contendo um conjunto de organelas (retículo endoplasmático, mitocôndrias, aparelho de Golgi, cloroplastos, etc.).

² Heterotróficos são organismos que não conseguem sintetizar o seu próprio alimento, necessitando de substâncias orgânicas fornecidas pelo ambiente. Segundo as interações alimentares, os seres heterotróficos podem ser de dois tipos: macroconsumidores, quando obtêm os nutrientes que necessitam do ambiente por ingestão, e microconsumidores, quando obtêm o alimento do ambiente por absorção de matéria decomposta (decompositores ou saprófitos).

³ Saprófagos são seres vivos que se alimentam da matéria orgânica em decomposição.

2011). Zigomicoses em humanos frequentemente ocorrem em indivíduos debilitados ou imunossuprimidos, enquanto que nos animais pode estar associada à alta exposição a grande quantidade do agente (GINN et al., 2007). O fungo pode penetrar no organismo por meio dos tratos respiratório e gastrointestinal, e por via cutânea, através da implantação do agente em feridas abertas (JENSEN et al., 1994; GROOTERS, 2003; SILVA et al., 2007a).

A infecção por *Candida* spp. tem sido relatada principalmente em animais imunossuprimidos ou submetidos à terapia antimicrobiana (JADHAV; PAL, 2006). Esse fungo apresenta distribuição mundial e é encontrado no solo, água, vegetais, microbiota de mucosas, pele e nos tratos gastrointestinal e urogenital de humanos e animais (MADDY, 1967; QUINN et al., 2011; MEIRELES; NASCENTE, 2009). *C. albicans* é considerada a espécie com maior potencial patogênico devido a fatores como formação de hifas, pseudo-hifas e tubo germinativo, além de secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e proteinases (MEIRELES; NASCENTE, 2009).

Criptococose é a doença micótica sistêmica mais comum no gato, afetando também cães, cavalos, bovinos, dentre muitas outras espécies animais, e humanos (CASWELL; WILLIAMS, 2007). É causada por duas espécies do gênero *Cryptococcus*: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. São fungos pertencentes à classe Blastomycetes que no tecido animal e em condições perfeitas de laboratório, apresentam-se em forma de leveduras com uma cápsula polissacarídica mucoide (CASTELLÁ et al., 2008). Esses fungos apresentam distribuição cosmopolita, sendo frequentemente isolados de excretas dessecadas de aves, especialmente de pombos urbanos (MEIRELES; NASCENTE, 2009). *C. gattii* é encontrado principalmente em áreas de plantações de eucalipto em climas tropicais (CASWELL; WILLIAMS, 2007). A infecção ocorre principalmente pelo trato respiratório através da inalação de leveduras ou basidiósporos⁴, afetando cavidade nasal e pulmão. A disseminação do fungo ocorre via hematogênica, afetando o encéfalo, olhos, pele e outros órgãos (RORIGUES et al., 1999; MEIRELES; NASCENTE, 2009).

As dermatofitoses são micoses cutâneas infecto-contagiosas, de curso crônico, causadas por um grupo de fungos taxonomicamente relacionados chamados dermatófitos, representados pelos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (PEREIRA; MEIRELES, 2007; GREENE, 2012). Esses fungos apresentam distribuição mundial, ocorrendo principalmente em áreas de clima quente e úmido. Os dermatófitos têm a habilidade de replicar no solo em associação com material ceratinizado em decomposição de

⁴ Basidiósporos são os esporos exógenos oriundos da reprodução sexuada de fungos do filo Basidiomycota.

pelos ou penas (MEIRELES; NASCENTE, 2009; QUINN et al., 2011). Alguns fungos desses gêneros, como *M. canis*, são adaptados a viver nos animais e raramente são observados no solo (OUTERBRIDGE, 2006). Os animais adquirem a infecção através de contato com o solo, materiais infectados ou animais doentes (QUINN et al., 2011).

Esporotricose é uma infecção crônica frequentemente afetando a pele, tecido subcutâneo e linfonodos regionais, causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (GROSS et al., 2009). *S. schenckii* é um fungo geofílico,⁵ encontrado em solos ricos em matéria orgânica e plantas, principalmente nas regiões de clima quente e úmido (MEIRELES; NASCENTE, 2009). A infecção ocorre esporadicamente em equinos, felinos, caninos e em humanos (QUINN et al., 2011). Geralmente a infecção resulta da inoculação direta do fungo para dentro da pele, por contato com plantas ou solos contaminados ou, menos frequentemente, pela inalação dos esporos (GREENE, 2012).

Os oomicetos são micro-organismos eucariontes semelhantes aos fungos nas características morfológicas e de crescimento, porém, filogeneticamente diferem dos fungos e pertencem ao Reino Straminipila (às vezes referido como Stramenopila). Dentre os oomicetos, *Pythium insidiosum* tem se destacado como o principal patógeno (COCK et al., 1987; ALEXOPOULOS et al., 1996; AZEVEDO et al., 2012), responsável por infecções graves em humanos e em diferentes espécies de animais (MENDOZA et al., 1993; ALEXOPOULOS et al., 1996; MENDOZA et al., 1996), incluindo equinos (MENDOZA; NEWTON, 2005), cães (MILLER, 1985), gatos (RAKICH et al., 2005), bovinos (MILLER et al., 1985) e ovinos (TABOSA et al., 2004). A doença foi também descrita em alguns animais silvestres (CAMUS et al., 2004; WELLEHAN et al., 2004) e numa ave migratória (PESAVENTO et al., 2008). A infecção por *P. insidiosum* é associada ao contato dos animais com águas contaminadas, onde ocorre a liberação de zoósporos móveis biflagelados (CHAFFIN et al., 1995).

As doenças fúngicas e oomicóticas têm recebido grande atenção nas últimas décadas devido a diversos fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro, a ampla distribuição do agente no meio ambiente, a manifestação clínica altamente variável, a dificuldade no diagnóstico clínico e a necessidade de identificação específica dos agentes etiológicos para instituição do tratamento adequado (KAUFMAN, 1992; GARCIA; BLANCO, 2000; BLANCO; GARCIA, 2008).

⁵ Fungos geofílicos são fungos que habitam solos ricos em matéria orgânica.

Várias características morfológicas e propriedades tintoriais (histoquímicas) permitem um direcionamento diagnóstico de infecção fúngica através do exame histopatológico (ANTONY, 1973; KAUFMAN, 1992), principalmente quando a presença intralésional desses agentes correlaciona-se ao tipo de lesão e resposta do hospedeiro (JENSEN et al., 1996). Entretanto, a necessidade de ferramentas diagnósticas complementares à histopatologia que permitam uma confirmação etiológica específica em materiais fixados em formol e emblocados em parafina (FFEP) é uma realidade inegável; principalmente quando se está diante das seguintes situações apontadas por Guarner & Brandt (2011): a) elementos fúngicos presentes no exame histopatológico, mas toda a amostra remetida está fixada em formol; b) cultura positiva, mas elementos fúngicos ausentes na histopatologia; c) elementos fúngicos nas seções de tecidos examinados, mas a cultura foi negativa; e d) há discrepância entre os resultados da cultura e os achados histopatológicos.

Dentre as técnicas de diagnóstico de micoses e oomicoses que podem ser empregadas em materiais FFEP estão a imuno-histoquímica (IHQ; detecta antígenos fúngicos e é associada à morfologia tecidual), a hibridização *in situ* (HIS; detecta ácidos nucleicos fúngicos específicos e é associada à morfologia tecidual), a reação em cadeia de polimerase (PCR; detecta DNA fúngico) e a microdissecção à laser (combina microscopia com tecnologia à laser, possibilitando o estudo de tipos celulares específicos) (GUARNER; BRANDT, 2011).

A IHQ tem provado ser uma ferramenta poderosa para o diagnóstico acurado de várias micoses (JENSEN et al., 1993; JENSEN et al., 1996; EYZAGUIRRE; HAQUE, 2008) que acometem humanos e animais, incluindo aspergilose, candidíase, criptococose, blastomicose, coccidioidomicose, histoplasmose, paracoccidioidomicose, fusariose, pseudoalergiose, esporotricose, tricosporonose, peniciliose e zigomicoses (mucormicoses), dentre outras (JENSEN et al., 1993; JENSEN et al., 1996). Infecções por algas (JENSEN et al., 1996) e oomicetos (BROWN et al., 1988; SANTURIO et al., 1998; GABRIEL et al., 2008; MARTINS et al., 2012) também têm sido confirmadas por essa técnica. Além da especificidade da IHQ, a aplicação de cromógenos é altamente efetiva para a localização de elementos fúngicos típicos e atípicos em lesões onde somente poucos organismos estão presentes. A IHQ também permite dupla marcação (com cromógenos distintos) para a elucidação de casos com dupla infecção micótica (JENSEN et al., 1996).

Entretanto, alguns estudos, utilizando determinados anticorpos, têm demonstrado reações cruzadas entre diversos fungos ou reações inespecíficas na IHQ (REED et al., 1993; BYRD et al., 2001; SCHUETZ; COHEN, 2009). Nesses casos, as reações cruzadas podem

estar associadas às semelhanças antigênicas entre alguns fungos (REED et al., 1993; SCHUETZ; COHEN, 2009). Na medida em que novos anticorpos monoclonais livres de reações cruzadas são desenvolvidos e testados através da IHQ (MARCILLA et al., 1999), esta técnica vai se apresentando como uma alternativa eficiente diante de testes mais onerosos e que não combinam a morfologia (histomorfologia) com a detecção do fungo específico (GUARNER; BRANDT, 2011).

Para que haja uma otimização do uso da técnica de IHQ no diagnóstico de micoses e oomicoses, na medida em que novos anticorpos fungo-específicos vão sendo disponibilizados, tornam-se extremamente necessários estudos criteriosos, onde várias amostras FFEP e vários métodos imuno-histoquímicos sejam utilizados, e onde haja uma associação dos achados da IHQ com a histopatologia. Alguns desses estudos têm sido publicados (BROWN et al., 1988; JENSEN et al., 1993; JENSEN et al., 1994; JENSEN et al., 1996; ROCHA et al., 1998; MARCILLA et al., 1999; CHOI et al., 2004; TROST et al., 2009; MARTINS et al., 2012) e são de grande valor no aprimoramento do uso da IHQ para detecção de fungos e oomicetos na rotina em patologia veterinária, justificando mais uma vez este estudo.

O Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) conta com uma rotina de diagnóstico expressiva dentro de sua área de abrangência. Nessa rotina, há uma casuística relevante de doenças relacionadas às infecções fúngicas ou pelo oomiceto *P. insidiosum*, acometendo diferentes espécies animais. Esta tese objetivou, através de um estudo retrospectivo (Artigo 1), avaliar a prevalência de micoses e oomicoses diagnosticadas em animais domésticos na área de abrangência do LPV-UFSM, bem como aspectos histomorfológicos, histoquímicos (Artigo 2) e imuno-histoquímicos (Artigo 3) dos agentes etiológicos aplicados ao diagnóstico em patologia veterinária.

2 ARTIGO 1- Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos

Glauco J.N. Galiza, Taiara M. da Silva, Rafaela A. Caprioli, Claudio S.L. Barros, Luiz F. Irigoyen, Rafael A. Figuera, Maristela Lovato e Glauca D. Kommers

(Artigo submetido para a revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**)

Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos⁶

Glauco J.N. Galiza⁷, Taiara M. da Silva⁸, Rafaela A. Caprioli³, Claudio S.L. Barros⁹, Luiz F. Irigoyen⁴, Rafael A. Fighera⁴, Maristela Lovato¹⁰ e Glaucia D. Kommers^{4*}

ABSTRACT.- Galiza G.J.N., Silva T.M., Caprioli R.A., Barros C.S.L., Irigoyen L.F., Fighera R.A., Lovato M. & Kommers G.D. 2013. [**Occurrence of mycoses and pythiosis in domestic animals: 230 cases**]. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: glaukommers@yahoo.com

A retrospective study was performed to determine the main mycoses and oomycosis that affected domestic animals diagnosed in the Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A total of 29,686 exams (9,487 necropsy reports and 20,199 biopsy reports) performed between January 1990 and December 2012 were analyzed. Two hundred and thirty cases (78% of mycosis and 22% of pythiosis) were found. Data about epidemiology, clinical signs, gross and histologic lesions were obtained from the reports. In two cases the fungi observed were not identified. The main diseases observed, in descending order of prevalence, were: pythiosis, candidiasis, aspergillosis, zygomycosis, dermatophytosis, mallasseziosis, cryptococcosis, megabacteriosis, and sporothrichosis. Other diseases with only one case each were histoplasmosis and pneumocystosis. Pythiosis affected mainly horses and the mycosis affected mainly companion animals (dogs and cats).

INDEX TERMS: mycoses, pythiosis, veterinary pathology.

⁶ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

⁷ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

⁸ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

⁹ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.* Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

¹⁰ Laboratório Central de Diagnóstico em Patologias Aviárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, CCR, UFSM.

RESUMO.- Para determinar as principais micoses e oomicoses que acometeram animais domésticos na área de abrangência do Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foi realizado um estudo retrospectivo em 9.487 protocolos de necropsias e 20.199 exames histopatológicos (totalizando 29.686 casos), realizados no LPV-UFSM, entre janeiro de 1990 e dezembro de 2012. Do total de protocolos analisados, 230 apresentaram micoses ou pitiose (oomicose), sendo 179 casos (78%) de micoses e 51 casos (22%) de pitiose. Os protocolos foram revisados para determinar os principais achados referentes à epidemiologia, sinais clínicos e às alterações macroscópicas e microscópicas. Em dois casos (0,8%) não foi possível determinar o gênero ou o grupo do fungo observado. As principais doenças diagnosticadas, em ordem decrescente de prevalência, foram: pitiose, candidíase, aspergilose, zigomicose, dermatofitose, malasseziose, criptococose, megabacteriose e esporotricose. Outras doenças diagnosticadas numa única ocorrência cada foram histoplasmose e pneumocistose. Os equinos foram os mais acometidos pela pitiose e os animais de companhia (cães e gatos) foram os mais acometidos pelas micoses.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: micoses, pitiose, patologia veterinária.

INTRODUÇÃO

Os fungos são micro-organismos eucariontes, uni ou pluricelulares e heterotróficos pertencentes ao Reino Fungi (Meireles & Nascente 2009). Estima-se que aproximadamente 800.000 espécies de fungos tenham sido descritas, dentre essas, cerca de 400 espécies são patogênicas para humanos e animais (Quinn et al. 2011). Os oomicetos são micro-organismos eucariontes semelhantes aos fungos nas características morfológicas e de crescimento, porém, filogeneticamente diferem dos fungos e pertencem ao Reino Straminipila (Mendoza & Newton 2005). *Pythium insidiosum* é o principal representante dessa classe de micro-organismos como responsável por infecções graves em humanos e em diferentes espécies animais (Mendoza et al. 1993, Alexopoulos et al. 1996, Mendoza et al. 1996).

Com o aumento no número de casos associados às infecções fúngicas (Guarner & Brandt 2011) e oomicóticas (Santurio et al. 2006) nos últimos anos, essas doenças têm recebido grande atenção devido a diversos fatores relacionados com a resposta imune do hospedeiro, a ampla distribuição do agente no meio ambiente, a manifestação clínica altamente variável, a dificuldade no diagnóstico clínico e a necessidade de identificação

específica dos agentes etiológicos para a seleção de uma terapia apropriada (Kaufman 1992, Garcia & Blanco 2000, Blanco et al. 2008). No Brasil há poucos estudos abrangentes sobre a prevalência das doenças causadas por fungos e oomicetos em animais nas diferentes regiões do país, ficando as publicações mais voltadas a relatos de casos específicos (Tabosa et al. 2004, Silva et al. 2007, Gabriel et al. 2008, Ceolin et al. 2012).

O Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) conta com uma rotina de diagnóstico expressiva dentro de sua área de abrangência. O principal objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das doenças fúngicas e da pitiose (oomicose) nessa rotina diagnóstica, com a caracterização dos quadros clínico-patológicos observados. Foram também avaliadas as características histomorfológicas que permitiram esses diagnósticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo nos arquivos do LPV-UFSM (protocolos de exames histopatológicos e de necropsias) dos casos diagnosticados como micoses ou pitiose (oomicose) nas espécies de animais domésticos submetidas no período de janeiro de 1990 a dezembro de 2012. Avaliaram-se os dados epidemiológicos, alterações macroscópicas e microscópicas descritas nos protocolos. Os diagnósticos das micoses e de pitiose foram realizados com base na histomorfologia do agente através da coloração de hematoxilina-eosina (H&E) e outros métodos histoquímicos, incluindo os métodos do azul Alciano, do ácido periódico de Schiff (PAS) e da impregnação pela prata de Grocott (GMS); ou pela histomorfologia do agente e por exames adicionais, incluindo cultura micológica/microbiológica, imuno-histoquímica (IHQ) e reação em cadeia de polimerase (PCR), ou combinações desses métodos. Alguns casos deste levantamento foram previamente publicados como relatos de casos ou estudos de compilações de casos, incluindo, por exemplo, as seguintes publicações: Rech et al. (2004), Segabinazi et al. (2004), Kommers et al. (2005), Gabriel et al. (2008), Trost et al. (2009) e Ceolin et al. (2012).

RESULTADOS

Foram revisados 9.487 protocolos de necropsias e 20.199 exames histopatológicos, totalizando 29.686 exames realizados durante o período estudado (janeiro de 1990 à dezembro de 2012). Foram computados 179 diagnósticos de micoses e 51 de pitiose em animais domésticos, totalizando 230 casos. Desses, 153 casos (66,6 %) foram exames histopatológicos

(119 de micoses e 34 de pitiose) e 77 casos (33,4 %) foram referentes a necropsias (60 de micoses e 17 de pitiose).

Do total de 230 casos, em 192 o diagnóstico foi realizado com base na histomorfologia do agente e em 36 casos, além da histomorfologia, foram realizados exames adicionais. Em dois casos diagnosticados em aves não foi possível determinar a etiologia do agente baseado somente na histomorfologia do fungo; exames adicionais não foram realizados nesses dois casos.

A pitiose foi a doença com maior número de diagnósticos, seguida por candidíase, aspergilose, zigomicose, dermatofitose, malasseziose, criptococose, esporotricose, rinosporidiose, pneumocistose e histoplasmose (Quadro 1).

Dentre as espécies afetadas, os animais de companhia (caninos e felinos) apresentaram maior número de casos (92), seguidos pelas aves (53), equinos (48), ruminantes (33) e suínos (4) (Quadro 2). As características histomorfológicas, as propriedades tintoriais e a resposta (inflamatória) específica dos hospedeiros nos casos aqui estudados encontram-se resumidas no Quadro 3. A seguir serão detalhados alguns aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos de cada uma das doenças diagnosticadas.

Quadro 1. Diagnósticos realizados em 230 casos de micoses e de pitiose em animais domésticos no LPV – UFSM, entre 1990 e 2012.

Diagnósticos	Histomorfologia do agente*	Histomorfologia + exames adicionais**	Total
Pitiose	25	26	51
Candidíase	39	-	39
Aspergilose	27	6	33
Zigomicose	27	1	28
Dermatofitose	24	2	26
Malasseziose	18	-	18
Criptococose	10	1	11
Megabacteriose	10	-	10
Esporotricose	8	-	8
Rinosporidiose	2	-	2
Pneumocistose	1	-	1
Histoplasmose	1	-	1
Fungos não identificados	2	-	2
Total	194	36	230

*Baseado nas colorações de hematoxilina-eosina, ácido periódico de Schiff (PAS), impregnação pela prata de Grocott (GMS) ou azul Alciano, conforme o caso.

** Cultura micológica/microbiológica e/ou imuno-histoquímica (IHQ) e/ou reação em cadeia de polimerase (PCR).

Quadro 2. Prevalência de micoses e de pitiose nas diferentes espécies de animais domésticos no LPV – UFSM, entre 1990 e 2012.

Diagnósticos	Animais de companhia*	Equinos	Aves*	Ruminantes*	Suínos	Total
Pitiose	12	38	-	1	-	51
Candidíase	17	1	13	5	3	39
Aspergilose	3	1	24	5	-	33
Zigomicose	4	1	4	18	1	28
Dermatofitose	22	1	-	3	-	26
Malasseziose	17	-	-	1	-	18
Criptococose	10	1	-	-	-	11
Megabacteriose	-	-	10	-	-	10
Esporotricose	6	2	-	-	-	8
Rinosporidiose	-	2	-	-	-	2
Pneumocistose	-	1	-	-	-	1
Histoplasmose	1	-	-	-	-	1
Fungos não identificados	-	-	2	-	-	2
Total	92	48	53	33	4	230

*Animais de companhia (cães e gatos), aves (galináceos, anseriformes e ratitas), ruminantes (bovinos, ovinos e bubalinos).

Pitiose

A pitiose foi diagnosticada em 51 casos, afetando principalmente os equinos (38), seguidos pelos animais de companhia (12) e bovinos (1 bovino pertencente a um surto de 76 animais). Em 28 casos, o diagnóstico foi confirmado por exames adicionais.

Nos equinos, as alterações foram observadas principalmente afetando a pele dos membros, abdômen e a cavidade nasal. As lesões se caracterizavam por aumentos de volume ulcerados com tratos fistulosos drenando secreção serossanguinolenta. No interior dos tratos fistulosos observaram-se múltiplas estruturas amareladas, irregulares, coraliformes e firmes, que frequentemente se desprendiam (conhecidas como kunkers).

Os casos diagnosticados nos animais de companhia afetaram principalmente o trato gastrointestinal (8) e a pele (4). Dos 12 casos diagnosticados, um ocorreu em um gato e os demais casos foram em cães. As alterações no trato gastrointestinal afetaram principalmente o mesentério, os linfonodos mesentéricos, o intestino delgado, o pâncreas e o estômago. Macroscopicamente observaram-se massas aderidas ao mesentério, aumento de volume dos linfonodos e pâncreas, e espessamento segmentar da parede do intestino e estômago. As lesões cutâneas afetaram principalmente o tórax, o abdômen, os membros e a genitália externa, e se caracterizaram por feridas ulceradas que não cicatrizavam. Todos os casos foram confirmados por provas adicionais (cultura microbiológica, IHQ ou PCR).

Quadro 3. Características histomorfológicas, propriedades tintoriais e resposta específica do hospedeiro nos casos de pitiose e de micoses diagnosticados em animais domésticos no LPV-UFSM entre 1990 e 2012.

Agente	Histoquímica			Resposta do Hospedeiro
	H&E	PAS	GMS	
<i>Pythium insidiosum</i>	Imagens tubuliformes negativas.	Negativo	Hifas irregulares raramente septadas e ramificadas com paredes não paralelas. 4-25µm de diâmetro	Cavalo: centros necróticos e eosinofílicos (correspondentes aos kunkers na macroscopia) contendo numerosas hifas e com proliferação periférica de tecido fibrovascular. Bovino: granulomas e piogranulomas na derme associados a raras hifas intralesionais. Cão e gato: reação (pio)granulomatosa ou necro-eosinofílica com hifas intralesionais.
<i>Candida spp.</i>	Estruturas leveduriformes (LEV) e pseudo-hifas (PSH) levemente basofílicas.	Positivo (LEV e PSH).	LEV com 1-7 µm de diâmetro e PSH com 2-8 µm de diâmetro, com constrições. Raras ramificações.	Áreas de necrose associadas a infiltrado neutrofílico e histiocítico.
<i>Aspergillus spp.</i>	Imagens tubuliformes negativas ou levemente basofílicas e ramificadas.	Positivo	Paredes paralelas com diâmetro de 10-20 µm, septadas e com ramificações dicotômicas (em ângulos agudos).	Aves: granulomas de aspecto lamelar com centro necrótico. Presença de conidióforos no pulmão e pele. Bovino e equino: áreas de necrose com infiltrado misto. Bovino (pele): tecido de granulação associado a hifas intralesionais Feto bovino: foliculite linfoplasmocítica associada a hifas intralesionais. Cão: osteomielite piogranulomatosa. Cavidade nasal rinite granulomatosa com formação de cristais birrefringentes.
Dermatófitos	Arthroconídeos basofílicos e imagens tubuliformes levemente basofílicas.	Arthroconídeos e hifas positivos.	Arthroconídeos com diâmetro de 1-4 µm e hifas septadas ramificadas com diâmetro de 1-3 µm.	Dermatite superficial linfo-histioplasmocítica com foliculite neutrofílica associada à acantose. Felino (gengiva): infiltrado inflamatório misto com reação de Splendore-Hoeppli.
Zigomicetos	Imagens tubuliformes negativas ou levemente basofílicas.	Positivo	Hifas largas com diâmetro de 5-25 µm, com ramificações irregulares, raras septações e dilatações globosas de até 40 µm de diâmetro.	Áreas de necrose com infiltrado misto com predomínio de neutrófilos. Angioinvasividade associada à trombose e edema.
<i>Malassezia spp.</i>	Leveduras ovais a globosas basofílicas com brotamentos em base estreita.	Positivo	Leveduras positivas com diâmetro de 0,5- 2 µm.	Acantose com hiperqueratose associada a infiltrado linfo-histioplasmocítico na derme.
<i>Cryptococcus spp.*</i>	Levedura composta por um halo claro (cápsula) e célula arredondada basofílica. Célula com diâmetro de 1,6-10 µm e diâmetro total da levedura de até 34 µm.	Parede da célula positiva. Visualização de brotamentos em base estreita.	Parede da célula positiva.	Reação inflamatória variando de ausente à acentuada, composta predominantemente por macrófagos com citoplasma abundante contendo leveduras.
<i>Macrorhabdus ornithogaster</i>	Estruturas filamentosas basofílicas com parede levemente serrilhada, dispostas em aglomerados (tufo) com diâmetro de 1-5 µm e comprimento de 20-90 µm.	Positivo	Positivo	Lesões afetam principalmente a membrana coelina do ventrículo; ocasionalmente no interior das glândulas. Em um caso afetando o intestino delgado, as hifas estavam na parte superior das vilosidades, associadas a infiltrado linfoplasmocítico e heterofílico.
<i>Sporothrix schenckii</i>	Leveduras redondas a alongadas, de 2-8 µm de diâmetro, basofílicas, no citoplasma de macrófagos.	Positivo. Raros brotamentos (forma de raquete).	Leveduras positivas em pequena quantidade na lesão.	Dermatite piogranulomatosa composta por neutrófilos e macrófagos epitelioides, com citoplasma abundante e vacuolizado, na derme superficial e profunda.
<i>Rhinosporidium seeberi**</i>	Estruturas esféricas com parede espessa e contorno duplo. Esporângio com 300 µm de diâmetro, preenchidos por endósporos de 2-10 µm de diâmetro. Trofócitos de 100 µm de diâmetro.	Esporângio, endósporos e trofócitos positivos	Esporângios e endósporos maduros positivos.	Micro-organismos circundados por infiltrado inflamatório composto por macrófagos epitelioides, linfócitos e neutrófilos associados à hiperplasia epiteliomatosa e metaplasia escamosa do epitélio nasal.
<i>Histoplasma spp.</i>	Agregados de estruturas ovais de 2-4µm de diâmetro, levemente basofílicas no citoplasma de macrófagos e de células gigantes multinucleadas.	Leveduras positivas	Leveduras positivas e em grande quantidade na lesão.	Infiltrado inflamatório composto por macrófagos epitelioides com citoplasma levemente vacuolizado e, em menor quantidade, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos na derme superficial e profunda. Raras células gigantes multinucleadas.
<i>Pneumocystis spp.</i>	Material espumoso eosinofílico preenchendo os alvéolos pulmonares.	Positivo	Positivo; organismos com diâmetro de 2-5 µm.	Ausência de reação inflamatória.

* Visualização da cápsula de polissacarídeos pelas colorações de azul Alciano e mucicarmina de Mayer.

** Agente morfológicamente semelhante a fungo, porém reclassificado como parasita mesomicetozóario (Guarner & Brandt 2011).

No caso diagnosticado em um gato, as lesões afetaram o trato gastrointestinal, acometendo intestino delgado, pâncreas, fígado e linfonodos mesentéricos. As alterações macroscópicas e histopatológicas foram semelhantes às observadas nos cães. Neste caso, a técnica de IHQ para *P. insidiosum* foi positiva. No caso diagnosticado em um bovino (surto), as alterações foram observadas na pele dos membros, parte ventral do pescoço e esterno e eventualmente na cauda. As lesões se caracterizavam por elevações cutâneas nodulares ulceradas, recobertas por crostas e superfície de corte amarelada.

Candidíase

A candidíase foi a micose mais prevalente, sendo diagnosticada em 39 casos. Dentre as espécies mais afetadas estavam os animais de companhia (17 casos), seguidos das aves (13 casos), ruminantes (5 casos), suínos (3 casos) e um caso em equino. Dos 39 casos, em 32 a infecção foi considerada secundária a um processo patológico primário.

Nos animais de companhia, 14 casos foram diagnosticados em cães e três em gatos. Em cinco casos a candidíase foi relatada como sendo a causa principal das lesões ou morte dos animais, enquanto que nos 12 casos restantes foi considerada como sendo secundária. A idade dos animais afetados variou de 35 dias a 11 anos. O sistema digestório foi o mais afetado, com lesões no esôfago, intestino, estômago e cavidade oral, seguido da pele. Em apenas um caso foi observada a forma sistêmica em um gato, afetando órgãos da cavidade abdominal e torácica e o encéfalo. Macroscopicamente, as lesões observadas foram áreas ulceradas ou nódulos recobertos por material amarelado, grumoso ou serossanguinolento.

Nas aves apenas um caso de candidíase foi considerado como infecção primária. A idade das aves variou de 10 dias a três anos. Os principais órgãos afetados foram o ventrículo (principalmente a membrana coilina), o inglúvio, o esôfago, a cloaca, o pulmão e a pele. Macroscopicamente as lesões foram descritas como áreas ulceradas, nódulos friáveis ou espessamentos da mucosa dos órgãos do sistema digestório.

Nos ruminantes, apenas um caso de candidíase em bovinos foi considerado como a causa principal dos sinais clínicos. A idade dos animais afetados variou de 21 dias a seis anos. O trato digestório foi o mais acometido, afetando principalmente o rúmen, o abomaso, o intestino e a língua. Macroscopicamente, as lesões observadas foram áreas ulceradas ou mucosa edemaciada e vermelha.

Dos três casos diagnosticados em suínos, dois afetaram o esôfago e um acometeu cavidade nasal, pulmão e tonsila. Em todos os casos a infecção foi considerada secundária. A idade dos animais afetados variou de 20 a 180 dias. Macroscopicamente, evidenciaram-se

placas elevadas, esbranquiçadas a amareladas, aderidas a mucosa. No pulmão observaram-se áreas firmes avermelhadas, das quais, ao corte, fluía exsudato cremoso amarelo-claro.

No equino afetado, a candidíase estava associada a um caso de pitiose nasal. A lesão era restrita ao pulmão e apresentava-se como áreas firmes no parênquima pulmonar.

Aspergilose

A aspergilose foi diagnosticada em 33 casos, sendo 24 casos em aves domésticas, cinco casos em ruminantes, três casos em animais de companhia e um caso em um equino. Em seis casos o diagnóstico foi confirmado por cultura micológica.

Nas aves, em 16 casos apenas o pulmão estava afetado e em quatro casos observaram-se envolvimento pulmonar e de outros tecidos, destacando-se o fígado, o encéfalo, o coração, a cavidade celomática e, ocasionalmente, a pele. Macroscopicamente, as lesões descritas nas aves caracterizaram-se por múltiplos nódulos, com aspecto caseoso, afetando o parênquima ou a superfície dos órgãos.

Nos ruminantes, cinco casos ocorreram em bovinos, sendo quatro casos em animais com idade variando de 1 a 14 anos, e um caso em um feto no sétimo mês de gestação. Em dois bovinos, os pulmões tinham múltiplos nódulos purulentos, revestidos por uma cápsula fibrosa ou áreas friáveis enegrecidas e com focos circulares esverdeados. Em um caso, o bovino apresentava lesões crostosas na pele há 50 dias, de aspecto firme e branco-amareladas. Nesse caso, a cultura micológica foi positiva para *Aspergillus* sp. No feto bovino não foram observadas alterações macroscópicas. No entanto, no exame histopatológico evidenciou-se uma foliculite linfoplasmocítica associada a hifas intralesionais. Um caso foi diagnosticado em um ovino de um ano e as lesões foram observadas no rúmen e caracterizadas por áreas de aderência na parede abdominal e mucosa com áreas ulceradas, deprimidas e escuras.

Nos animais de companhia, os três casos ocorreram em cães, afetando o tecido ósseo e a cavidade nasal. Os dois casos com envolvimento do tecido ósseo foram em cães da raça Pastor Alemão. Em um caso observou-se uma massa friável e brancacenta, que ocupava o canal vertebral, comprimindo a medula espinhal.

Um caso de aspergilose foi diagnosticado em um equino de um ano. Macroscopicamente, o pulmão estava firme e pouco colapsado, com áreas multifocais avermelhadas. Ao corte observaram-se múltiplos nódulos claros no parênquima. No colón havia múltiplos nódulos amarelados, circundados por um halo avermelhado.

Zigomicoses

As zigomicoses foram diagnosticadas em 28 casos, sendo 18 em ruminantes, quatro em animais de companhia, quatro em aves e um caso em suíno e em equino.

Nos ruminantes, a grande maioria dos animais afetados recebia suplementação alimentar. As lesões foram observadas principalmente no sistema digestório. Macroscopicamente, as lesões caracterizavam-se por áreas ulceradas, recobertas por fibrina, ou avermelhadas na mucosa dos pré-estômagos, abomaso e intestino. Outros tecidos como fígado, pulmão e cavidade nasal também foram ocasionalmente afetados.

Dos quatro casos diagnosticados em animais de companhia, três acometeram cães e um caso ocorreu em um gato. Nos cães, as lesões foram observadas no estômago, trato respiratório e pele. Macroscopicamente, as lesões no estômago e na pele apresentavam-se como áreas multifocais ulceradas e recobertas por fibrina. No trato respiratório, as lesões se caracterizaram por estruturas esbranquiçadas, verrucosas e penugentas, na mucosa da traqueia e brônquios, associado à exsudato esverdeado. Neste caso foi isolado o fungo (da ordem Mucorales) *Cunninghamella bertholletiae*. No gato, as lesões se caracterizaram por áreas dilatadas, com perfurações e espessamento da mucosa do duodeno.

Nas aves, os três casos afetaram o trato digestório. Macroscopicamente, as alterações foram inespecíficas, tais como impactação do ventrículo e, em um caso, houve a perfuração da membrana coilina por um corpo estranho.

No caso diagnosticado em um suíno, o animal apresentava cinco dias de idade e apresentou lesões ulceradas no estômago. O equino afetado tinha 18 anos de idade e apresentou uma massa firme de 4 x 3 cm no prepúcio.

Dermatofitose

A dermatofitose foi diagnosticada em 26 casos, sendo 22 em animais de companhia, três em ruminantes e um em um cavalo. Em quatro casos o diagnóstico foi confirmado pela cultura micológica, sendo dois casos de *Microsporum gypseum* em cães e dois casos de *Trichophyton* sp. acometendo um cão e um cavalo.

Dos 22 casos diagnosticados em animais de companhia, 15 foram em cães e sete em gatos. Em cães, as lesões estavam restritas à pele e se caracterizavam por áreas circulares alopecias, com descamação, hiperpigmentação, com ou sem prurido. Em alguns casos observaram-se áreas crostosas, liquenificação da pele, áreas eritematosas e ou ulceradas, com exsudação de material purulento. Nos felinos, em seis casos a pele estava afetada e em apenas um caso a gengiva foi afetada. As lesões cutâneas observadas nos felinos caracterizaram-se

principalmente por áreas circulares alopecicas, descamativas, com ou sem prurido. A lesão na gengiva se caracterizou por um aumento de volume firme adjacente ao dente canino.

Nos ruminantes, todos os casos acometeram a pele de bovinos. As lesões caracterizaram-se por áreas de espessamento da epiderme associada a crostas.

No caso diagnosticado no equino, as lesões se caracterizaram por áreas alopecicas bem delimitadas próximo às narinas.

Malasseziose

A malasseziose foi diagnosticada em 18 casos, sendo 17 em cães e um caso em bovino. Todos os casos diagnosticados em cães afetaram a pele. As lesões se concentraram na pele e afetaram principalmente abdômen (tronco), orelhas e membros. Macroscopicamente, a pele das áreas afetadas apresentava-se avermelhada, com secreção ceruminosa (na orelhas) ou áreas alopecicas crostosas.

O bovino afetado apresentava lesões cutâneas caracterizadas por crostas focalmente extensas na região caudal de ambos os membros torácicos. Histologicamente havia acentuada hiperqueratose ortoceratótica associada a leveduras do fungo.

Criptococose

Foram diagnosticados 11 casos de criptococose, sendo dez casos em animais de companhia e um caso em um equino. Nos animais de companhia, sete casos foram em gatos e três em cães. Nos gatos, as lesões foram principalmente disseminadas, afetando a pele e órgãos internos. Em dois casos diagnosticados em cães as lesões foram disseminadas e em um caso as lesões estavam restritas ao pâncreas. Em um cão, o diagnóstico foi confirmado por cultura micológica, sendo identificado *Cryptococcus neoformans*. No caso diagnosticado no equino, a infecção estava associada a um quadro de laminite crônica e debilidade do animal. As lesões de criptococose estavam restritas aos pulmões.

Macroscopicamente observaram-se múltiplos nódulos esbranquiçados a amarelados, com consistência gelatinosa no parênquima dos órgãos. Na pele, as lesões eram elevadas e frequentemente ulceradas.

Megabacteriose

A megabacteriose, causada pelo fungo *Macrorhabdus ornithogaster*, também conhecido como “megabactéria”, foi diagnosticada em 10 casos em aves (galináceos e ratitas) com idade até três anos. Em nove casos as lesões foram observadas na membrana coelina e em

apenas um caso a lesão foi descrita no intestino delgado. Em três casos foram observadas múltiplas áreas de erosão na membrana coelina, nos demais casos as alterações macroscópicas descritas eram inespecíficas.

Esporotricose

Foram diagnosticados oito casos de esporotricose, sendo seis em gatos e dois em cavalos. Todos os casos diagnosticados afetaram a pele. Nos gatos, as lesões se concentravam na pele dos membros e na face, principalmente próximo às narinas. No entanto, casos de lesões cutâneas disseminadas também foram descritos. Nos cavalos, as lesões foram observadas nos membros pélvicos. Macroscopicamente, as lesões caracterizaram-se por múltiplas feridas ulceradas ou recobertas por crostas, em forma de placas levemente elevadas ou em nódulos.

Outras doenças micóticas e assemelhadas

Foram ainda diagnosticados dois casos de rinosporidiose (ver reclassificação do agente etiológico na discussão) em equinos, ambos afetando a cavidade nasal. Macroscopicamente, as lesões caracterizavam-se por nódulos de aspecto verrucoso a polipoide, macios, com superfície de corte lisa acinzentada. Um caso de histoplasmose foi diagnosticado em um cão com lesões ulceradas nos membros, no tronco e no interior das narinas, com curso clínico de dois meses. Um caso de pneumocistose, diagnosticado no pulmão de um equino, também foi observado.

DISCUSSÃO

As infecções causadas por fungos e oomicetos muitas vezes não apresentam alterações clínicas características que permitam um diagnóstico presuntivo (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996), seguido do encaminhamento de amostras apropriadas para a cultura micológica/microbiológica, que é a técnica padrão-ouro (Lima et al. 1977), e que permite a identificação específica do agente etiológico. Consequentemente, o agente causal de doenças micóticas e oomicóticas pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico dos órgãos e tecidos afetados (Jensen et al. 1996), quando uma percentagem muito significativa das amostras encontram-se já fixadas em formol, impossibilitando o envio para cultura.

Neste estudo retrospectivo, aproximadamente 83,4% (192/230) dos casos de micoses e pitiose foram diagnosticados com base na análise histomorfológica do agente e em suas

características histoquímicas, enquanto que em 15,6% (36/230), o diagnóstico foi confirmado por exames adicionais específicos. Esses resultados são, provavelmente, um reflexo direto do grande número de casos recebidos para exame histopatológico (153/230 casos; cerca de 67%) e, portanto, na sua grande maioria recebidos fixados. Adicionalmente, em muitos dos casos de necropsias, as lesões macroscópicas observadas não foram indicativas de micoses, sendo os fungos encontrados durante a avaliação histopatológica, quando já não havia tecidos disponíveis para a cultura. Nesses casos, a avaliação histomorfológica detalhada (incluindo as colorações especiais histoquímicas) pode representar a única ferramenta disponível ao patologista para o estabelecimento do diagnóstico etiológico das lesões, considerando-se, obviamente, as suas limitações. Esta observação no LPV-UFSM revela a provável realidade também de outros laboratórios semelhantes, chamando a atenção para a necessidade da utilização de outras técnicas adicionais como PCR e IHQ na confirmação da etiologia específica dessas doenças nessas situações. A seguir serão discutidos os resultados relacionados à prevalência e a aspectos específicos das principais doenças diagnosticadas.

A pitiose foi a doença mais prevalente, afetando principalmente os equinos, seguidos pelos caninos e bovinos. No Brasil, a ocorrência de pitiose foi descrita em diversas regiões, afetando várias espécies animais (Santurio et al. 2006). Na região Sul do Rio Grande do Sul, a pitiose foi considerada a principal causa de lesão cutânea em equinos (Marcolongo-Pereira et al. 2012) e foi responsável por aproximadamente 3,5% dos casos diagnosticados em necropsias nessa espécie em outro estudo realizado no LPV-UFSM (Pierezan et al. 2009). Nos equinos deste levantamento, a forma cutânea foi a mais prevalente, seguida da forma nasal, diferindo do descrito por outros autores que classificam a forma intestinal como a segunda apresentação mais prevalente da pitiose em equinos (Leal et al. 2001). Porém, vale salientar que a maioria dos diagnósticos de pitiose equina eram provenientes de biópsias cutâneas, não sendo assim avaliada a possibilidade de lesões intestinais concomitantes. Os cães foram a segunda espécie mais afetada, apresentando as formas gastrointestinal e/ou cutânea, seguidos pelos bovinos que apresentaram a forma cutânea. O caso de pitiose em um felino apresentou características morfológicas semelhantes às observadas por outros autores (Rakich et al. 2005). Apesar de ser um diagnóstico pouco comum em felinos, a ocorrência de pitiose deve ser considerada como diagnóstico diferencial de outras patologias infecciosas ou neoplásicas do trato gastrointestinal nessa espécie (Rakich et al. 2005). A pitiose cutânea em cavalos tem o seu diagnóstico histomorfológico altamente direcionado pela presença das hifas nos kunkers, o que não ocorre nas demais espécies aqui avaliadas por não apresentarem kunkers (Gabriel et al. 2008, Trost et al. 2009).

Dentre as micoses, a candidíase foi a mais diagnosticada nos animais domésticos deste estudo. A maioria dos casos afetou cães e gatos, acometendo principalmente o trato digestório e a pele. Apesar do elevado número de diagnósticos de candidíase, na maioria dos casos a infecção era secundária a um processo patológico primário de causa infecciosa ou associado a tratamentos com drogas antimicrobianas, como previamente descrito (Odriguez et al. 1998, Hesetine et al. 2003). No entanto, casos afetando animais imunocompetentes também têm sido relatados (Brown et al. 2005). Os aspectos epidemiológicos, as alterações macroscópicas e os achados histopatológicos e histoquímicos em todas as espécies são típicos da infecção por *Candida* spp. (Artal 2004).

A aspergilose foi a micose mais diagnosticada nas aves, demonstrando a sua importância nessa espécie (Tell 2005, Beernaert et al. 2010). O principal órgão afetado foi o pulmão, sugerindo que a fonte de infecção ocorreu pela inalação do agente. Nos ruminantes e nos equinos as lesões afetaram principalmente o pulmão e o trato digestório. Em um caso de aborto em bovinos, a visualização do agente nos folículos pilosos do feto permitiu o diagnóstico. Basicamente, três fungos são responsáveis por causar abortos, que por ordem de importância são *Aspergillus* spp., *Candida* spp. e zigomicetos (Garcia & Blanco 2000). As lesões de aspergilose em cães ocorreram na cavidade nasal e nas vértebras, sendo que em dois casos os animais eram da raça Pastor Alemão. Casos de aspergilose em cães afetam principalmente a cavidade nasal, no entanto cães da raça Pastor Alemão têm maior predisposição a desenvolver a forma disseminada da doença, afetando principalmente o tecido ósseo (Day 2006). A aspergilose nasal é a segunda causa mais comum de descarga nasal em cães depois das neoplasias (Benitah 2006, Peeters & Clercx 2007). O diagnóstico histomorfológico de aspergilose nas vias aéreas e pele é facilitado pela visualização frequente dos conidióforos, que são estruturas características desse gênero (Tell 2005, Beernaert et al. 2010), facilmente visualizadas no exame histopatológico.

A zigomicose foi a principal micose diagnosticada em ruminantes, afetando principalmente o trato digestório. A ocorrência de micoses nos pré-estômagos e abomaso dos ruminantes pode estar associada a quadros de acidose ruminal, por sobrecarga de carboidratos na dieta, utilização de antibióticos e outros fatores como prenhez, endometrites, mastites e septicemias (Chihaya et al. 1988, Chihaya et al. 1992). Casos de zigomicoses são pouco comuns em cães, gatos e suínos, afetando principalmente o trato gastrointestinal (Ginn et al. 2007). Dentro da ordem Mucorales, os principais gêneros responsáveis por zigomicoses gastrintestinais incluem *Absidia*, *Mucor*, *Rhizomucor*, *Rhizopus*, dentre outros (Grooters & Foil 2006). Em um caso de zigomicose afetando o trato respiratório em um cão, o diagnóstico

foi realizado com base nos achados histopatológicos, histoquímicos e cultura micológica. A zigomicose gastrointestinal em cães e gatos deve ser diferenciada da infecção por *P. insidiosum* (Grooters 2003, Berryessa et al. 2008).

Dentre as micoses que afetaram principalmente a pele destacaram-se a dermatofitose, a malasseziose e a esporotricose. Em todas as três doenças a prevalência foi alta, principalmente em cães e gatos. Os padrões distintos das alterações macroscópicas entre as três doenças permitem um diagnóstico presuntivo, sendo lesões circulares alopecicas com descamação e hiperpigmentadas indicativas de dermatofitose; lesões hiperêmicas com secreção ceruminosa (orelhas), nos casos de malasseziose; e lesões em forma de nódulos ou placas ulceradas ou recobertas por crostas, em casos de esporotricose (Rosser Jr. & Dunstan 2006, Souza 2009). Em apenas um caso de dermatofitose em um felino a lesão estava localizada na gengiva formando granulomas conhecidos com pseudomicetomas (Chermette et al. 2008). O diagnóstico de malasseziose em um bovino demonstra a susceptibilidade dessa espécie à infecção por esse agente, sendo necessário que seja incluído como diagnóstico diferencial em lesões de pele de bovinos (Duarte & Hamdan 2008). Devido ao potencial zoonótico dessas enfermidades (Rosser Jr. & Dunstan 2006, Chermette et al. 2008, Bond 2010), a realização de um diagnóstico preciso é de grande importância para o controle das doenças nos animais, conseqüentemente evitando a contaminação de humanos.

A criptococose é uma doença micótica importante em animais de companhia, afetando principalmente os felinos. O diagnóstico dessa enfermidade pode ser realizado através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia específica do agente e suas características histoquímicas (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Guarner & Brandt 2011). Os principais diagnósticos diferenciais da criptococose incluem a histoplasmose e a esporotricose (Guarner & Brandt 2011). Apesar de não ser considerada uma zoonose ou uma antropozoonose (Malik et al. 2006), a criptococose em cães e gatos apresenta um papel importante na saúde pública, tendo em vista que casos descritos em humanos e em animais podem resultar de uma fonte ambiental comum (Malik et al. 2006, MacDougall et al. 2007). Nessa situação, os animais infectados podem servir como sentinelas, identificando possíveis ambientes contaminados que poderiam ser fonte de infecção para o homem.

O fungo *Macrorhabdus ornithogaster* (megabactéria) está amplamente distribuído e afeta diversas espécies de aves domésticas e silvestres, causando perdas econômicas consideráveis (Martins et al. 2006). No entanto, estudos mais detalhados dessa enfermidade, principalmente em aves comerciais, são necessários para avaliar o grau de impacto dessa infecção na avicultura.

A rinosporidiose foi uma causa de rinite nos equinos deste estudo. No Brasil, a rinosporidiose tem sido descrita em equinos, mulas e bovinos (Londero et al. 1977, Trotte et al. 2008, Portella et al. 2010). Atualmente, *Rhinosporidium seeberi* não é mais considerado um fungo, mas um parasita mesomicetozoário, porém tem permanecido em revisões sobre a histopatologia das micoses (Guarner & Brandt 2011) e também permaneceu neste estudo, devido a sua morfologia e semelhanças com fungos como *Coccidioides* spp., por exemplo. Os esporângios e endospóros de *R. seeberi* são maiores que as esférulas de *Coccidioides* spp. e sua parede esporangial interna cora-se pela mucicarmina (Guarner & Brandt 2011). Histoplasmose e pneumocistose foram diagnosticadas com uma ocorrência cada, evidenciando que a casuística é baixa na área de abrangência do LPV-UFSM, mas devem ser consideradas como diagnósticos diferenciais para as outras micoses.

CONCLUSÕES

Este estudo retrospectivo permitiu concluir que: a) as principais doenças micóticas e oomicóticas diagnosticadas no LPV-UFSM foram: pitiose, candidíase, aspergilose, zigomicose, dermatofitose, malasseziose, criptococose, megabacteriose e esporotricose; b) a pitiose foi a enfermidade mais prevalente, afetando principalmente os equinos; e c) os animais de companhia (cães e gatos) foram às espécies mais afetadas pelas micoses, destacando-se a dermatofitose.

Agradecimentos.- G.J.N. Galiza (doutorado), T.M. Silva e R.A. Caprioli (iniciação científica - PIBIC) são bolsistas do CNPq. G.D. Kommers é bolsista de Produtividade do CNPq (PQ-2). O projeto é financiado pelo CNPq – Edital Universal (Processo nº 474839/2012-5).

REFERÊNCIAS

- Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. 1996. Phylum Oomycota, p.683-737. In: Alexopoulos C.J., Mims C.W. & Blackwell M. (Eds), *Introductory Mycology*. 4th ed. John Wiley and Sons, New York.
- Artal E.M. 2004. Diagnóstico histopatológico de las micosis. *Rev. Iberoam. Micol.* 21:S1-S9.
- Beernaert L.A., Pasmans F., Waeyenberghe L.V., Haesebrouck F. & Martel A. 2010. *Aspergillus* infections in birds: a review. *Avian Pathol.* 39(5):325-331.
- Benitah N. 2006. Canine nasal aspergillosis. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* 21:92-99.

- Berryessa N.A., Marks S.L., Pesavento P.A., Krasnansky T., Yoshimoto S.K., Johnson E.G. & Grooters A.M. 2008. Gastrointestinal pythiosis in 10 dogs from California. *J. Vet. Intern. Med.* 22:1065-1069.
- Blanco J.L. & Garcia M.E. 2008. Immune response to fungal infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125:47-70.
- Bond R. 2010. Superficial veterinary mycoses. *Clin. Dermatol.* 28(2):226-236.
- Brown M.R., Thompson C.A. & Mohamed F.M. 2005 Systemic candidiasis in an apparently immunocompetent dog. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:272-276.
- Ceolin L.V., Flores F., Correa I.M.O, Lovato M., Galiza G.J.N., Kommers G. D., Risso N. & Santurio J.M. 2012. Diagnóstico macro e microscópico de aspergilose em frangos de corte. *Acta Sci. Vet.* 40:1061.
- Chermette R., Ferreiro L. & Guillot J. 2008. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia.* 166:385-405.
- Chihaya Y., Matsukawa K., Mizushima S. & Matsui Y. 1988. Ruminant forestomach and abomasal mucromycosis under rumen acidosis. *Vet. Pathol.* 25:119-123.
- Chihaya Y., Matsukawa K., Ohshima K., Matsui Y., Ogasa K., Furusawa Y. & Okada H. 1992. Pathological studies on systemic mycoses in calves. *J. Vet. Med. Sci.* 53(6):1051-1058.
- Day M.J. 2006. Aspergilosis and Penicilliosis, p620-626. In: Greene C.E. (Ed), *Infectious Diseases of the dog and cat.* 3^a ed. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Duarte E.R. & Hamdan J.S. 2008. Molecular characterization of *Malassezia sympodialis* and *Malassezia furfur* from cattle with and without otitis. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(4):779-785.
- Farias R.O. & Xavier M.O. 2009. Criptococose, p191-203. In: Meireles M.C.A. & Nascente P.S. (Eds), *Micologia Veterinária.* Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, RS.
- Gabriel A.L., Kommers G.D., Trost M.E., Barros C.L.S., Pereira D.B., Schwendler S.E. & Santurio J.M. 2008. Surto de pitiose cutânea em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 28(12):583-587.
- Garcia M.E. & Blanco J.L. 2000. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domesticos. *Rev. Iberoam. Micol.* 17:S2-S7.
- Ginn P.E., Mansell J.E.K.L. & Rakich P.M. 2007. Fungal diseases of skin, 695-708. In: MAXIE, M.G. (Org.). *Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals.* 5th ed. Vol. 1. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Grooters A.M. 2003. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33(4):695-720.

- Grooters A.M. & Foil C.S. 2006. Miscellaneous fungal Infection, p.637-650. In: Greene C.E. (Ed), Infectious Diseases of the dog and cat. 3^a ed. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Guarner J. & Brandt M.E. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st Century. Clin. Microbiol. Rev. 24(2):247-280.
- Hesetine J.C., Panciera D. & Saunders G.K. 2003. Systemic candidiasis in a dog. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223:821-824.
- Jensen H.E., Schønheyder H.C., Hotchi M. & Kaufman L. 1996. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. APMIS. 104:(4)241-258.
- Kaufman L. 1992. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. Eur. J. Epidemiol. 8(3):377-382.
- Kommers G.D., Souza T.M., Souto M.A.M., LaCorte, F.D. & Barros C.S.L. 2005. Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. Cienc. Rural. 35(4):938-940.
- Leal A.T., Leal A.B.M., Flores E.F. & Santurio J.M. 2001. Pitiose - Revisão bibliográfica. Ciênc. Rural. 31:(4)735-743.
- Lima A.O. 1977. Métodos de laboratório aplicados à clínica. 5ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 669.
- Londero A.T., Santos M.N. & Freitas C.J.B. 1977. Animal Rhinosporidiosis in Brazil. Report of three additional cases. Mycopathologia. 60(3):171-173.
- MacDougall L., Kidd S.E., Galanis E., Mak S., Leslie M.J., Cieslak P.R., Kronstad J.W., Morshed M.G. & Bartlett K. 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. Emerg. Infect. Dis. 13(1):42-50.
- Malik R., Krockenberger M., O'Brien C.R., Martin P., Wigney D. & Medleau L. 2006. Cryptococcosis, p.584-598. In: Greene C.E. (Ed.), Infectious Diseases of the dog and cat. 3th ed. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Marcolongo-Pereira C., Sallis E.S.V., Raffi M.B., Pereira D.I.B., Hinnah F.L., Coelho A.C.B. & Schild A.L. 2012. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 32(9):865-868.
- Martins N.R.S, Horta A.C., Siqueira A.M. Lopes S.Q., Resende J.S., Jorge M.A., Assis R.A., Martins N.E., Fernandes A.A., Barros P.R., Costa T.J.R. & Guimarães L.M.C. 2006. *Macrorhabdus ornithogaster* in ostrich, rhea, canary, zebra finch, free range chicken, turkey, guinea-fowl, columbina pigeon, toucan, chuckar partridge and experimental infection in chicken, japanese quail and mice. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58(3):291-298.
- Meireles M.C.A. & Nascente P.S. 2009. Micologia Veterinária, Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, p.456.

- Mendoza L., Hernandez F. & Ajello L. 1993. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. J. Clin. Microbiol. 31(11):2967-2973.
- Mendoza L., Ajello L. & McGinnis M.R. 1996. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. J. Mycol. Med. 6(4):151-164.
- Mendoza L. & Newton J.C. 2005. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. Med. Mycol. 43:477-486.
- Odriguez F., Fernandez A., Espinosa de los Monteros A., Wohlsein P. & Jensen H.E. 1998. Acute disseminated candidiasis in a puppy associated with parvoviral infection. Vet. Rec. 142:434-436.
- Peeters D. & Clercx C. 2007. Update on canine sinonasal aspergillosis. Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract. 37(5):901-916.
- Pierezan F., Rissi D.R., Rech R.R., Figuera R.A., Brum J.S. & Barros C.S.L. 2009. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 equinos: 1968-2007. Pesq. Vet. Bras. 29(3):275-280.
- Portela R.A., Riet-Correa F., Júnior F.G., Dantas A.F.M., Simões S.V.D. & Silva S.M.S. 2010. Doenças da cavidade nasal em ruminantes no Brasil. Pesq. Vet. Bras. 30(10):844-854.
- Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Hartigan P., Fanning S. & FitzPatrick E.S. 2011. Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 2th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, p. 928.
- Rakich P.M., Grooters A.M & Tang K. 2005. Gastrointestinal pythiosis in two cats. J. Vet. Diagn. Invest. 17(3):262-269.
- Rech R.R., Graça D.L. & Barros C.L.S. 2004. Pitiose em um cão: relato de caso e diagnósticos diferenciais. Clínica Vet. 9(50):68-72.
- Rosser Jr. E.J. & Dunstan R.W. 2006. Sporotrichosis, p.608-612. In: Greene C.E. (Ed), Infectious Diseases of the dog and cat. 3^a ed. Saunders Elsevier, St. Louis.
- Santurio J.M., Alves S.H., Pereira D.B. & Argenta J.S. 2006. Pitiose: uma micose emergente. Acta Sci. Vet. 34(1):1-14.
- Segabinazi S.D., Flôres M.L., Kommers G.D., Barcelos A.S., Veit D.C. & Eltz R.D. 2004. Megabacteriose em emas (*Rhea americana*) no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Ciênc. Rural. 43(3):959-960.
- Silva S.M.M.S., Castro R.S., Costa F.A.L., Vasconcelos A.C., Batista M.C.S., Riet-Correa F. & Carvalho E.M.S. 2007. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. Pesq. Vet. Bras. 27(4):184-190.

- Souza, T.M. 2009. Dermatopatias não-tumorais em cães : Bases para o diagnóstico e dados de prevalência em Santa Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 165p.
- Tabosa I.M., Riet-Correa F., Nobre V.M., Azevedo E.O., Reis-Júnior J.L. & Medeiros R.M. 2004. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brazil. *Vet. Pathol.* 41:412-415.
- Tell L.A. 2005. Aspergillosis in mammals and birds: impact on Veterinary Medicine. *Med. Mycol.* 43:S71-S73.
- Trost M.E., Gabriel A.L., Masuda E.K., Figuera R.A., Irigoyen L.F. & Kommers G.D. 2009. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina. *Pesq. Vet. Bras.* 29(8):673-679.
- Trotte M.N.S., Santos I.B., Miranda L.H.M., Amorim A.R., Borges J.R.J. & Menezes R.C. 2008. Histopatologia de lesões tumoriformes presentes na cavidade nasal de eqüídeos do Brasil. *Ciênc. Rural.* 38(9):2535-2539.

3 ARTIGO 2- Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia

Glauco J.N. Galiza, Taiara M. Silva, Rafaela A. Caprioli, Camila Tochetto, Fábio B. Rosa, Rafael A. Fighera e Glaucia D. Kommers

(Artigo aceito para publicação na revista **Pesquisa Veterinária Brasileira**)

Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia¹¹

Glauco J.N. Galiza¹², Taiara M. Silva¹³, Rafaela A. Caprioli³, Camila Tochetto², Fábio B. Rosa², Rafael A. Fighera¹⁴ e Glaucia D. Kommers^{4*}

ABSTRACT.- Galiza G.J.N., Silva T.M., Caprioli R.A., Tochetto C., Rosa F.B., Fighera R.A. & Kommers G.D. 2013. [Determining histomorphological and histochemical characteristics in the diagnosis of cryptococosis in companion animals]. [**Determining histomorphological and histochemical characteristics in the diagnosis of cryptococosis in companion animals.**] Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: glaukommers@yahoo.com

Seven cases of cryptococosis (six cats and one dog) were studied to establish the determining histomorphological and histochemical characteristics in the histopathological diagnosis of this condition. Additional data related to the epidemiology, clinical aspects, sites of the lesions, and gross findings were obtained from the necropsy and biopsy protocols. Histologically, yeasts were observed inside macrophages or free in the parenchyma, associated with scarce to severe lymphohistioplasmacytic inflammatory reaction. In the hematoxylin-eosin (HE) sections, the yeasts were round, with a central cell containing a nucleus, surrounded by a clear halo (usually non-stained capsule). The techniques of periodic Schiff acid (PAS), Grocott, and Fontana-Masson (FM) were utilized and demonstrated the wall of the yeast cells. The FM stain showed the melanin present in these cells. The Alcian blue and Mayer's mucicarmin stains showed mainly the yeast capsule of polysaccharides. The diameter of the cells ranged from 1.67 to 10.00µm and the full diameter of the

¹¹ Recebido em 4 de dezembro de 2013.

Aceito para publicação em 6 de março de 2014.

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

¹² Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

¹³ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

¹⁴ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM, Santa Maria, RS. *Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

encapsulated yeasts varied between 4.17 e 34.16 μ m. Yeast buddings were better observed through the PAS stain and were narrow based, simple or multiple, mainly in the opposite poles of the cells or forming chains. The definitive diagnosis of cryptococosis was established through the histopathological exam, based on the specific morphology of the agent (encapsulated yeast) and on histochemical proprieties, mostly in the cases without fungal culture.

INDEX TERMS: Fungal infections, *Cryptococcus* spp., histomorphology, histochemistry, veterinary pathology, cats, dog.

RESUMO: Sete casos de criptococose (seis gatos e um cão) foram estudados para estabelecer as características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico histopatológico dessa condição. Os dados complementares relacionados à epidemiologia, aos aspectos clínicos, à localização das lesões e às alterações macroscópicas foram obtidos dos protocolos de necropsias e biópsias. Na histologia, as leveduras foram observadas no interior de macrófagos ou livres no parênquima, associadas à reação inflamatória linfoplasmocítica que variou de escassa a acentuada. Pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) as leveduras eram arredondadas, com célula central contendo um núcleo, circundada por um halo claro (cápsula geralmente não corada). As técnicas histoquímicas do ácido periódico de Schiff (PAS), Grocott e Fontana-Masson (FM) foram utilizadas e evidenciaram a parede das células das leveduras. Pelo FM observou-se a melanina presente nessas células. As técnicas do azul Alciano e da mucicarmina de Mayer evidenciaram principalmente a cápsula polissacarídica das leveduras. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10,00 μ m e o diâmetro total das leveduras encapsuladas variou entre 4,17 e 34,16 μ m. Os brotamentos foram melhor visualizados através do PAS e ocorreram em base estreita, de forma única ou múltipla, principalmente em polos opostos das células das leveduras ou formando uma cadeia. O diagnóstico definitivo de criptococose foi estabelecido através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia característica do agente (levedura encapsulada) e em suas propriedades tintoriais (histoquímicas), principalmente nos casos em que a cultura micológica não foi realizada.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Infecções fúngicas, *Cryptococcus* spp., histomorfologia, histoquímica, patologia veterinária, felinos, canino.

INTRODUÇÃO

Criptococose é a micose sistêmica mais comum no gato, mas que também afeta cães, cavalos, bovinos e muitas outras espécies animais, além de humanos (Caswell & Williams 2007). As duas espécies associadas com a doença em humanos e animais são *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii*. Essas duas espécies apresentam diferenças com relação ao habitat natural, à epidemiologia, às características fenotípicas, às manifestações clínicas e à resposta a terapia antifúngica (Sorrel 2001, Bovers et al. 2008). A criptococose não é considerada uma doença zoonótica ou uma antropozoonose, tendo em vista que *Cryptococcus* spp. não podem se disseminar no ambiente a partir de lesões no tecido (Malik et al. 2006). No entanto, casos descritos em humanos e em animais podem resultar de uma fonte ambiental comum (Malik et al. 2006, MacDougall et al. 2007).

Cryptococcus spp. são fungos pertencentes à classe Blastomycetes, que no tecido animal e em condições ideais de laboratório, apresentam-se em forma de leveduras com uma cápsula polissacarídica mucoide (Castellá et al. 2008). Quatro sorotipos são descritos, sendo os sorotipos A e D pertencentes a *C. neoformans* var. *neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii*, respectivamente, e os sorotipos B e C pertencentes a *C. gattii* (Bovers et al. 2008, Guarner & Brandt 2011). Alguns isolados possuem características de ambos os sorotipos A e D, e têm sido classificados como um quinto sorotipo, o sorotipo híbrido AD (Sorrel 2001). *C. neoformans* apresenta distribuição cosmopolita, sendo frequentemente isolado de excretas dessecadas de aves, especialmente pombos urbanos (Farias & Xavier 2009). *C. gattii* é encontrado principalmente em áreas de plantações de eucalipto em climas tropicais (Caswell & Williams 2007, MacDougall et al. 2007, Datta et al. 2009).

No Brasil há relatos de *C. neoformans* e *C. gattii* isolados em áreas urbanas e de mata, assim como casos clínicos em humanos (Côrrea et al. 1999, Severo et al. 1999, Montenegro & Paula 2000, Fortes et al. 2001) e animais (Kommers et al. 2005, Martins et al. 2008, 2010, Riet-Correa et al. 2011). A infecção ocorre principalmente pelo trato respiratório, através da inalação de leveduras ou basidiósporos e as lesões ocorrem principalmente na cavidade nasal e nos pulmões (Castellá et al. 2008). A disseminação do fungo ocorre via hematogena para o encéfalo, os olhos, a pele e outros órgãos (Rodrigues et al. 1999, Farias & Xavier 2009). No entanto, a infecção pode ocorrer na forma de lesões solitárias na pele ou no tecido subcutâneo, decorrentes de inoculação direta do agente (Malik et al. 2006, McGill et al. 2009).

A epidemiologia da criptococose depende diretamente da espécie envolvida, sendo *C. neoformans* o principal causador da doença em indivíduos imunocomprometidos (Rodrigues et al. 1999, Pappalardo & Melhem 2003). No entanto, *C. gattii*, além de afetar hospedeiros

imunossuprimidos, causa a doença em indivíduos imunocompetentes (Duncan et al. 2006). Vários fatores de virulência são descritos para os fungos pertencentes ao gênero *Cryptococcus*. Dentre eles destacam-se: a cápsula mucinosa composta por polissacarídeos, que bloqueia a interação entre anticorpos e receptores da superfície de macrófagos; a produção de melanina e manitol, que apresentam atividades antioxidantes e favorecem o neurotropismo; e a capacidade de se desenvolver em temperaturas fisiológicas, em torno de 37°C (Kozel 1995, Rodrigues et al. 1999, Steenbergen & Casadevall 2003, Malik et al. 2006).

Infecções micóticas muitas vezes não apresentam alterações clínicas e lesões macroscópicas características que permitam um diagnóstico presuntivo (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996), o qual possa ser confirmado pela cultura micológica, que é a técnica padrão-ouro (Lima et al. 1977). Conseqüentemente, o agente causal pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico dos tecidos afetados (Jensen et al. 1996). Nesses casos, o reconhecimento detalhado das características histomorfológicas e histoquímicas desses fungos constitui-se na principal ferramenta de diagnóstico etiológico. Com esse objetivo, foram analisados e discutidos os aspectos histomorfológicos e histoquímicos de sete casos de criptococose diagnosticados em animais de companhia no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Aspectos clínico-epidemiológicos também foram apresentados.

MATERIAL E MÉTODOS

Sete casos de criptococose (seis gatos e um cão), diagnosticados no LPV-UFSM, foram selecionados para este estudo. Avaliaram-se os dados epidemiológicos (incluindo raça, sexo e idade), sinais clínicos, alterações macroscópicas e histológicas descritas nos protocolos de necropsias (quatro casos; Felinos 1-3 e Canino 1) ou de exames histopatológicos a partir de biópsias (três casos; Felinos 4-6). Os espécimes provenientes de necropsias ou biópsias haviam sido fixados em formol a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. Seções de 3µm, coradas pela hematoxilina e eosina (HE), foram avaliadas visando principalmente classificar e quantificar a resposta inflamatória em cada caso e nos diferentes órgãos afetados. Utilizaram-se também técnicas histoquímicas como a impregnação pela prata de Grocott (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS), azul Alciano (AA), mucicarmina de Mayer (MM) e Fontana-Masson (FM). As imagens e as dimensões das leveduras (incluindo a célula da levedura, a espessura da cápsula e o diâmetro total da levedura) foram obtidas através de um microscópio Olympus BX51, com câmera digital DP21, controlada pelo programa Olympus CellSens®.

RESULTADOS

A epidemiologia, os sinais clínicos e o desfecho dos casos analisados encontram-se no Quadro 1 e a localização das lesões e as alterações macroscópicas observadas nas necropsias e nos tecidos obtidos de biópsias encontram-se no Quadro 2. Dos sete casos estudados, somente em dois (Felinos 1 e 3) houve suspeita clínica de criptococose. No Felino 1 foi enviado material para cultura micológica, sendo cultivado *Cryptococcus neoformans*. Nos demais casos não houve suspeita clínica de criptococose e o diagnóstico definitivo foi realizado com base nas alterações histológicas, pela demonstração do agente e de suas características através de diversas técnicas histoquímicas.

Quadro 1. Dados epidemiológicos, sinais clínicos e desfecho de casos de criptococose em caninos e felinos

Espécie	Animal (n°)	Raça	Sexo	Idade (anos)	Sinais clínicos	Desfecho
Felina	1*	SRD	M	2	Linfadenopatia submandibular bilateral, disfagia e dispneia	EUT
	2	Persa	F	5	Tosse	ME
	3	SRD	F	1,7	Emagrecimento acentuado	ME
	4	SRD	F	NI	Anorexia, abdômen abaulado, sinais neurológicos	ME
	5	SRD	M	2	Lesão no dígito do membro pélvico esquerdo	NI
	6	SRD	M	NI	Feridas ulceradas em cabeça, pescoço, região periorbital, comissura labial e membros	NI
Canina	1	Labrador	M	1	Anorexia, incoordenação motora e cegueira	ME

* Foi isolado *Cryptococcus neoformans* na cultura micológica dos linfonodos; SRD = sem raça definida; M = macho; F = fêmea; NI = não informado. ME = morte espontânea; EUT = eutanásia.

Na coloração de HE as leveduras de *Cryptococcus* sp. estavam associadas a infiltrado inflamatório constituído predominantemente por macrófagos (com citoplasma abundante), linfócitos e plasmócitos. A intensidade da reação inflamatória variou conforme o tecido analisado. Resumidamente, na pele a reação foi moderada a acentuada, na faringe acentuada, nos linfonodos leve a acentuada, no rim, no encéfalo e no cerebelo variou de ausente a moderada, nos pulmões foi leve e no fígado ausente.

Nos casos em que havia acentuada reação inflamatória as leveduras podiam ser visualizadas principalmente no citoplasma de macrófagos e raramente livres no tecido. No citoplasma de macrófagos as leveduras ocorreram de forma única ou em grupos. Em casos com reação inflamatória leve as leveduras eram observadas formando aglomerados que, por

vezes, eram circundados por escasso infiltrado inflamatório linfo-histiocítico. Em lesões cutâneas ulceradas, além do infiltrado linfo-histiocítico, havia moderado infiltrado inflamatório neutrofílico subjacente às úlceras.

Quadro 2. Localização e macroscopia das lesões em casos de criptococose em animais de companhia.

Espécie	Animal (n ^o)	Localização das lesões	Macroscopia
Felina	1	Linfonodos, palato mole e faringe	Massas branco-acinzentadas
	2	Coração, linfonodos, baço, pulmão, língua, fígado, rim e cerebelo	Linfadenomegalia com superfície esbranquiçada, exsudato fibrino-purulento nos seios nasais, pulmões consolidados e pálidos. Úlceras no palato mole e nódulos na língua. Nódulos esbranquiçados nos rins.
	3	Pele, fígado, baço, pulmão, encéfalo e linfonodos	Nódulos ulcerados na pele da cabeça, membros e regiões torácica e abdominal. Linfadenomegalia com superfície esbranquiçada.
	4	Rim e pulmão	Áreas esbranquiçadas e circulares no rim
	5	Pele	Sem descrição
	6	Pele	Pele hirsuta com crostas
Canina	1	Encéfalo	Sem alteração

Quadro 3. Tamanho e propriedades histoquímicas das leveduras em casos de criptococose em animais de companhia.

Espécie/N ^o	Levedura*	Diâmetro (µm)	Célula	Histoquímica											
				HE		AA		MM		PAS		GMS		FM	
				CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA	CE	CA
Felina	1	5,50 - 7,82	2,00 - 4,64	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
	2	5,99 - 34,16	2,22 - 5,23	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
	3	6,72 - 21,11	2,55 - 5,23	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
	4	16,33 - 23,70	4,78 - 10,00	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-
	5	5,19 - 7,58	2,64 - 3,71	+	-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
	6	4,17 - 18,95	2,16 - 8,67	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-
Canina	1	13,77 - 22,98	1,67 - 7,28	+	+/-	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-

*Compreende célula + cápsula polissacarídica. CE: célula da levedura; CA: cápsula da levedura; HE: hematoxilina e eosina; AA: azul Alciano; MM: mucicarmina de Mayer; PAS: ácido periódico de Schiff; GMS: Grocott; FM: Fontana-Masson; (+): positiva; (+/-): raras estruturas fracamente positivas; (-): negativas.

O aspecto morfológico característico e as propriedades tintoriais padrão estão ilustrados na Figura 1 (A-F). As leveduras de *Cryptococcus* sp. eram arredondadas, compostas por um halo claro, que geralmente não corou pela HE (cápsula da levedura), circundando uma estrutura levemente basofílica, que era redonda, levemente alongada ou, às vezes, em forma de foice (célula da levedura). No interior de algumas células era possível observar material granular, por vezes arredondado, levemente eosinofílico (núcleo da célula

da levedura). As cápsulas das leveduras tinham diferentes espessuras e, por não corarem, conferiam ao tecido um aspecto vacuolizado, conhecido como “lesão em bolha de sabão” (Fig.1A).

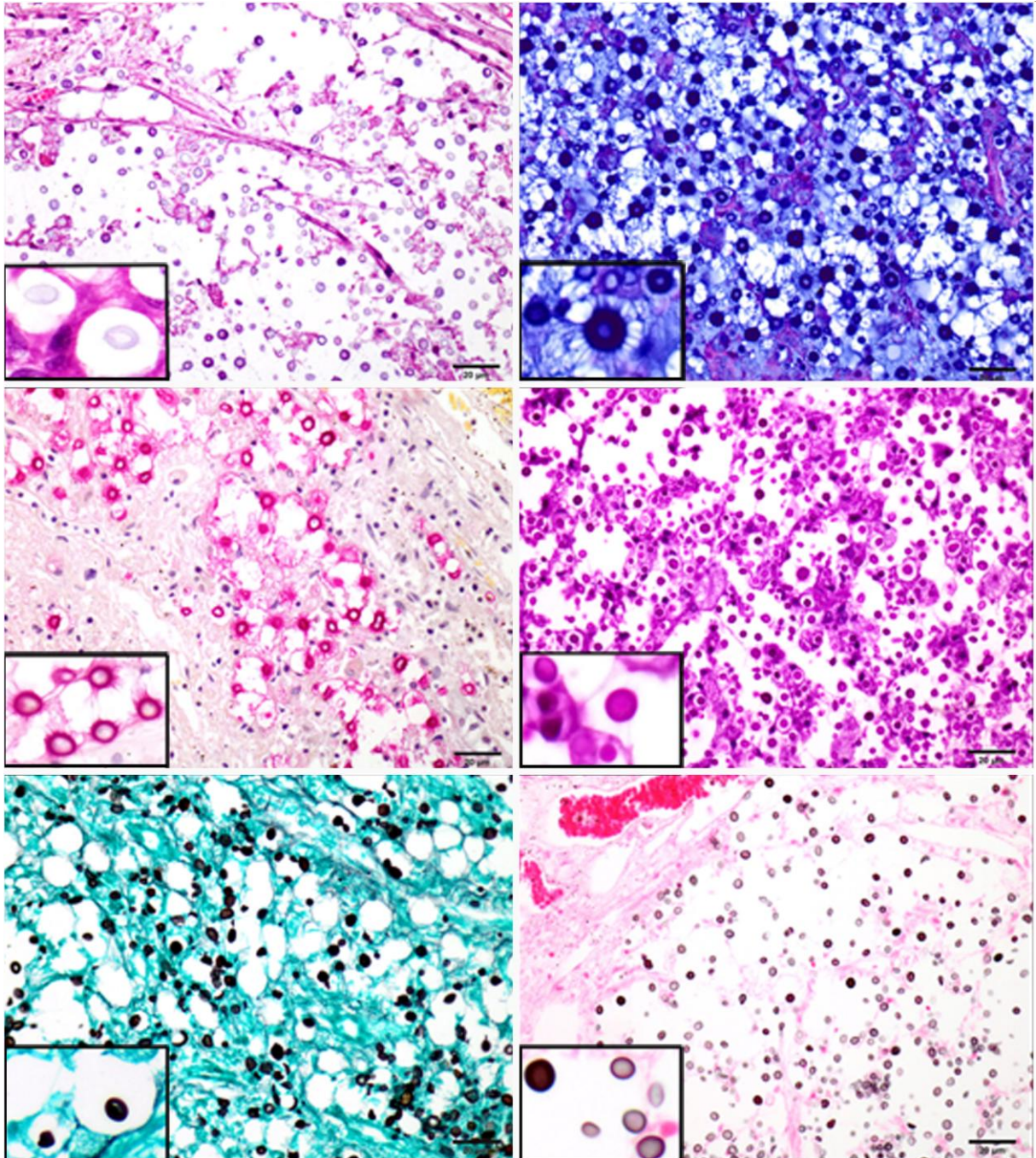


Fig.1. Criptococose em caninos e felinos. (A) Leveduras de *Cryptococcus* sp. arredondadas com célula central circundada por uma cápsula que não se cora, conferindo ao tecido um aspecto de “lesão em bolha de sabão”. No detalhe a célula da levedura levemente basofílica circundada por uma cápsula espessa não corada (hematoxilina e eosina). (B) Leveduras fortemente coradas em azul. No detalhe a levedura apresentou cápsula com aspecto radiado externamente e parede fortemente corada (azul Alciano). (C) Leveduras fortemente coradas em vermelho. No detalhe a levedura apresentou cápsula com aspecto

radiado externamente e parede fortemente corada (mucicarmina de Mayer). Somente as células das leveduras coraram fortemente nas colorações do ácido periódico de Schiff (**D**), Grocott (**E**) e Fontana-Masson (**F**). Barra = 20 μ m.

O tamanho das leveduras de *Cryptococcus* sp. e as propriedades histoquímicas do fungo estão resumidos no Quadro 3. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10 μ m. A espessura da parede celular variou de 0,17 a 1,18 μ m.

A cápsula das leveduras foi evidenciada pelas técnicas histoquímicas de AA e MM. Na coloração de AA, a cápsula apresentava-se fortemente azulada e com aspecto radiado (Fig.1B). A espessura da cápsula apresentou variações de acordo com a localização da levedura no tecido em alguns casos. A cápsula era mais delgada em leveduras visualizadas no citoplasma de macrófagos (variando de 0,94 a 7,41 μ m), enquanto que leveduras livres nos tecidos apresentavam cápsulas mais abundantes (1,87 a 11,34 μ m). O diâmetro total das leveduras (incluindo a cápsula) variou de 4,17 a 34,16 μ m. Além da cápsula, a parede das células das leveduras era, muitas vezes, fortemente corada por essas duas técnicas. Raras leveduras não apresentavam coloração na cápsula pelo AA e pelo MM e a parede apresentava-se levemente azulada no AA. Pela MM a cápsula apresentou aspecto radiado, semelhante ao descrito no AA (Fig.1C). Em algumas leveduras as células eram circundadas por material levemente avermelhado e a parede das células era fortemente corada.

As cápsulas de raras leveduras coraram-se levemente na coloração de HE (Felinos 2, 4, 6 e Canino 1) e apresentaram aspecto levemente radiado basofílico (Fig.2A). No PAS (Felinos 2, 5, 6 e Canino 1) a cápsula de poucas leveduras apresentou aspecto radiado com coloração rósea (Fig.2B).

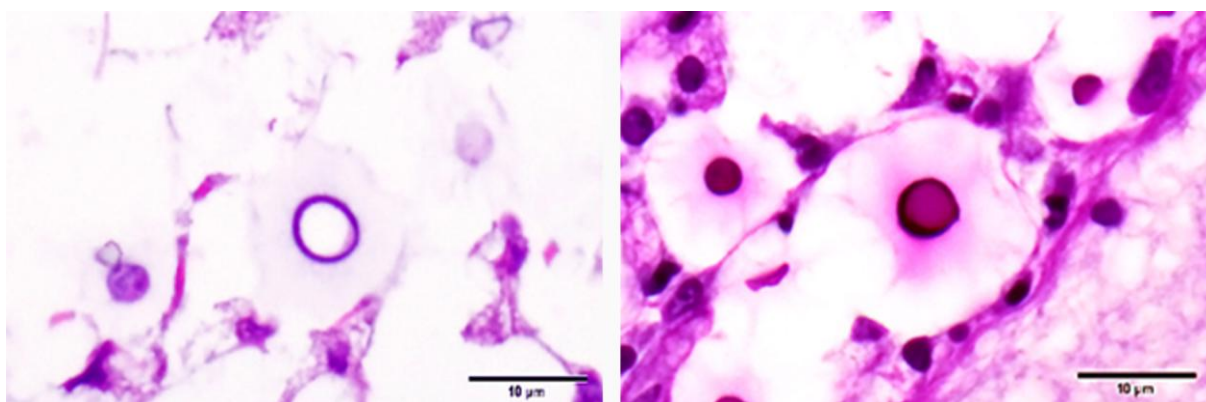


Fig.2. Criptococose em caninos e felinos. Levedura de *Cryptococcus* apresentou (A) leve coloração basofílica radiada na cápsula na coloração de hematoxilina e eosina e (B) rósea na coloração de ácido periódico de Schiff. Barra = 10 μ m.

As células das leveduras coraram fortemente pelo PAS e foram fortemente impregnadas pela prata no GMS. No PAS, a parede das células era fortemente positiva, apresentando coloração rósea com bordos levemente mais corados (Fig.1D). Em algumas leveduras era possível observar núcleos no interior das células..

Os brotamentos foram melhor visualizados no PAS do que no HE e ocorreram em base estreita, principalmente de forma única, mas também múltipla, em polos opostos das células das leveduras ou formando cadeias (Fig.3A-D). No GMS apenas a parede da célula das leveduras apresentou forte impregnação enegrecida (Fig.1E). Não foram observadas diferenças tintoriais entre as células de tamanho grande e pequeno ou com cápsula (não corada) abundante ou escassa.

Na coloração de FM, todos os casos apresentaram forte evidência da melanina na parede das células das leveduras (Fig.1F). A intensidade da coloração variou de marrom-acinzentada a enegrecida. Independentemente do tamanho das células e da quantidade de cápsula, todas as paredes foram positivas para melanina.

Além de permitirem uma melhor visualização dos componentes estruturais das leveduras, sejam eles a cápsula ou a célula, as colorações de PAS, GMS, AA, MM e FM facilitaram a visualização da invasão/disseminação do agente em diversos órgãos e tecidos.

Em três casos foram observadas alterações nos aspectos morfológicos e histoquímicos padrão das leveduras. Em dois casos com lesões cutâneas (Felinos 5 e 6) as leveduras apresentavam uma grande quantidade de células pequenas (“células filhas”), com diâmetro que variou de 1,03 a 2,27 μ m. As células filhas eram visualizadas no interior do mesmo halo da célula mãe e muitas vezes eram visualizadas mais de uma célula filha. Nesses dois casos, a grande maioria das leveduras estava no citoplasma de macrófagos, eram eosinofílicas e tinham núcleos abundantes, que, por vezes, ocupavam quase toda a célula (Fig.4A). No AA e na MM essas leveduras apresentavam pouca cápsula e parede fortemente corada (Fig.4B). A parede das células filhas também era positiva no PAS, no GMS e no FM.

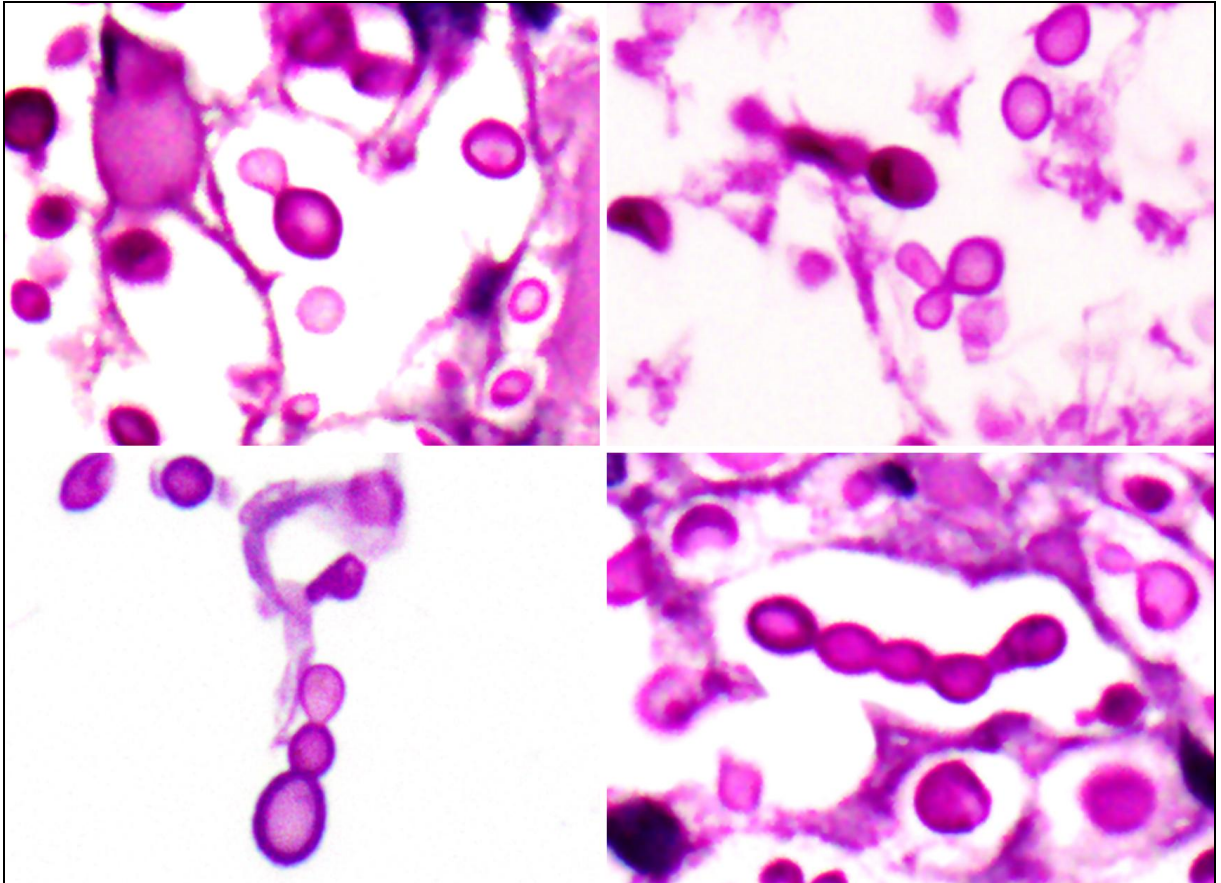


Fig.3. Criptococose em caninos e felinos. (A) Observa-se brotamento único em base estreita. (B) Uma célula com dois brotamentos. (C,D) Brotamentos em base estreita formando uma cadeia (ácido periódico de Schiff).

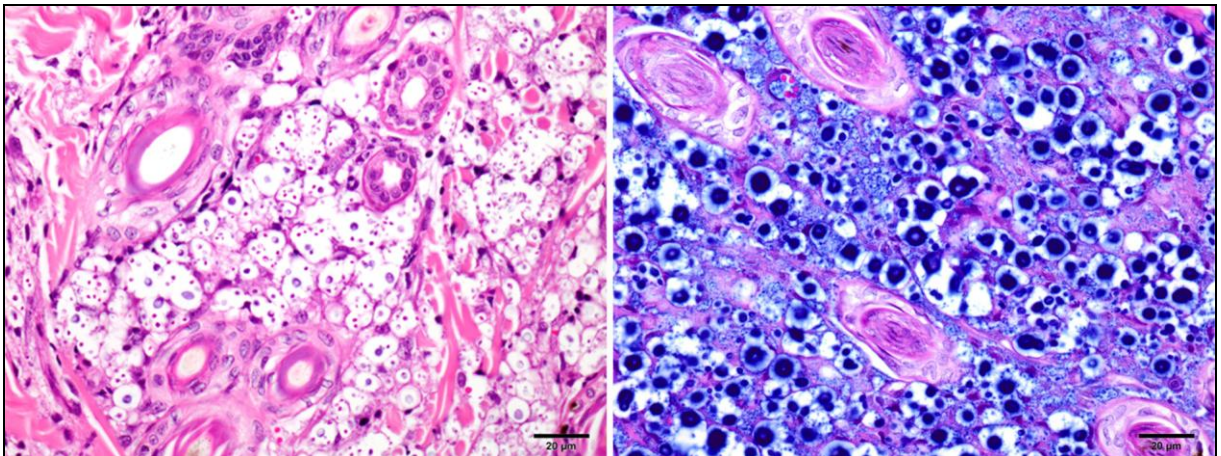


Fig.4. Criptococose cutânea em felinos. (A) Numerosas “células filhas” (células menores) próximas de uma “célula mãe” (células maiores) (hematoxilina e eosina). (B) A cápsula e a parede das células filhas e das células mães coraram-se fortemente na coloração de azul Alciano. Barra = 20µm.

Em um caso com envolvimento pulmonar (Felino 2), algumas leveduras localizadas em áreas de hemorragia apresentaram-se com células grandes de parede acentuadamente espessa e eosinofílica (Fig.5A). Em algumas era possível identificar três padrões de coloração: um halo interno levemente basofílico, seguido de uma camada fortemente eosinofílica e bordos basofílicos a anfofílicos. A espessura da parede variou de 0,66 a 3,06 μ m. Nas colorações de AA e MM essas leveduras apresentavam cápsula fortemente corada (Fig.5B) e a parede espessa apenas corada pela contracoloração. No PAS a parede apresentou halo central intensamente corado circundado por uma camada levemente violácea. No GMS e no FM apenas a célula apresentou-se enegrecida e a camada circundante corou-se apenas com as contracolorações de cada técnica (verde e rosa, respectivamente) (Fig.5C,D). Nas áreas adjacentes à hemorragia nos pulmões e nos demais órgãos não foi observado esse espessamento da parede da célula.

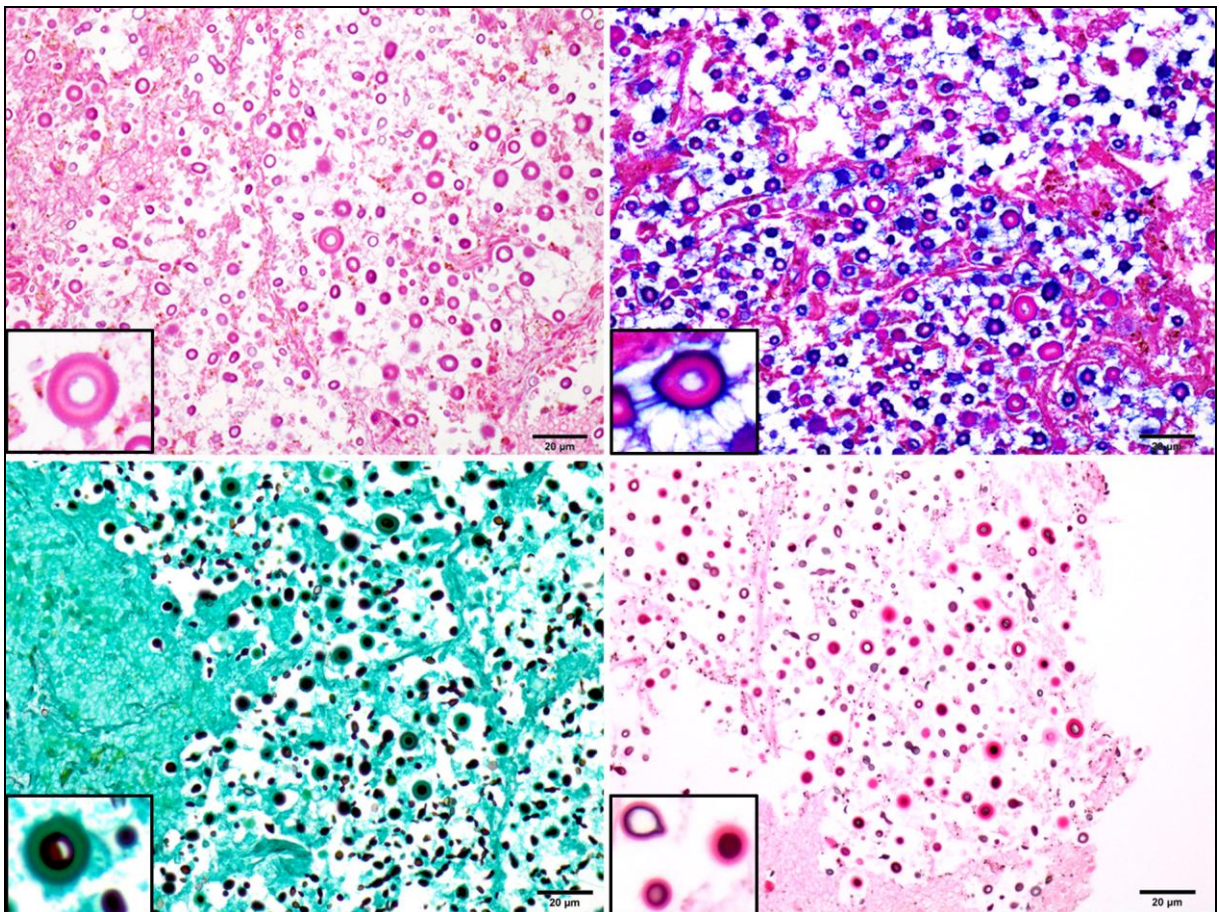


Fig.5. Criptococose pulmonar em um felino. (A) Leveduras apresentaram acentuado espessamento da parede da célula. No detalhe a parede da célula foi fortemente eosinofílica (hematoxilina e eosina). (B) Na coloração de azul Alciano, o espessamento da parede da célula apresentou apenas a contracoloração enquanto a cápsula está fortemente corada. (C). Nas colorações de Grocott e (D) Fontana-Masson apenas a célula apresentou-se enegrecida

enquanto que a camada circundante corou-se apenas com as respectivas contracolorações. Barra = 20µm.

DISCUSSÃO

A dificuldade na formulação de um diagnóstico presuntivo de criptococose pode estar diretamente associada à diversidade na sua apresentação clínica e na distribuição das lesões (Faria & Xavier 2009), como visto nos casos aqui estudados. Na maioria desses casos os sinais clínicos foram inespecíficos e não permitiram um direcionamento no diagnóstico. Os achados macroscópicos, bem como a distribuição das lesões em diversos órgãos, muitas vezes mimetizaram alterações neoplásicas, dificultando o diagnóstico presuntivo de criptococose. O diagnóstico definitivo foi realizado com base nas alterações histopatológicas em seis dos sete casos, pois somente em um gato foi realizada a cultura micológica. Situação semelhante tem sido descrita por outros autores em infecções micóticas que, muitas vezes, não apresentam alterações clínicas características que permitam um diagnóstico presuntivo (Kaufman 1992, Jensen et al. 1996), seguido da ausência de cultura micológica, que é a técnica padrão-ouro (Lima et al. 1977), e que permite a identificação definitiva do agente etiológico. Conseqüentemente, o agente causal de doenças micóticas (e oomicóticas) pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico dos tecidos afetados (Jensen et al. 1996). Nesses casos, nos quais não é possível a cultura e a identificação do fungo, o reconhecimento das características morfológicas e histoquímicas das leveduras de *Cryptococcus* spp. são as principais ferramentas de diagnóstico (Guarner & Brandt 2011). Neste estudo, essas características morfológicas e histoquímicas das leveduras foram semelhantes nos casos sem cultura e no caso com cultura bem sucedida.

No exame histopatológico, o padrão morfológico do fungo observado neste estudo foi semelhante ao descrito por outros autores (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Guarner & Brandt 2011). Em todos os casos as leveduras apresentavam uma célula central, com presença de um núcleo, circundada por uma cápsula espessa (polissacarídica) que geralmente não se corava pelo HE. Esse padrão morfológico das leveduras de *Cryptococcus* spp. tem sido descrito como característico por diversos autores (Bose et al. 2003, McFadden et al. 2006, Okagaki et al. 2010, Guarner & Brandt 2011, Kronstad et al. 2011).

Variações no tamanho da célula das leveduras, na espessura da cápsula e no diâmetro total das leveduras podem ser associadas à infecção por sorotipos diferentes. Estudos realizados em casos de criptococose humana e infecções experimentais em animais têm também demonstrado variações na espessura da cápsula, na parede e no diâmetro da célula

das leveduras de acordo com o órgão analisado e o tempo de infecção (Feldmesser et al. 2001, Del Poeta 2004, Charlier et al. 2005, Xie et al. 2012). Diversos autores têm sugerido que o espessamento da cápsula ocorre principalmente em leveduras maduras devido à adição de novos polissacarídeos e nanoproteínas à estrutura pré-existente (Charlier et al. 2005, McFadden et al. 2006). Apesar de haver variação na espessura da cápsula das leveduras nos casos de criptococose deste estudo, não foram observadas leveduras totalmente sem cápsula. Em alguns pacientes humanos as leveduras de *Cryptococcus* spp. podem apresentar-se pouco (Guarner & Brandt 2011) ou não encapsuladas (Gazzoni et al. 2008), tornando-as semelhantes a *Candida* spp. ou *Histoplasma* spp. A coloração positiva para melanina identifica que as leveduras são de *Cryptococcus* spp. em situações como essa (Guarner & Brandt 2011).

O tamanho das leveduras variou de acordo com a sua localização. Leveduras menores foram observadas, na sua grande maioria, no interior de macrófagos, enquanto que leveduras maiores eram visualizadas principalmente livres no parênquima dos órgãos. Essa diferença na localização entre leveduras pequenas e grandes pode estar relacionada principalmente com relação à abundância de cápsula, tamanho da célula ou localização da levedura em determinados órgãos. Estudos têm demonstrado que leveduras menores e com pouca cápsula foram observadas principalmente no interior de macrófagos devido à facilidade de opsonização e formação de fagolisossomas no interior de macrófagos (Xie et al. 2012), enquanto que leveduras grandes, com cápsula abundante, eram observadas principalmente livres nos tecidos (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010).

A variação no tamanho da célula das leveduras é um achado constante nas infecções em humanos e em animais (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010, Xie et al. 2012). No entanto, neste estudo não foram observadas leveduras com células de tamanho gigante (denominadas “células titãs”), como descritas em alguns casos de criptococose com envolvimento pulmonar (em humanos e camundongos), as quais podem atingir até 100µm de diâmetro (Feldmesser et al. 2001, Okagaki et al. 2010).

Os brotamentos das leveduras, na sua maioria, apresentavam características morfológicas semelhantes às descritas por outros autores (McFadden et al. 2006, Guarner & Brandt 2011). No entanto, variações na quantidade de brotamentos e no ponto de origem na célula foram observadas em alguns casos. Em casos com brotamentos múltiplos, dando um aspecto em cadeia às leveduras, é fundamental realizar a diferenciação entre esse tipo de brotamento e infecções por fungos que podem apresentar-se como leveduras ou estruturas filamentosas nos tecidos, como *Candida* spp. (Guarner & Brandt 2011). *Cryptococcus* spp. apresentam forma filamentosa quando localizados no meio ambiente ou em condições

especiais de cultura, associada à fase de reprodução sexuada (Bovers et al. 2008, Kronstad et al. 2011).

A abundância de células filhas observada nos casos de envolvimento cutâneo em felinos pode estar associada ao local primário da infecção e ao período inicial de multiplicação do agente no tecido. Casos de leveduras com grande quantidade de células filhas pequenas não podem ser confundidos com o estágio de reprodução baseados na formação de micélios com basidiósporos, tendo em vista que essa forma de reprodução sexuada só tem sido descrita no meio ambiente e em condições especiais de laboratório (Kronstad et al. 2011), não existindo relatos da forma sexuada de reprodução da levedura de *Cryptococcus* spp. em tecidos infectados.

As propriedades histoquímicas das leveduras de *Cryptococcus* spp. foram conforme descritas na literatura (Malik et al. 2006, Faria & Xavier 2009, Guarner & Brandt 2011). No entanto, em alguns casos ocorreu leve coloração radiada da cápsula nas técnicas de HE e PAS; isso sugere que alguns componentes da parede da célula da levedura podem também estar presentes na cápsula em menores quantidades. Situação semelhante também foi observada em todos os casos utilizando-se AA e MM, que coram fortemente a cápsula e a parede da célula das leveduras, reforçando uma possível semelhança de alguns componentes presentes nessas duas estruturas. Estudos com leveduras mutantes, com alterações nos componentes da parede celular, principalmente glucagon, têm resultado em células com paredes defeituosas e sem cápsula, indicando possível associação necessária da cápsula com a parede, embora ainda não se saiba se essa interação é direta ou indireta através de outro componente celular (Doering 2009).

Em um caso de infecção pulmonar em um felino observou-se, pelo HE, um espessamento eosinofílico circundando a parede da célula, com características morfológicas semelhantes às descritas por Xie et al. (2012) em infecções de humanos. Diferentemente desses autores, que propõem espessamento da cápsula, através das técnicas histoquímicas evidenciou-se que o espessamento era na verdade na parede, tendo em vista que, nas colorações específicas para a cápsula, o espessamento corou-se apenas pela coloração de fundo.

CONCLUSÃO

O diagnóstico etiológico da criptococose em cães e gatos pode ser realizado através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia específica do agente e em suas características histoquímicas típicas, principalmente naqueles casos em que a cultura micológica não está

disponível. Para isso é necessário o conhecimento do padrão morfológico e histoquímico da infecção por *Cryptococcus* spp., assim como suas variações morfológicas e histoquímicas nos tecidos afetados. A presença da cápsula polissacarídica e a produção de melanina diferenciam esse agente de outros fungos leveduriformes que afetam animais domésticos.

Agradecimentos.- G.J.N. Galiza e C. Tochetto (doutorado), T.M. Silva e R.A. Caprioli (iniciação científica - PIBIC) são bolsistas do CNPq. F.B. Rosa (doutorado) é bolsista da CAPES. G.D. Kommers é bolsista de Produtividade do CNPq (PQ-2). O projeto é financiado pelo CNPq - Edital Universal (Proc. 474839/2012-5).

REFERÊNCIAS

- Bose I., Reese A.J., Ory J.J., Janbon G. & Doering T.L. 2003. A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 2(4):655-663.
- Bovers M., Hagen F. & Boekhout T. 2008. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revta Iberoam. Micol.* 25:S4-S12.
- Charlier C., Chrétien F., Baudrimont M., Mordelet E., Lortholary O. & Dromer F. 2005. Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier. *Am. J. Pathol.* 166(2):421-432.
- Castellá G., Abarca M.L. & Cabañes F.J. 2008. Criptococosis y animales de compañía. *Revta Iberoam. Micol.* 225:S19-S24.
- Caswell J.L. & Williams K.J. 2007. Infectious diseases of the respiratory system, p. 579-650. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Côrrea M.P.S.C., Oliveira E.C., Duarte R.R.B.S, Pardal P.P.O., Oliveira F.M. & Severo L.C. 1999. Criptococose em crianças no Estado do Pará, Brasil. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 332(5):505-508.
- Datta K., Bartlett K.H., Baer R., Bynes E., Galanis E., Heitman J., Hoang L., Leslie M.J., MacDougall L., Magill S.S., Morshed M.G. & Marr K.A. 2009. Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest Region of the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15(8):1185-1191.
- Del Poeta M. 2004. Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* 3(5):1067-1075.
- Doering T.L. 2009. How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu. Rev. Microbiol.* 63:223-247.

- Duncan C., Stephen C. & Campbell J. 2006. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. *Can. Vet. J.* 47:993-998.
- Farias R.O. & Xavier M.O. 2009. Criptococose, p.191-203. In: Meireles M.C.A. & Nascente P.S. (Eds), *Micologia Veterinária*. Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, RS.
- Feldmesser M., Kress Y. & Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiol.* 147:2355-2365.
- Fortes S.T., Lazéra M.S., Nishikawa M.M., Macedo R.C.L. & Wanke B. 2001. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 44:137-140.
- Gazzoni A.F., Pegas K.L. & Severo L.C. 2008. Técnicas histopatológicas no diagnóstico de criptococose por *Cryptococcus* deficientes de cápsula: relato de caso. *Revta Soc. Bras. Med. Trop.* 41(1):76-78.
- Guarner J. & Brandt M. 2011. Histopathologic Diagnosis of Fungal Infections in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(2):247-280
- Jensen H.E., Schønheyder HC, Hotchi M & Kaufman L. 1996. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. *Acta Pathol., Microbiol. Immunol. Scand.* 104(4):241-258.
- Kaufman L. 1992. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. *Eur. J. Epidemiol.* 8(3):377-382.
- Kommers G.D., Souza T.M., Souto M.A.M., LaCorte, F.D. & Barros C.S.L. 2005. Criptococose pulmonar granulomatosa em um equino. *Cienc. Rural* 35(4):938-940.
- Kozel T.R. 1995. Virulence factors of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 3(8):295-298.
- Kronstad J.W., Attarian R., Cadieux B., Choi J., D'Souza C.A., Geddes J.M.H., Hu G., Jung W.H., Kretschmer M., Salkia S. & Wang J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic Box. *Nature* 9:193-203.
- Lima A.O., Soares J.B., Greco J.B., Galizi J. & Cançado J.R. 1977. *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica*. 5^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- MacDougall L., Kidd S.E., Galanis E., Mak S., Leslie M.J., Cieslak P.R., Kronstad J.W., Morshed M.G. & Bartlett K. 2007. Spread of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and detection in the Pacific Northwest, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 13(1):42-50.

- Malik R., Krockenberger M., O'Brien C.R., Martin P., Wigney D. & Medleau L. 2006. Cryptococcosis, p.584-598. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd ed. Saunders Elsevier, St Louis.
- Martins D.B., Barbosa A.L.T., Cavalheiro A., Lopes S.T.A., Santurio J.M., Schossler J.E. & Mazzanti C. 2008. Diagnóstico de criptococose canina pela citologia por agulha fina. *Cienc. Rural* 38(3):826-829.
- Martins D.B., Zanette R.A., França R.T., Howes F., Azevedo M.I., Botton S.A., Mazzanti C., Lopes S.T.A. & Santurio J.M. 2010. Massive cryptococcal disseminated infection in an immunocompetent cat. *Vet. Dermatol.* 22:232-234.
- McFadden D., Zaragoza O. & Casadevall A. 2006. The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 14(11):497-505.
- McGill S., Malik R., Saul N., Beetson S., Secombe C., Robertson I. & Irwin P. 2009. Cryptococcosis in domestic animals in Western Australia: a retrospective study from 1995-2006. *Med. Mycol.* 47:625-639.
- Montenegro H. & Paula C.R. 2000. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Med. Mycol.* 38:385-390.
- Pappalardo M.C.S.M. & Melhem M.S.C. 2003. Cryptococcosis: A review of the Brazilian experience for the disease. *Revta Inst. Med. Trop. São Paulo* 45(6):299-305.
- Okagaki L.H., Strain A.K., Nielsen J.N., Charlier C., Baltes N.J., Chrétien F., Heitman J., Dromer F. & Nielsen K. 2010 Cryptococcal Cell Morphology Affects Host Cell Interactions and Pathogenicity. *Plos Pathogens* 6(6):1-15.
- Riet-Correa F., Krockenberger M., Dantas A.F.M. & Oliveira D.M. 2011. Bovine cryptococcal meningoencephalitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 23(5):1056-1060.
- Rodrigues M.L., Alviano C. & Travassos L.R. 1999. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. *Microbes Infect.* 1(4):293-301.
- Severo L.C., Oliveira F.M. & Londero A.T. 1999. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of three cases. *Revta Iberoam. Micol.* 16:152-154.
- Sorrel T.C. 2001. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *Med. Mycol.* 39:155-168.
- Steenbergen J.N. & Casadevall A. 2003. The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbes Infect.* 5:667-675.

Xie S., Saob R., Brauna A. & Bottonea E.J. 2012. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 73:49-52.

4 ARTIGO 3- Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais

Glauco J.N. Galiza, Camila Tochetto, Fabio B. Rosa, Welden
Panziera, Taiara M. da Silva, Rafaela A. Caprioli, Glaucia D.
Kommers

(Artigo a ser submetido para a revista **Pesquisa Veterinária
Brasileira**)

Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais¹⁵

Glauco J.N. Galiza¹⁶, Camila Tochetto², Fábio B. Rosa², Welden Panziera², Taiara M. da Silva¹⁷, Rafaela A. Caprioli³, Glaucia D. Kommers^{18*}

ABSTRACT.- Galiza G.J.N., Tochetto C., Rosa F.B., Panziera W., Silva T.M., Caprioli R.A., Lovato M. & Kommers G.D. 2013. [**Utilization of three immunohistochemical methods in the detection of aspergillosis and zygomycosis in animals**]. Utilização de três métodos imuno-histoquímicos na detecção de aspergilose e zigomicose em animais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: glaukommers@yahoo.com

Aiming to optimize the use of the immunohistochemical technique (IHC) in the detection of *Aspergillus* spp. and zygomycetes, two fungal-specific monoclonal antibodies were utilized in tissue fragments (formalin-fixed paraffin-embedded), previously diagnosed as aspergillosis or zygomycosis. Tissues were submitted to three different detection systems (two biotinilated and one nonbiotinilated). Both antibodies showed high specificity and sensitivity in the examined tissues. No cross-reactions were observed between the antibodies utilized and the agents evaluated (including cases of aspergillosis, zygomycosis, candidiasis and pythiosis). However, nonspecific reactions in hyphae were observed in some cases, but were eliminated by mean of one of the detection systems used. In the aspergylloses cases, with the streptavidin-biotin-alkaline phosphatase method, nonspecific reactions were not observed. In the zygomycoses cases, nonspecific reactions did not occur utilizing the polymer. The IHC technique showed to be a useful tool detecting and confirming aspergillosis and zygomycosis in this retrospective study.

¹⁵ Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor.

¹⁶ Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil

¹⁷ Curso de Medicina Veterinária, CCR-UFSM, Santa Maria, RS.

¹⁸ Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.*
Autor para correspondência: glaukommers@yahoo.com

INDEX TERMS: Immunohistochemistry, mycoses, cross-reactions, nonspecific reactions.

RESUMO.- Visando a otimização do uso da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) na detecção de *Aspergillus* spp. e zigomicetos, utilizaram-se dois anticorpos monoclonais fungo-específicos em fragmentos de tecidos de animais (fixados em formol e embebidos em parafina) com diagnóstico histomorfológico prévio de aspergilose e zigomicose, os quais foram submetidos a três sistemas de detecção diferentes (dois biotinizados e um não biotinizado). Os dois anticorpos apresentaram alta especificidade e sensibilidade nos tecidos examinados. Não ocorreram reações cruzadas entre os anticorpos utilizados e os agentes etiológicos avaliados (incluindo casos de aspergilose, zigomicose, candidíase e pitiose). No entanto, reações inespecíficas foram observadas nas hifas em alguns casos, as quais puderam ser eliminadas através de um dos métodos de detecção utilizados. Para a aspergilose, o método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina não apresentou reações inespecíficas nas hifas. Enquanto que nos casos de zigomicoses, as reações inespecíficas não ocorreram no método por polímero. A técnica de IHQ mostrou-se uma ferramenta muito útil na detecção e confirmação dos casos de aspergilose e zigomicose neste estudo retrospectivo.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Imuno-histoquímica, micoses, reações cruzadas, reações inespecíficas.

INTRODUÇÃO

Na rotina em patologia veterinária, frequentemente agentes fúngicos são detectados somente durante o exame histopatológico, quando as amostras já estão fixadas em formol e não há possibilidade de envio para exames micológicos para a cultura e identificação do agente específico (Jensen et al. 1996a).

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é frequentemente utilizada para o estudo de doenças infecciosas e neoplásicas em animais (Ramos-Vara & Beissenherz 2000). A IHQ tem demonstrado ser uma ferramenta auxiliar no diagnóstico dessas condições devido a sua alta especificidade e sensibilidade (Eyzaguirre & Haque 2008, Ramos-Vara et al. 2008, Ramos-Vara et al. 2014). A IHQ tem sido utilizada para detectar e identificar vários elementos fúngicos em tecidos fixados em formol, promovendo uma identificação específica do agente etiológico (Jensen et al. 1996b, Verweij et al. 1996, Eyzaguirre & Haque 2008).

Para que haja uma otimização do uso da técnica de IHQ na detecção de micoses, na medida em que novos anticorpos fungo-específicos vão sendo disponibilizados, tornam-se

necessários estudos onde várias amostras fixadas em formol e embebidas em parafina sejam utilizadas, vários métodos imuno-histoquímicos sejam testados e onde haja uma associação compatível entre os achados da IHQ e a histopatologia. Alguns desses estudos têm sido publicados (Jensen et al., 1994; Rocha et al., 1998; Choi et al., 2004; Schuetz & Cohen, 2009) e são de grande valor no aprimoramento do uso da IHQ para detecção e identificação de fungos na rotina em patologia veterinária.

Este estudo teve como objetivo utilizar a técnica de IHQ em casos de aspergilose e zigomicose, previamente diagnosticados no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), visando caracterizar as melhores condições imuno-histoquímicas para a detecção específica dos agentes etiológicos nos tecidos testados.

MATERIAL E MÉTODOS

Casos de aspergilose (oito em aves e um em bovino) e zigomicose (cinco em bovinos, um em cão, um em suíno e um em ovino) foram selecionados dos arquivos do LPV-UFSM, os quais haviam sido previamente diagnosticados de acordo com a histomorfologia do agente, com as lesões macroscópicas e microscópicas e com a cultura microbiológica (esta última disponível em três casos de aspergilose em aves e um de pitiose equina). Foi então realizada a técnica de IHQ em amostras desses casos para detecção de *Aspergillus* spp. e *Rhizopus arrhizus* (ou outros zigomicetos membros da família Mucoracea, tais como *Absidia corymbifera* e *Rhizomucor pusillus*) utilizando-se os anticorpos primários monoclonais (produzidos em camundongo) anti-*Aspergillus* spp. (Clone WF-AF-1, AbD Serotec) e anti-*Rhizopus arrhizus* (Clone WSSA-RA-1, AbD Serotec), respectivamente. As seções de tecidos foram submetidas ao protocolo de IHQ descrito a seguir e de acordo com as três variações nos sistemas de detecção descritas no Quadro 1. Quando necessário, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% (2x de 10 minutos). Em todos os protocolos, o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado com caseína (leite em pó desnatado) a 5% por 30 minutos em temperatura ambiente. Como controle negativo de cada caso utilizou-se uma secção do tecido analisado incubado apenas com o diluente do anticorpo (PBST), possibilitando assim a avaliação de possíveis reações inespecíficas nas hifas. A avaliação da especificidade (ocorrência ou não de reações cruzadas) dos anticorpos primários foi realizada através da IHQ para cada anticorpo com amostras de tecidos de casos selecionados de zigomicose (quatro casos), aspergilose (três casos), candidíase (dois casos) e pitiose (um caso).

Quadro 1. Descrição dos protocolos executados para otimização dos anticorpos anti-*Rhizopus arrhizus* e anti-*Aspergillus* spp.

Ac ^a	Recuperação Antigênica	Diluição ^b	Incubação (tempo/ temperatura)	Ac secundário/amplificador	Cromógeno
Anti- <i>Rhizopus arrhizus</i>	Tris-EDTA (pH 9,0)	1:50	1h/37c°	LSAB+System HRP ^c EasyLink One ^e LSAB+System AP ^f	DAB ^{d*} DAB [*] LPR ^{g**}
Anti- <i>Aspergillus</i> spp.	Tris-EDTA (pH 9,0)	1:300	1h/37c°	LSAB+System HRP EasyLink One LSAB+System AP	DAB [*] DAB [*] LPR ^{**}

^aAc: anticorpo, ^bAnticorpo diluído em PBST (tampão salina fosfato com Tween® 20-Sigma), ^cLSAB+System HRP: anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (Dako), ^dDAB: Liquid DAB (3,3' diaminobenzidine) + Substrate-Chromogen System (Dako), ^eEasyLink One: Amplificador+Polímero HRP (Easypath), ^fLSAB+System AP: anticorpo secundário biotilado e o complexo estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina (Dako), ^gLPR: Liquid Permanent Red (Dako). *Contracorados com Hematoxilina de Harris. **Contracorados com Hematoxilina de Mayer.

RESULTADOS

Imunomarcção positiva, utilizando-se os respectivos anticorpos, foi observada em todos os casos de zigomicose e aspergilose analisados através dos três métodos imuno-histoquímicos utilizados.

Nos casos de zigomicose, os três métodos imuno-histoquímicos foram eficientes e geralmente demonstraram um padrão de imunomarcção no citoplasma das hifas. Nos métodos da estreptavidina-biotina-peroxidase e no sistema por polímero a imunomarcção foi forte em todos os casos (Figura 1A e E). O método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina apresentou imunomarcção leve ou forte (Figura 1C).

Nos protocolos utilizando-se os sistemas estreptavidina-biotina-peroxidase ou fosfatase alcalina observou-se reação inespecífica, de intensidade variada, nas hifas nos controles negativos, as quais ocorreram no citoplasma e na parede de algumas hifas (Figura 1B e D). Dos oito casos avaliados no sistema estreptavidina-biotina-peroxidase, seis apresentaram reações inespecíficas nas hifas. No método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina, cinco casos apresentaram reações inespecíficas nas hifas. No método utilizando-se um polímero não se observaram reações inespecíficas nas hifas nos controles negativos (Figura 1F).

Nos casos de aspergilose, os três métodos apresentaram imunomarcção eficiente, principalmente na parede e no citoplasma das hifas variando de moderada a forte. Nos nove casos analisados através do método da estreptavidina-biotina-peroxidase, cinco apresentaram imunomarcção forte e quatro moderada (Figura 2A). Em dois casos com imunomarcção forte também se observaram reações inespecíficas, de intensidade variada, na parede e no

citoplasma das hifas nos controles negativos (Figura 2B). Semelhantemente ao descrito no sistema estreptavidina-biotina-peroxidase, os casos analisados com polímero apresentaram imunomarcção forte (cinco) e moderada (quatro) (Figura 2E). Em dois casos com imunomarcção forte observaram-se também reações inespecíficas, de intensidade variada, no citoplasma das hifas nos controles negativos (Figura 2F). As reações inespecíficas ocorreram nos mesmos dois casos testados pelos sistemas de polímero e da estreptavidina-biotina-peroxidase.

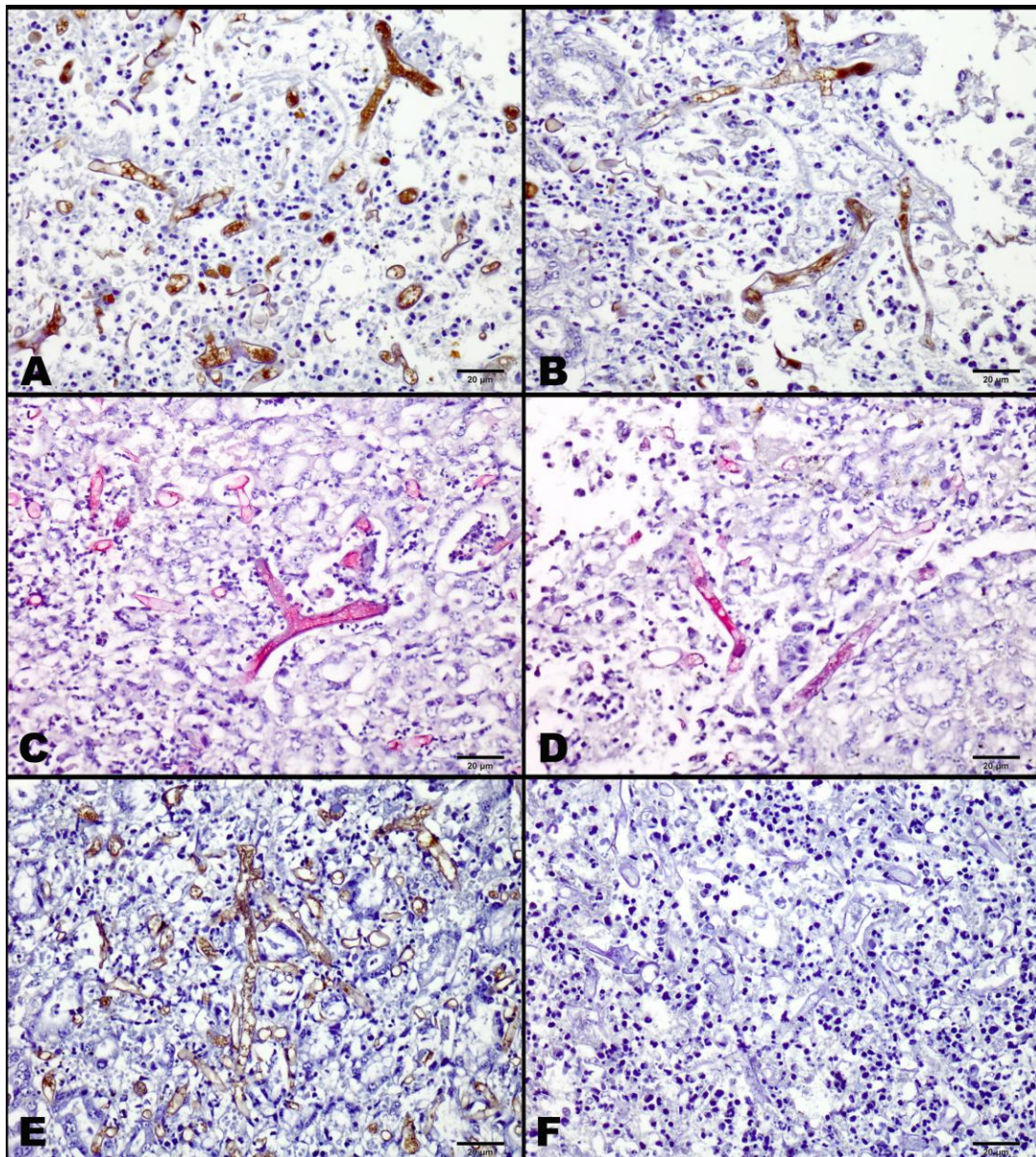


Fig. 1. Imuno-histoquímica para zigomicose. (A) Hifas fortemente imunomarcadas no citoplasma. Método da estreptavidina-biotina-peroxidase. (B) Reação inespecífica no citoplasma das hifas no controle negativo. Mesmo método da figura 1A. (C) Hifas fortemente imunomarcadas no citoplasma. Método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina. (D) Reação inespecífica no citoplasma das hifas no controle negativo. Mesmo método da figura 1C. (E) Hifas fortemente imunomarcadas no citoplasma. Método por

polímero. (F) Hifas sem reação inespecífica no controle negativo. Mesmo método da figura 1E. Barra = 20µm.

No protocolo utilizando-se o sistema estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina a imunomarcção foi forte em todos os casos, no entanto não ocorreram reações inespecíficas nas hifas dos controles negativos (Figura 2C e D). Nos casos de aspergilose em que foi possível a visualização de conidióforos nos tecidos analisados, não se evidenciou imunomarcção dessas estruturas através de nenhum dos métodos utilizados.

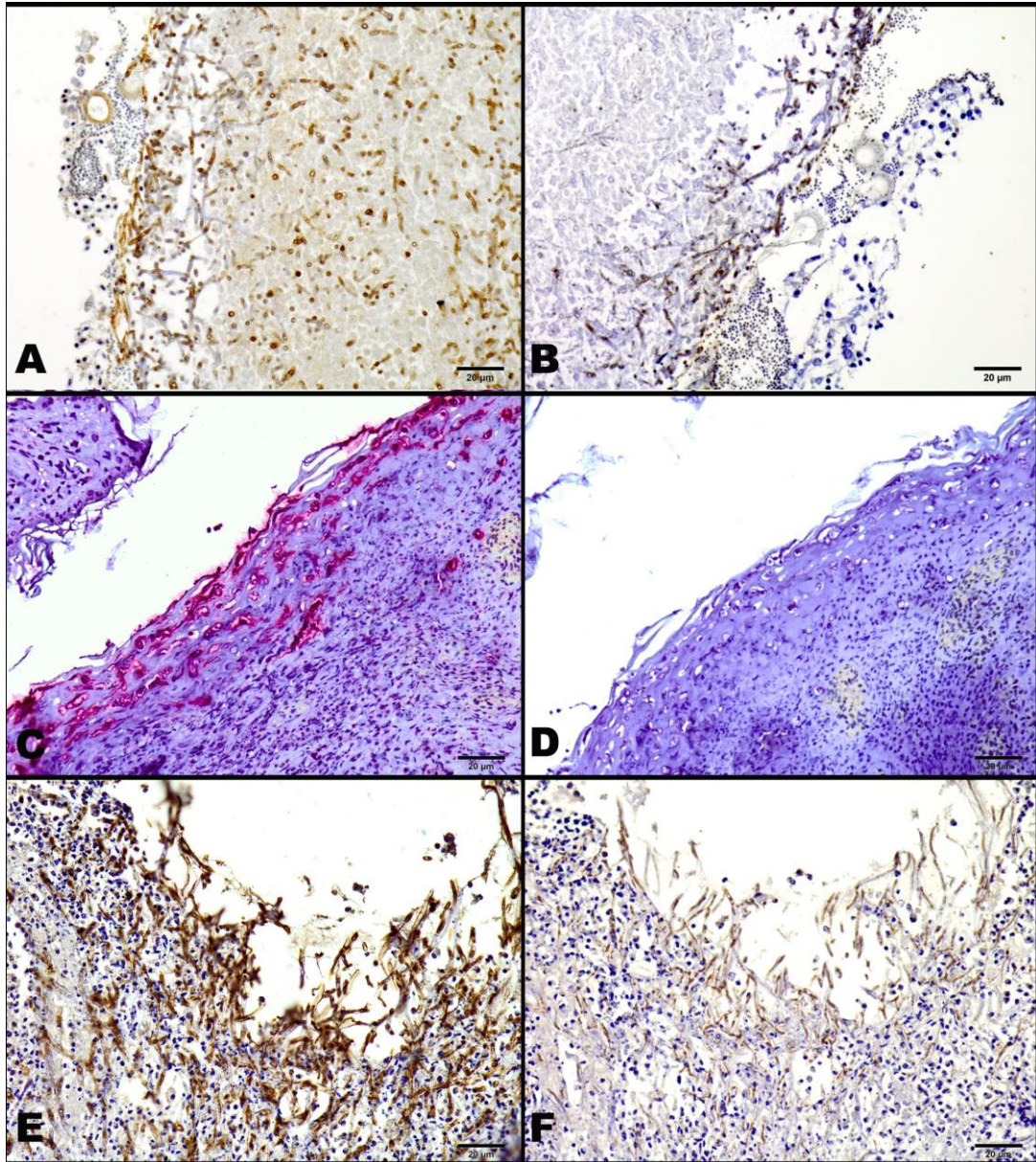


Fig. 2. Imuno-histoquímica para aspergilose. (A) Hifas fortemente imunomarcadas na parede e no citoplasma. Método da estreptavidina-biotina-peroxidase. (B) Reação inespecífica no citoplasma e nas paredes das hifas no controle negativo. Mesmo método da figura 2A. (C) Hifas fortemente imunomarcadas na parede e no citoplasma. Método estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina. (D). Hifas sem reação inespecífica no controle negativo. Mesmo método da figura 2C. (E) Hifas fortemente imunomarcadas na parede e no citoplasma.

Método por polímero. (F) Reação inespecífica no citoplasma e na parede das hifas no controle negativo. Mesmo método da figura 2E. Barra = 20µm.

Em todos os casos de zigomicose e aspergilose avaliados pelos três métodos observam-se raras hifas sem reação positiva (citoplasma pálido e paredes basofílicas ou imagens negativas) em meio a hifas imunomarcadas. Frequentemente essas hifas não imunomarcadas estavam em áreas de necrose ou no centro dos granulomas.

DISCUSSÃO

Os anticorpos monoclonais anti-*Aspergillus* spp. e anti-*Rhizopus arrhizus* demonstraram forte imunomarcção nos casos testados (tecidos fixados em formol e embebidos em parafina), os quais haviam sido previamente diagnosticados como aspergilose ou zigomicose baseado nas respectivas características histomorfológicas dos fungos e na localização e no tipo de reação tecidual observada em cada caso (Guarner & Brandt 2011).

Os sistemas de detecção (biotinilados e não biotinilados) são muito importantes para maximizar a sensibilidade dos testes de IHQ e para otimizar a visualização da reação imune com o menor número de etapas e no menor tempo possível (Ramos-Vara et al., 2014). Para os casos de zigomicoses, o método imuno-histoquímico utilizando o polímero foi o mais eficiente, demonstrando alta sensibilidade e especificidade, enquanto que para os casos de aspergilose, o método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina apresentou elevada sensibilidade e especificidade. A localização da imunomarcção nas hifas observada nos casos de zigomicose (ocorrendo principalmente no citoplasma) e aspergilose (na parede, nos septos e no citoplasma) pode estar associada ao tipo de antígeno específico de cada anticorpo. De acordo com alguns autores (Jensen et al. 1996b, Choi et al. 2004), anticorpos contra antígenos somáticos solúveis em água (*water-soluble somatic antigens* - WSSA) geralmente reagem com estruturas presentes no citoplasma (componentes não estruturais), enquanto anticorpos contra antígenos presentes nas frações da parede (*wall fraction* - WF) reagem com componentes estruturas presentes principalmente na parede, septos e citoplasma. A diferenciação na localização da imunomarcção auxilia na interpretação dos resultados da técnica de imuno-histoquímica para fungos, bem como para outros agentes (Ramos-Vara et al. 2008).

A ausência de imunomarcção nos conidióforos, observada nos casos de aspergilose, pode estar associada à variação na capacidade de imunomarcção dos elementos fúngicos devido às diferenças existentes na composição antigênica nas diferentes fases de desenvolvimentos dos fungos (Fukuzawa et al. 1995).

A identificação de reações inespecíficas neste estudo só foi possível devido à utilização de controles negativos (seções dos mesmos casos testados) com a presença do agente etiológico. A utilização de controles negativos em testes de IHQ é de extrema importância para avaliação da sensibilidade do anticorpo primário versus a ocorrência de reações inespecíficas (Ramos-Vara et al. 2008).

A ocorrência de reações inespecíficas observadas nos controles negativos (incubados somente com o diluente, sem a utilização de anticorpo primário) nos casos de zigomicose avaliados através dos métodos da estreptavidina-biotina-peroxidase ou fosfatase alcalina, pode estar associada à presença endógena de biotina, avidina, estreptavidina ou proteínas com características semelhantes às descritas anteriormente no citoplasma das hifas. Estudos têm demonstrado a presença endógena de biotina, avidina, estreptavidina e proteínas semelhantes à avidina em diversas espécies de fungos (Shchelokova & Vorob'eva 1982, Matsuhisa et al. 1993, Hall & Dietrich 2007, Takakura et al. 2008). Por exemplo, a presença de biotina endógena nas hifas de alguns casos poderia ter causado uma ligação inespecífica com a estreptavidina do sistema de detecção biotinilado. Entretanto, não foram utilizados bloqueadores comerciais específicos para avidina ou biotina endógenas nos casos aqui avaliados. Um aspecto que sugere a associação das reações inespecíficas com o sistema biotinilado vistas nos casos de zigomicose testados é a ausência dessas reações em casos em que se utilizou um polímero (sistema não biotinilado).

No entanto, as reações inespecíficas observadas nos dois casos de aspergilose utilizando-se os métodos (estreptavidina-biotina-peroxidase ou polímero com peroxidase), em que o cromógeno DAB (diaminobenzidina) era o indicado e aplicado, poderiam estar associadas à presença de peroxidase endógena, descritas em algumas espécies de fungos (incluindo *Aspergillus* sp) sob determinadas condições (Aifa et al. 1999, Conesa et al. 2000). Isto é corroborado pela ausência de reações inespecíficas quando se utilizou o sistema estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina e outro tipo de cromógeno indicado para esse método. A reação inespecífica observada nos controles negativos teria ocorrido diretamente entre a peroxidase endógena do fungo e o substrato-cromógeno (peróxido de hidrogênio-diaminobenzidina) nesses casos. O bloqueio da peroxidase endógena realizado no protocolo não teria sido suficiente nesses casos.

Não foram observadas reações cruzadas entre os anticorpos anti-*Rhizopus arrhizus* e anti-*Aspergillus* spp. nos casos de aspergilose, zigomicose, candidíase e pitiose aqui testados, demonstrando uma alta especificidade desses anticorpos. Entretanto, diversos estudos realizados com determinados anticorpos anti-antígenos fungo-específicos têm demonstrado

reações cruzadas na IHQ (Reed et al. 1993, Fukuzawa et al. 1995, Verweij et al. 1996, Schuetz & Cohen 2009). Nesses casos, as reações cruzadas podem estar associadas às semelhanças antigênicas entre alguns fungos (Reed et al. 1993, Fukuzawa et al. 1995, Schuetz & Cohen 2009). Na medida em que novos anticorpos (livres de reações cruzadas) são desenvolvidos e testados através da IHQ (Marcilla et al. 1999), esta técnica vai se apresentado como uma alternativa de diagnóstico específica e eficiente diante de testes mais onerosos e que não combinam a morfologia com a detecção do fungo específico (Guarner & Brandt 2011).

Quanto à ausência de imunomarcacão ocasionalmente vista em algumas hifas em áreas de necrose ou de intensa reação inflamatória poderia estar associado à perda da antigenicidade nos epitopos específicos detectados pelos anticorpos monoclonais utilizados devido à ação de enzimas proteolíticas liberadas de células necróticas.

CONCLUSÃO

Todos os casos previamente diagnosticados como aspergilose ou zigomicose foram confirmados pela IHQ neste estudo. A aplicação de três diferentes métodos imunohistoquímicos (dois biotinilados e um não biotinilados) disponíveis em nosso laboratório mostrou diferenças entre os métodos quanto a intensidade da imunomarcacão e quanto a ocorrência de reações inespecíficas nas hifas dos agentes testados nos controles negativos. Para a aspergilose, o método da estreptavidina-biotina-fosfatase alcalina não apresentou reações inespecíficas nas hifas. Enquanto que nos casos de zigomicoses, as reações inespecíficas não ocorreram no método por polímero. Isso demonstra mais uma vez a necessidade da busca do melhor protocolo de IHQ sempre que um novo anticorpo é introduzido na rotina laboratorial.

Agradecimentos.- G.J.N. Galiza e C. Tochetto (doutorado), W. Panziera (mestrado), T.M. Silva e R.A. Caprioli (iniciação científica - PIBIC) são bolsistas do CNPq. F.B. Rosa (doutorado) é bolsista da CAPES. G.D. Kommers é bolsista de Produtividade do CNPq (PQ-2). O projeto é financiado pelo CNPq - Edital Universal (Proc. 474839/2012-5).

REFERÊNCIAS

Aifa M.S., Sayadi S. & Gargouri A. 1999. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Lett.* 21(10):849-853.

- Choi J.K., Mauger J. & McGowan K.L. 2004. Immunohistochemical detection of *Aspergillus* species in pediatric tissue samples. *Am. J. Clin. Pathol.* 121:18-25.
- Conesa A., Hondel C.A.M.J.J.V.D. & Punt P.J. 2000. Studies on the Production of Fungal Peroxidases in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7):3016-3023.
- Eyzaguirre E. & Haque A.K. 2008. Application of immunohistochemistry to infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 132(3):424-431.
- Fukuzawa M., Inaba H., Hayama M., Sakaguchi N., Sano K., Ito M. & Hotchi M. 1995. Improved detection of medically important fungi by immunoperoxidase staining with polyclonal antibodies *Virchows Arch.* 427:407-414, 1995.
- Guarner J. & Brandt M.E. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st Century. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(2):247-280.
- Hall, C. & Dietrich, F.S. 2007. The Reacquisition of Biotin Prototrophy in *Saccharomyces cerevisiae* Involved Horizontal Gene Transfer, Gene Duplication and Gene Clustering, *Genetics.* 177(4):2293-2307.
- Jensen H.E., Olsen S.N. & Aalbaek B. 1994. Gastrointestinal Aspergilosis and Zygomycosis of Cattle. *Vet. Pathol.* 31(1):28-36.
- Jensen H.E., Schønheyder H.C., Hotchi M. & Kaufman L. 1996a. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. *APMIS.* 104:(4)241-258.
- Jensen H.E., Aalbaek B., Lind P. & Krogh H.V. 1996b. Immunohistochemical Diagnosis of Systemic Bovine Zygomycosis by Murine Monoclonal Antibodies. *Vet. Pathol.* 33(2):176-183.
- Marcilla A., Monteagudo C., Mormeneo S. & Sentandreu R. 1999. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. *Microbiology.* 145(3):695-701.
- Matsuhisa A., Saito Y., Ueyama H., Yamamoto M. & Ohono T. 1993. Binding of streptavidin to bacteria or fungi and its applications in detecting these microbes. *Microbiol. Immunol.* 37(10):765-772.
- Ramos-Vara J.A. & Beissenherz M.E. 2000. Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(4):307-311.
- Ramos-Vara J.A., Kiupel M., Baszler T., Bliven L., Brodersen B., Chelack B., Czub S., Del Piero F., Dial S., Ehrhart E.J., Graham T., Manning L., Paulsen D., Valli V.E. & West K. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(4):393-413.

- Ramos-Vara J.A. & Miller M.A. 2014. When Tissue Antigens and Antibodies Get Along: Revisiting the Technical Aspects of Immunohistochemistry --The Red, Brown, and Blue Technique. *Vet. Pathol.* 51(1):42-87.
- Reed J.A., Hemann B.A., Alexander J.L. & Brigati D.J. 1993. Immunomycology: rapid and specific immunocytochemical identification of fungal in formalin-fixed, paraffin-embedded material. *J. Histochem. Cytochem.* 41(18):1217-1221.
- Rocha D.C.A., Duarte M.I.S., Pagliari C. & Oliveira M.S. 1998. Diagnóstico imunohistoquímico de infecções fúngicas. *Rev. Hosp. Clín.* 53(4):184-188.
- Schuetz A.N. & Cohen C. 2009. *Aspergillus* Immunohistochemistry of Culture-proven Fungal Tissue Isolates Shows High Cross-reactivity. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 17(6):524-529.
- Shchelokova E.V. & Vorob'eva L.I. 1982. Biotin formation by the fungus *Rhizopus delemar*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 18(5):630-635.
- Takakura Y., Tsunashima M., Suzuki J., Usami S., Kakuta Y., Okino N., Ito M. & Yamamoto T. 2009. Tamavidins-novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom. *FEBS J.* 276(5):1383-1397.
- Verweij P.E., Smedts F., Poot T., Bult P., Hoogkamp-Korstanje J.A. & Meis J.F. 1996. Immunoperoxidase staining for identification of *Aspergillus* species in routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.* 49(10):798-801.

5 DISCUSSÃO

Diversos agentes fúngicos têm sido descritos como responsáveis por doenças em animais (CONNOLE, 1967; GARCIA; BLANCO, 2000; DIAL, 2007). Dentre os oomicetos, *P. insidiosum* tem se destacado como o principal patógeno para animais (COCK et al., 1987; ALEXOPOULOS et al., 1996; AZEVEDO et al., 2012). As enfermidades causadas por fungos e oomicetos nos animais têm recebido grande importância devido a fatores relacionados, por exemplo, com a ampla distribuição do agente no meio ambiente, dificuldade na prevenção das infecções e acometimento de animais e humanos por vários desses agentes (GARCIA; BLANCO, 2000).

No estudo retrospectivo realizado para determinar a prevalência das micoses e da pitiose em animais domésticos, assunto abordado no Artigo 1 que compõe esta tese, foram revisados de forma retrospectiva casos de doenças fúngicas e pitiose diagnosticados em necropsias e biópsias dos animais domésticos remetidos ao LPV-UFSM num período de 23 anos. Foram analisados os aspectos epidemiológicos, alterações macroscópicas e microscópicas descritas nos protocolos. Os dados obtidos compartilham muitas das informações previamente fornecidas em estudos semelhantes e ao, mesmo tempo, geraram novas informações. Este estudo permitiu a determinação da prevalência, epidemiologia e alterações clínico-patológicas das micoses e pitiose diagnosticadas pelo LPV. No período estudado foram revisados 9.487 protocolos de necropsias e 20.199 exames histopatológicos (totalizando 29.686 casos). Destes, 230 casos foram de micoses ou pitiose (oomicose), sendo 179 casos (78%) de micoses e 51 casos (22%) de pitiose. Em dois casos (0,8%) não foi possível determinar o gênero ou o grupo do fungo observado. As principais doenças diagnosticadas, em ordem decrescente de prevalência, foram: pitiose, candidíase, aspergilose, zigomicose, dermatofitose, malasseziose, criptococose, megabacteriose e esporotricose. Outras doenças diagnosticadas numa única ocorrência cada foram histoplasmose e pneumocistose. Os equinos foram os mais acometidos pela pitiose e os cães e gatos foram os mais acometidos pelas micoses.

O segundo artigo científico enfocou as características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico histopatológico da criptococose em cães e gatos. Os dados complementares relacionados à epidemiologia, aos aspectos clínicos, à localização das lesões e às alterações macroscópicas foram obtidos dos protocolos de necropsias e

biópsias. Pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) as leveduras eram arredondadas, com célula central contendo um núcleo, circundada por um halo claro (cápsula geralmente não corada). As técnicas histoquímicas do ácido periódico de Schiff (PAS), Grocott e Fontana-Masson (FM) foram utilizadas e evidenciaram a parede das células das leveduras. Pelo FM observou-se a melanina presente nessas células. As técnicas do azul Alciano e da mucicarmina de Mayer evidenciaram principalmente a cápsula polissacarídica das leveduras. O diâmetro das células das leveduras variou de 1,67 a 10,00 μ m e o diâmetro total das leveduras encapsuladas variou entre 4,17 e 34,16 μ m. Os brotamentos foram melhor visualizados através do PAS e ocorreram em base estreita, de forma única ou múltipla, principalmente em polos opostos das células das leveduras ou formando uma cadeia. O diagnóstico definitivo de criptococose foi estabelecido através do exame histopatológico, baseando-se na morfologia característica do agente (levedura encapsulada) e em suas propriedades tintoriais (histoquímicas), principalmente nos casos em que a cultura micológica não foi realizada. Criptococose é a micose sistêmica mais comum no gato, mas que também afeta cães, cavalos, bovinos e muitas outras espécies animais, além de humanos (CASWELL; WILLIAMS 2007). As alterações clínico-patológicas em muitos casos de criptococose não são patognômicas e muitas vezes mimetizam outros processos patológicos, incluindo neoplasias. Nesses casos em que o agente causal pode ser encontrado ou suspeitado somente durante o exame histopatológico, é necessário o reconhecimento detalhado das características histomorfológicas e histoquímicas desse fungo para que seja realizado um diagnóstico etiológico acurado.

O terceiro artigo enfocou um estudo imuno-histoquímico (IHQ) em casos de aspergilose e zigomicose visando a otimização do uso da técnica de IHQ na detecção e identificação dos agentes etiológicos dessas enfermidades em animais. Utilizaram-se os anticorpos monoclonais anti-*Aspergillus* spp. (WF-AF-1) e anti-*Rhizopus arrhizus* (WSSA-RA-1) em fragmentos de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, submetidos a três sistemas de detecção diferentes. Os dois anticorpos apresentaram alta especificidade e sensibilidade. Não ocorreram reações cruzadas entre os anticorpos utilizados e os agentes etiológicos avaliados. No entanto, algumas reações inespecíficas foram observadas em hifas em alguns casos, as quais puderam ser eliminadas através de um dos protocolos (sistemas de detecção) utilizados. Alguns estudos, com determinados anticorpos fungo-específicos, têm demonstrado reações cruzadas entre diversos fungos ou reações inespecíficas na IHQ (REED et al., 1993; BYRD et al., 2001; SCHUETZ; COHEN, 2009), estando as reações cruzadas associadas principalmente às semelhanças antigênicas entre alguns fungos (REED et al.,

1993; SCHUETZ; COHEN, 2009). A técnica de IHQ mostrou-se uma ferramenta muito útil na confirmação dos casos de aspergilose e zigomicose aqui testados, tendo em vista que não foram observadas reações cruzadas nas amostras analisadas.

6 CONCLUSÃO

Esta tese permitiu ter uma visão global da prevalência de micoses e pitiose em animais domésticos diagnosticados no LPV-UFSM num período de mais de 20 anos. Permitiu analisar o diagnóstico histopatológico e histoquímico da criptococose sob critérios morfológicos bem detalhados. Adicionalmente, permitiu observar, em casos de aspergilose e zigomicose, variações quanto à intensidade e especificidade de imunomarcção (nas amostras testadas) e a ocorrência de reações inespecíficas (nos controles negativos) entre três métodos imunohistoquímicos (sistemas de detecção) aplicados nos mesmos tecidos, sob as mesmas condições de bloqueio de reações inespecíficas, mesmo tipo de recuperação antigênica e com os mesmos anticorpos primários (com diluição e condições de incubação idênticas), contribuindo assim para o conhecimento de melhores condições de detecção desses agentes pela IHQ.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J. et al. Phylum *Oomycota*. In: ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W. & BLACKWELL, M. (Org.), **Introductory Mycology**. 4th ed. John Wiley & Sons, New York, 1996. p. 683-737

ANTONY, P. P. A guide to the histological identification of fungi in tissues. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 26, n. 11, p. 828-831, Nov. 1973.

AZEVEDO, M. I. et al. *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 7, p. 619-622, jul. 2012.

BLANCO, J. L.; GARCIA, M. E. Immune response to fungal infections. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 125, n. 1-2, p. 47-70, Sep. 2008.

BROWN, C. C. et al. Use of immunohistochemical methods for diagnosis of equine pythiosis. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 49, n. 11, p. 1866-1868, Nov. 1988.

BYRD, J. et al. Utility of anti-bacillus Calmette-Guérin antibodies as a screen for organisms in sporotrichoid infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 44, n. 2, p. 261-264, Feb. 2001.

CAMUS, A. C. et al. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Thousand Oaks, v. 16, n. 6, p. 567-571, Nov. 2004.

CASTELLÁ, G. et al. Criptococosis y animales de compañía. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 25, p. S19-S24, 2008.

CASWELL, J. L.; WILLIAMS, K. J. Infectious Diseases of the Respiratory System, In: Maxie M. G. (Org.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. v. 2. Saunders Elsevier, St. Louis, 2007. p. 579-650.

CHAFFIN, M. K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. **Veterinary Clinics of the North America: Equine Practice**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p. 91-103, Apr. 1995.

CHIHAYA, Y. et al. A Pathological Study of Bovine Alimentary Mycosis. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 107, n. 2, p. 195-206, Aug. 1992.

CHOI, J. K. et al. Immunohistochemical detection of *Aspergillus* species in pediatric tissue samples. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 121, p. 18-25, 2004.

COCK, A. W. A. M. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov., the Etiologic Agent of Pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 25, n. 2, p. 344-349, Feb. 1987.

CONNOLE, M. D. A Review of Animal Mycoses in Australia. **Veterinary Bulletin**. v. 37, n. 3, p. 145-153, Mar. 1967.

DIAL, S. M. Fungal Diagnostics: Current Techniques and Future Trends. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 37, n. 2, p. 373-392, Mar. 2007.

EYZAGUIRRE, E.; Haque, A. K. Application of immunohistochemistry to infections. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 132, n. 3, p. 424-431, Mar. 2008.

GABRIEL, A. L. et al. Surto de pitiose cutânea em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 12, p. 583-587, dez. 2008.

GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 17, p. S2-S7, 2000.

GINN, P. E. et al. Fungal Diseases of Skin. In: MAXIE, M. G. (Org.). **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. 5th ed. Vol. 1. Saunders Elsevier, St. Louis. 2007. p. 695-708.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed. Saunders Elsevier. St. Louis, 2012. p. 1296.

GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 4, p. 695-720, Jul. 2003.

GROSS, T. L. et al. Doenças Infecciosas e Granulomatosas e Piogranulomatosas Nodulares e Difusas da Derme. In: GROSS, T. L.; IHRKE, P. J.; WALDER, E. J.; AFFOLTER, V. K. (Org.). **Doenças de Pele do Cão e do Gato**. 2ª ed. Roca, São Paulo, 2009. p. 264-308.

GUARNER , J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st Century. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 2, p. 247-280, Apr. 2011.

JADHAV, V. J.; PAL, M. Canine mycotic stomatitis due to *Candida albicans*. **Revista Iberoamericana de Micología**, Bilbao, v. 23, p. S233-S234. 2006.

JENSEN, H. E. et al. Enzyme immunohistochemistry with mono- and polyclonal antibodies in the pathological diagnosis of systemic bovine mycoses. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 101, n. 7, p. 505-516, Jul. 1993.

JENSEN, H. E. et al. Gastrointestinal Aspergilosis and Zygomycosis of Cattle. **Veterinary Pathology**. Basel v. 31 n. 1, p. 28-36, Jan. 1994.

JENSEN, H. E. et al. Diagnosis of systemic mycoses by specific immunohistochemical tests. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 104, n. 4, p. 241-258, Apr. 1996.

KAUFMAN, L. Immunohistologic diagnosis of systemic mycoses: an update. **European Journal of Epidemiology**, Dordrecht, v. 8, n. 3, p. 377-382, May. 1992.

MADDY, K. T.; BETHESDA, M. P. H. Epidemiology and Ecology of Deep Mycoses of Man and Animals. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 96, n. 4, p. 409-417, Oct. 1967.

MARCILLA, A. et al. Monoclonal antibody 3H8: a useful tool in the diagnosis of candidiasis. **Microbiology**, Reading, v. 145, n. 3, p. 695-701, Mar. 1999.

MARTINS, T. B. et al. A comparative study of the histopathology and immunohistochemistry of pythiosis in horses, dogs and cattle. **Journal of Comparative Pathology**, London, v. 146, n. 2-3, p. 122-131, Feb-Apr. 2012.

MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. **Micologia Veterinária**, Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, 2009. p. 456.

MENDOZA, L. et al. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 11, p. 2967-2973, Nov. 1993.

MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.

MENDOZA, L.; NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**, London, v. 43, n. 6, p. 477-486, Sep. 2005.

MILLER, R. I. Gastrointestinal phycomycosis in 63 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 186, n. 5, p. 473-478, Mar. 1985a.

MILLER, R. I. et al. Cutaneous pythiosis in beef calves. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 186, n. 9, p. 984-986, May. 1985b.

OUTERBRIDGE, C. A. Mycologic Disorders of the Skin. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 3, p. 128-134, Aug. 2006.

PEREIRA, D. B.; MEIRELES, M. C. A. Dermatofitoses. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. (Org.). **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3ªed. Pallotti, Santa Maria, 2007. p. 451-457.

PESAVENTO, P. A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced ibis. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 45, n. 4, p. 538-541, Jul. 2008.

QUINN, P. J. et al. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2th ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, 2011. p. 928.

RAKICH, P. M. et al. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v. 17, n. 3, p. 262-269, May. 2005.

REED, J. A. et al. Immunomycology: rapid and specific immunocytochemical identification of fungi in formalin-fixed, paraffin-embedded material. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 41, n. 8, p. 1217-1221, Aug. 1993.

ROCHA, D. C. A. et al. Diagnóstico imuno-histoquímico de infecções fúngicas. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 53, n. 4, p. 184-188, jul-ago. 1998.

RODRIGUES, M. L. et al. Pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*: virulence factors and immunological mechanisms. **Microbes and Infection**. Paris, v.1, n. 4, p. 293-301, Apr. 1999.

SANTURIO, J. M. et al. Cutaneous pythiosis insidiosa in calves from the pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 141, n. 3, p. 123-125, Apr. 1998.

SCHUETZ, A. N.; COHEN, C. *Aspergillus* Immunohistochemistry of Culture-proven Fungal Tissue Isolates Shows High Cross-reactivity. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, Hagerstown, v. 17, n. 6, p. 524-529, Dec. 2009.

SILVA, S. M .M. S. et al. Epidemiologia e sinais clínicos da conidiobolomicose em ovinos no Estado do Piauí. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 184-190, Apr. 2007.

SMALL, E. Systemic Mycoses. **Journal of the America Veterinary Medical Association**. v. 155, n. 12, p. 2002-2004, 1969.

TABOSA, I. M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in Northeastern Brazil. **Veterinary Pathology**, Basel, v. 41, n. 4, p. 412-415, Jul. 2004.

TROST, M. E. et al. Aspectos clínicos, morfológicos e imuno-histoquímicos da pitiose gastrintestinal canina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 8, p. 673-679, Aug. 2009.

WELLEHAN, J. F. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*). **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 564-568, Dec. 2004.