



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Taiza Maschio de Lima

Estudo clínico e epidemiológico da esporotricose felina:
caracterização fenotípica, molecular e suscetibilidade antifúngica *in vitro*
de isolados

São José do Rio Preto
2020

Taiza Maschio de Lima

Estudo clínico e epidemiológico da esporotricose felina:
caracterização fenotípica, molecular e suscetibilidade antifúngica *in vitro*
de isolados

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES.

Orientador: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira.

São José do Rio Preto
2020

L732e	Lima, Taiza Maschio de Estudo clínico e epidemiológico da esporotricose felina : caracterização fenotípica, molecular e suscetibilidade antifúngica in vitro de isolados / Taiza Maschio de Lima. -- São José do Rio Preto, 2020 99 p. : il., tabs., fotos, mapas Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida Coorientadora: João Paulo Zen Siqueira 1. Sporothrix. 2. Esporotricose. 3. Gatos. 4. Epidemiologia. 5. Antifúngicos. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Taiza Maschio de Lima

Estudo clínico e epidemiológico da esporotricose felina:
caracterização fenotípica, molecular e suscetibilidade antifúngica *in vitro*
de isolados

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. João Roberto Antonio
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Cátia Rezende
UNIFEV – Centro Universitário de Votuporanga

São José do Rio Preto
23 de janeiro de 2020

Dedico,
Aos meus pais Sueli e José.
As pessoas especiais da minha vida.
Enfim, aqueles que apoiaram e acreditaram
neste projeto tão importante para mim.

AGRADECIMENTOS

Ainda durante a graduação descobri o meu fascínio pelo fantástico mundo da microbiologia, e por meio de excelentes professores, que também são doutores, foi despertado em mim um intenso interesse pela pesquisa científica e pela docência. Portanto a conquista do título de mestre é mais do que um objetivo de vida, é um sonho concretizado. Assim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e pessoal, que conseqüentemente, me trouxeram aqui para a realização deste objetivo tão almejado.

A todos os meus amigos e companheiros de laboratório que estiveram presentes em minha trajetória e que foram fundamentais para a realização deste mestrado, cedendo-me um pouco de seus vastos e sábios conhecimentos, bem como por toda a ajuda técnica e, principalmente pelo apoio emocional. Portanto, agradeço imensamente vocês Mariela, Natália, Juliana, Emília, Luceli, Thiago, Maicon, Marcos, Beatriz, Camila, Letícia, Bianca, Gabriela, prof. Paulo, profa. Elza, profa Cléo e profa Margarete, saibam que sempre estarão em meu coração e em minhas orações.

Especialmente, agradeço aos meus pais, Sueli e José e, ao meu irmão Tiago que são a minha base e sempre me incentivaram a estudar, a lutar pelos meus sonhos e a ser uma pessoa de caráter. Ao meu namorado Fernando, por me trazer conforto, calma, afeto, esperança e apoio, principalmente nos momentos de angústias e dúvidas.

À minha orientadora e querida Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida pela oportunidade e também por toda sua generosidade, colaboração, força, incentivo e ensinamentos, além de contribuir no aumento do meu fascínio pela microbiologia e pela pesquisa científica. Também agradeço ao Prof. Dr. João Paulo Zen Siqueira, este sim gastou toda a sua paciência comigo, a você meu caro coorientador agradeço por cada ajuda e apoio durante a execução desta pesquisa e em meus momentos de ansiedade.

À Universidade Federal de São Paulo, especificamente ao Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues e ao doutorando Ruan Monteiro por colocarem à disposição o Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes para a execução de testes moleculares e pelos valiosos ensinamentos em biologia molecular.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de São José do Rio Preto, às clínicas veterinárias participantes e à Secretária Municipal de Saúde de São José do Rio Preto, representados por todos os médicos veterinários envolvidos na coleta de amostras e no preenchimento das fichas de notificação, agradeço pelo comprometimento e parceria durante todo o período da pesquisa.

Às professoras Dra. Débora Aparecida Pires de Campos Zuccari e Dra. Eliana Márcia Sotello Cabrera por participarem da banca examinadora de qualificação, contribuindo com a melhoria desta pesquisa.

Aos membros da comissão examinadora Prof. Dr. João Roberto Antonio e Profa. Dra. Cátia Rezende por terem aceitado o convite, dedicando-se nas correções deste estudo, agregando assim experiência e conhecimento.

Ao laboratório de Microbiologia e a Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto pela infraestrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desta pesquisa.

Ao programa de pós-graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disponibilidade, ensinamentos, aprendizados e toda dedicação direcionada aos alunos de pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 à qual agradeço.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar, p. 21, 1893.

RESUMO

A esporotricose é uma micose de distribuição mundial, decorrente da implantação traumática do fungo *Sporothrix*. Atualmente, é considerada uma zoonose emergente, de impactos à saúde pública, sendo os gatos os principais animais afetados e associados à transmissão aos humanos. O estudo objetivou identificar casos de esporotricose em gatos no município de São José do Rio Preto/SP, com identificação da espécie circulante, além de analisar os fatores clínicos e epidemiológicos, e de suscetibilidade aos antifúngicos. Amostras de secreções e/ou biópsias de animais com lesões e sintomas da doença foram analisadas por técnicas micológicas, fenotípicas e moleculares de identificação do fungo. O método de microdiluição em caldo foi utilizado para identificar o perfil de suscetibilidade aos antifúngicos. Os aspectos clínicos e epidemiológicos foram avaliados com base em informações contidas nas fichas de investigação. No período estudado, foram coletadas 245 amostras de gatos sintomáticos à esporotricose, sendo o fungo *Sporothrix* isolado em 189 (77, 2%) amostras. Na análise fenotípica, para todos os isolados, foi encontrado padrão morfofisiológico compatível com a espécie *S. brasiliensis*, sendo esse achado confirmado por técnica molecular. Na análise de suscetibilidade aos antifúngicos, em geral, a terbinafina foi o fármaco com melhor desempenho de atividade antifúngica, seguido pelo cetoconazol e itraconazol. A população de felinos domésticos analisada era composta, em sua maioria, por machos (180; 73,5%), adultos (236; 96,3%), de rua (131; 53,5%) e não castrados (171; 68,9%). A alta positividade encontrada para a doença demonstra que a esporotricose felina está, de modo expressivo, presente no município de São José do Rio Preto/SP, sendo o *Sporothrix brasiliensis* a espécie presente. O sucesso dessa espécie na ocorrência de surtos e epidemias está associado, principalmente, a sua alta virulência e maior suscetibilidade do hospedeiro felino.

Palavras-chave: *Sporothrix*. Esporotricose. Gatos. Epidemiologia. Antifúngicos.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a worldwide mycosis, resulting from the traumatic implantation of the fungus *Sporothrix*. It is currently considered an emerging zoonosis with public health impact, and cats are the main animals affected and associated with transmission to humans. The aim of this study was to assess the cases of feline sporotrichosis in São José do Rio Preto, Brazil, to identify the circulating species, to analyze clinical and epidemiological factors, and evaluate the susceptibility to antifungal drugs. Secretion and/or biopsies samples from animals with lesions and sporotrichosis symptoms were analyzed by mycological procedures, and the isolates were identified by phenotypic and molecular techniques. The broth microdilution method was used to identify the antifungal susceptibility profiles. Clinical and epidemiological aspects were evaluated based on information contained in the research sheets. During the studied period, 245 samples of cats symptomatics of sporotrichosis were collected, and *Sporothrix* was isolated in 189 (77.2%) samples. According to the phenotypic analysis, all isolates exhibited the morphophysiological pattern of *S. brasiliensis*, this finding was confirmed by molecular technique. Regarding the antifungal susceptibility testing, terbinafine was, in general, the antifungal which exhibited the best activity, followed by ketoconazole and itraconazole. The domestic feline population analyzed was mostly male (180; 73.5%), adults (236; 96.3%), street (131; 53.5%), and uncastrated (171; 69.8%). The high positivity observed shows that feline sporotrichosis is present in the municipality of São José do Rio Preto, with *Sporothrix brasiliensis* being the causative agent. This species success in the occurrence of outbreaks and epidemics is mainly associated with its high virulence, and higher susceptibility of the feline host and habits of these animals.

Keywords: *Sporothrix*. Sporotrichosis. Cats. Epidemiology. Antifungal agents.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1 - Distribuição global da esporotricose.....	22
Figura 2 - Micromorfologia do <i>Sporothrix</i> sp.....	27
Figura 3 - Macromorfologia do <i>Sporothrix</i> sp.....	28
Figura 4 - Lesões cutâneas em gatos atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de São José do Rio Preto.....	34
Figura 5 - Processamento das amostras e isolamento de colônias.....	48
Figura 6 - Esquema de montagem da placa de assimilação de carboidratos.....	52
Figura 7 - Região do gene da calmodulina (CAL) e locais de reconhecimento dos primers específicos para espécies <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii</i>	54
Figura 8 - Esquema da placa de 96 poços utilizada no teste de microdiluição em caldo.....	57

Capítulo 2

Figure 1 - Map of the districts of São José do Rio Preto, Brazil, and distribution of positive and negative cases of feline sporotrichosis included in this study.....	79
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 - Classificação taxonômica do fungo <i>Sporothrix</i>	23
Tabela 2 - Classificação taxonômica de espécies de <i>Sporothrix</i> por De Beer, Duong e Wingfield (2016).....	24
Tabela 3 - Aspectos morfofisiológicos chaves para a diferenciação das espécies do complexo <i>S. schenckii</i>	49

Capítulo 2

Table 1 - Number, type, and origin of the samples which were positive and negative for sporotrichosis.....	76
Table 2 - Results of the in vitro susceptibility testing for 189 isolates of <i>S. brasiliensis</i> against AMB, KTZ, ITZ, TBF ($\mu\text{g/ml}$), and KI (mg/ml).....	76
Table 3 - Clinical and epidemiological aspects of the animals included in this study.....	77

LISTA DE ABREVIACES

AMB: anfotericina B.

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BHI: *brain heart infusion*.

C: controle.

CAL: *calmodulina* (gene).

CCZ: Centro de Controle de Zoonoses.

CEUA: Comissão de tica no Uso de Animais.

CIM: concentração inibitória mínima.

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*.

CLV: clínica veterinária.

CMA: gar *Corn Meal*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DNA: *deoxyribonucleic acid*.

DO: densidade optica.

EDTA: cido etilenodiamino tetra-acético.

EUA: Estados Unidos da América.

FAMERP: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto.

FelV: Vírus da Leucemia Felina.

Fg: femtograma.

FIV: Vírus da Imunodeficiência Felina.

g: grama.

GLI: glicose.

Gp: glicoproteína.

h: horas.

IFN: interferon.

Ig: imunoglobulina.

IK: iodeto de potássio.

IL: interleucina.

ITS: *internal transcribed spacer*.

ITZ: itraconazol.

Kb: kilobase.

kDa: kilo Dalton.

kg: quilograma.

KOH: Hidróxido de potássio.

KTZ: cetoconazol.

mA: miliampère.

Mbp: milhões de pares de bases.

mg: miligrama.

MIC: *minimum inhibitory concentration*.

ml: mililitro.

mol: molaridade.

MOPS: ácido morfopropileno sulfônico.

NaCl: cloreto de sódio.

não-WT: não selvagem.

nm: nanômetro.

pb: pares de bases.

PCR: *polymerase chain reaction*.

PDA: ágar dextrose-batata.

pH: potencial hidrogeniônico.

RAF: rafinose.

RFLP: polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição.

SAC: sacarose.

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação.

SisGen: Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.

TBE: Tris, Borato, EDTA.

TBF: terbinafina.

UFC: unidades formadoras de colônias.

UK: *United Kingdom*.

V: volt.

VCE: valores de cortes epidemiológicos.

WT: selvagens.

YNB: *yeast nitrogen base*.

µl: microlitro.

µmol: micromol.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: considerações gerais

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Histórico da esporotricose.....	17
2.2. Epidemiologia	19
2.3. Complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	22
2.4. Características morfológicas, fisiológicas e genéticas.....	26
2.5. Transmissão zoonótica	31
2.6. Aspectos clínicos e de diagnóstico	32
2.7. Aspectos terapêuticos	35
2.7.1. Iodeto de potássio	36
2.7.2. Itraconazol.....	37
2.7.3. Cetoconazol	38
2.7.4. Terbinafina	39
2.7.5. Anfotericina B	40
2.8. Aspectos imunológicos.....	41
3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	44
4. OBJETIVOS	46
4.1. Objetivo geral	46
4.2. Objetivos específicos	46
5. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS	47
5.1. Comissão de ética em pesquisa.....	47
5.2. Delineamento do estudo	47
5.3. Coleta das amostras	47
5.4. Isolamento fúngico.....	48
5.5. Caracterização fenotípica	49
5.5.1. Diâmetro das colônias e dimorfismo fúngico	50
5.5.2. Características micromorfológicas.....	50
5.5.3. Assimilação de carboidratos.....	51
5.6. Caracterização genotípica	53
5.7. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos	55
5.8. Georreferenciamento e aspectos clínicos e epidemiológicos.....	57

CAPÍTULO 2: artigo

ABSTRACT.....	61
INTRODUCTION.....	62
MATERIAL AND METHODS	63
RESULTS	66
DISCUSSION.....	68
REFERENCES.....	71

CAPÍTULO 3: considerações finais

6. CONCLUSÃO	8181
REFERÊNCIAS.....	82
Apêndice A. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	95
Apêndice B. Ficha de notificação de suspeita de esporotricose.....	96
Apêndice C. Fluxograma de encaminhamento das amostras.....	98
Anexo A. Licença da Comissão de Ética no Uso Animal.....	99

1. INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma micose subcutânea aguda ou crônica com características iniciais de pápulo-nodular e úlcera gomosa na fase tardia, causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (MAHAJAN et al., 2015; WALLER et al., 2016). Por serem geofílicos e sapróbios, as espécies deste gênero são encontradas no solo, madeira, vegetação, excreta de animais ou demais ambientes com presença de matéria orgânica em decomposição (MORRISON et al., 2013).

A transmissão é decorrente da penetração do fungo por meio de um ferimento traumático com fragmentos de vegetais, solo, madeira ou qualquer outra matéria orgânica contaminada (PÉREZ-ELIZONDO; PINEDA-PINEDA; SÁNCHEZ-CASTILHO, 2012). A contaminação por vias respiratórias e conjuntivais, bem como, por contato direto com a lesão já foram descritas (MADRID et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2017), porém são raras. Traumas por arranhadura e/ou mordedura de animais doentes ou portadores assintomáticos também estão associadas à transmissão da doença (BAZZI et al., 2016).

A potencialidade zoonótica da doença passou a ter importância a partir da década de 80 quando houve a associação entre casos humanos e em gatos, passando a ser considerada uma doença cosmopolita (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013). Antes disso, a esporotricose humana era disseminada em áreas rurais e basicamente restrita a transmissão por meio de traumas com materiais de origem vegetal (CRUZ, 2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da esporotricose

A primeira descrição clínica desta micose subcutânea ocorreu em 1898 por Benjamin Schenck, um estudante de medicina do Hospital Johns Hopkins, em Baltimore, Estados Unidos (EUA). Schenck observou, em um paciente do sexo masculino, lesões ulceradas no dedo indicador com acometimento da cadeia linfática até a região radial do braço, na qual a infecção mostrou-se refratária ao tratamento. A partir de culturas, o agente fúngico foi isolado e analisado detalhadamente quanto a sua morfologia. Amostras deste fungo foram enviadas ao micologista Dr. Erwin F. Smith, que o identificou como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (SCHENCK, 1898).

Em 1899, o segundo caso foi descrito nos EUA por Hektoen e Perkins, nesta ocasião a doença manifestou-se em um menino de cinco anos após um acidente doméstico com um martelo, que o atingiu no dedo indicador esquerdo. Sem a cicatrização do ferimento, houve o surgimento de lesões ulceradas, linfonodomegalia, vesículas e pústulas no dedo, abrangendo também o braço. O agente fúngico isolado apresentava as mesmas características morfológicas do fungo descrito por Schenck e recebeu a nomenclatura *Sporothrix schenckii*, dada pelos autores (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

Mesmo com a proposta da designação *Sporothrix schenckii*, o uso da nomenclatura *Sporotrichum* perdurou por décadas. Essa premissa foi observada pelo pesquisador Carmichael (1962), que relatou em seu estudo o desprezo com a denominação *Sporothrix*, dada por Hektoen e Perkins, pela maioria dos trabalhos científicos, sendo *Sporotrichum* o nome preferencialmente escolhido. Ainda neste estudo, Carmichael, aponta que o *Sporothrix schenckii* não possui características semelhantes com o fungo *Sporotrichum aureum*. E, sugere a nomenclatura *Sporothrix schenckii* como a correta para designar o agente etiológico da esporotricose.

Os pesquisadores Lutz e Splendore, em 1907, foram os primeiros a descrever a doença no Brasil através de estudos que identificaram a infecção natural em ratos e também em humanos. Na época, com a presença da peste na cidade de São

Paulo, Lutz e Splendore puderam examinar sistematicamente diversos ratos (*Mus decumanus*) de esgoto sintomáticos, sendo as lesões também observadas em ratos brancos criados em laboratório, originando um total de 40 casos de animais infectados. Em humanos foram identificados cinco casos em indivíduos atendidos em clínicas particulares, ambulatório e no hospital Italiano Umberto I (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

O primeiro caso foi de um jovem de 20 anos, em 1902, que apresentou ulcerações no antebraço esquerdo. Em 1903, dois homens foram diagnosticados, ambos açougueiros, sendo que um apresentou lesões ulceradas e o outro, nódulos subcutâneos. O quarto caso, em 1905, foi verificado em um enfermeiro que relatou uma mordida em seu dedo. O animal não foi identificado, porém acreditou-se ser um rato, após uma semana houve aparecimento de nódulos na região inferior do antebraço. O quinto caso relatado trata-se de um jovem, que após picadas de vários insetos apareceram numerosos nódulos, que evoluíram para ulcerações após um mês (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

O primeiro caso da doença adquirida naturalmente por gatos foi descrito em 1952 por Singer e Muncie, nos EUA. Porém, a suscetibilidade destes animais à infecção por *S. schenckii* já havia sido evidenciada em experimentos executados por De Beurmann, Gougerot e Vaucher (1909). Até 1980, os casos de esporotricose em gatos eram insólitos e sua transmissão para humanos ocorriam de modo isolado ou em pequenos surtos entre veterinários, técnicos e proprietários de animais doentes (BARROS et al., 2008).

No Brasil, em 1956, Freitas, Migliano e Zani-Neto (1956) descreveram o primeiro caso de esporotricose felina. Foram observados, em um gato macho e adulto, pequenos nódulos no membro anterior direito. A infecção evoluiu para lesões ulceradas que disseminaram dentre os membros e cabeça, causando destruição total do tecido cutâneo.

Ainda nesta pesquisa, foram realizados experimentos para verificar a infecção em animais. Uma solução derivada das colônias isoladas do caso felino inicial foi inoculada em ratos, camundongos e gatos (filhotes) por via subcutânea e intraperitonal. Lesões ulcerativopurulentas surgiram nos gatos inoculados por via subcutânea, sendo possível constatar uma alta carga fúngica. Os ratos manifestaram orquite. Apenas nos camundongos, não foi possível reproduzir o

processo experimental, contudo, os motivos não são descritos na pesquisa (FREITAS; MIGLIANO; ZANI-NETO, 1956).

2.2. Epidemiologia

Atualmente, os casos de esporotricose possuem ocorrência mundial, com descrição nos cinco continentes, porém são mais frequentes em países tropicais e subtropicais com grande relevância epidemiológica na América do Sul (CHAKRABARTI et al., 2015) (Figura 1). Nas últimas décadas houve um declínio dos casos de esporotricose na Europa, principalmente após a I Guerra Mundial, tornando-se esporádicos nos dias atuais (CHAKRABARTI et al., 2015). No século passado, a doença apresentava ocorrência frequente na França. Na literatura são encontrados poucos casos de esporotricose atuais na Europa, havendo relatos em países como Itália (CRISEO et al., 2008; CRISEO; ROMEU, 2010) e Portugal (DE OLIVEIRA et al., 2014).

O continente Africano possui relatos regulares da doença em países como Sudão, Nigéria, Zimbabué e África do Sul, tendo o primeiro caso descrito em 1914. O maior surto de esporotricose ocorreu em Witwatersrand na África do Sul entre os anos de 1941 e 1944, quando mais de 3.000 garimpeiros foram infectados. Neste surto, o fungo foi isolado nas madeiras que sustentavam os túneis das minas. Este tipo de ambiente apresenta condições adequadas para o desenvolvimento do *Sporothrix*, na qual a contaminação de trabalhadores de mina ainda é frequentemente relatada (QUINTAL, 2000; BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Na Ásia, os casos da doença concentram-se mais no Japão e China. Por décadas, a esporotricose foi à micose não superficial mais frequente no Japão. Segundo a pesquisa clínica promovida por Fukushima (1984), entre os anos de 1946 e 1982 ocorreram cerca de 2.500 casos. Após este levantamento, a alta incidência perdurou por anos até sua drástica diminuição nos dias atuais, na qual um estudo proposto pela Sociedade Japonesa de Micologia Médica, em 2006, mostrou que apenas 4 dos 8.717 casos de dermatomicoses foram causados pelo *Sporothrix*. Os motivos para tal queda não são totalmente determinados, acredita-se que estejam associados às mudanças nas práticas agrícolas, que fazem com que os agricultores

não precisem ter contato direto com o solo. Na China, o primeiro caso comprovado por cultura foi reportado em 1951 na cidade de Xangai. Desde então, diversos relatos são encontrados na literatura, principalmente no nordeste da China, porém a incidência não é totalmente conhecida (CHAKRABARTI et al., 2015).

A esporotricose nas Américas é bem variável, possuindo áreas endêmicas no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México e Uruguai. Nos EUA, a incidência da doença é considerada relativamente baixa, o maior surto de esporotricose no país ocorreu em 1988, registrando 84 casos em trabalhadores de reflorestamento (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Devido ao clima tropical, os casos são mais frequentes na América latina, onde as taxas de prevalência variam de 0,1% a 0,5% no Brasil, Colômbia, El Salvador, México, Uruguai e Venezuela; 0,01% a 0,02% na Argentina, Equador e Panamá; e rara em outras localidades como Chile (CHAKRABARTI et al., 2015).

No Brasil, a epidemiologia da esporotricose é amplamente relevante com grandes séries de casos. O estado do Rio Janeiro destaca-se, onde desde 1998 ocorre um grandioso evento epidêmico de transmissão zoonótica envolvendo gatos e humanos (CHAKRABARTI et al., 2015). A doença está distribuída por toda região metropolitana com elevada densidade na capital que ultrapassa para os municípios vizinhos, indicando uma epidemia urbana que afeta principalmente regiões com baixo nível socioeconômico e com problemas ambientais (BARROS et al., 2010).

O Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, registrou 4.188 casos de esporotricose em humanos entre 1997 e 2011. Já nos animais, desde 1998, 4.703 gatos foram diagnosticados com a doença até 2015 e 244 cães até 2014 (GREMIÃO et al., 2017). Outro estudo, ao analisar o período de 1998 a 2001 identificou 178 casos humanos de esporotricose na epidemia do Rio de Janeiro. Foi observado um predomínio da doença em mulheres (68%), com a média de idade de 39 anos, sugerindo uma exposição ao fungo durante os cuidados com gatos doentes (SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008).

Schubach, Barros e Wanke (2008), ainda verificaram 337 gatos diagnosticados micologicamente com esporotricose. O fungo foi isolado em 100% das lesões cutâneas, 66,2% da cavidade nasal, 41,8% da cavidade oral e 39,5% de fragmentos de unhas. O agente também foi isolado da cavidade oral e nasal de 10 gatos assintomáticos que viviam com os gatos adoecidos.

Segundo o último boletim epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro, entre os anos de 2015 e 2018 (dados até maio) foram notificados 4.722 casos suspeitos de esporotricose em humanos no estado. Ainda neste cenário, o percentual de confirmação dos casos, tanto laboratorial quanto clínico epidemiológico, foi acima de 60% apresentando um total de 3.510 casos confirmados (SECRETARIA DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO, 2018).

Nos últimos anos, outros estados brasileiros também relataram casos de esporotricose, principalmente Rio Grande do Sul e São Paulo, porém, quando comparados ao Rio de Janeiro estas regiões ainda não possuem o mesmo impacto endêmico. A espécie *Sporothrix brasiliensis* está associada aos casos de esporotricose felina e humana no Brasil, sendo isolada na epidemia no Rio de Janeiro (OLIVEIRA et al., 2011a) e também nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2013).

O Centro Controle de Zoonoses (CCZ) de São Paulo monitora gatos errantes desde 2008 através dos seus serviços de vigilância epidemiológica. Desde 2010, este órgão atentou-se para o crescente aumento dos casos de esporotricose felina na cidade de São Paulo e em municípios vizinhos (MONTENEGRO et al., 2014).

Na cidade de São Paulo, bairro de Itaquera, ocorreu um surto da doença entre 2011 e 2012, quando foram registrados 98 casos em gatos e 11 em humanos. No final de 2012 também houve relato de surto na cidade de Diadema envolvendo gatos e humanos (BORGES et al., 2013). Montenegro et al. (2014) analisaram casos de esporotricose felina no estado de São Paulo entre 2011 e 2014, diagnosticando laboratorialmente 163 animais na capital, 10 em Diadema e 17 em Guarulhos.

Na região sul, o estado do Rio Grande do Sul destaca-se pelo maior número de casos em relação a outras localidades adjacentes, com concentração na cidade do Rio Grande, porém não se sabe a real situação já que a doença não é obrigatoriamente notificada (SANCHOTENE et al. 2015). Um estudo conduzido em oito municípios do estado do Rio Grande do Sul (Pelotas, Rio Grande, Capão do Leão, Pedro Osório, Morro Redondo, Canguçu, São Lourenço e Bento Gonçalves), entre 2000 e 2010, diagnosticaram 92 gatos e 11 cães com esporotricose (MADRID et al. 2012). Também nesse estado, Sanchotene et al. (2015) relataram 129 casos de esporotricose em gatos entre 2010 e 2014, comprovados laboratorialmente e por achados clínicos.

No estado de São Paulo, certas cidades determinaram a notificação obrigatória de casos de esporotricose humana através do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), como ocorre em Guarulhos (PREFEITURA DE GUARULHOS, 2016) e São Paulo (PREFEITURA DE SÃO PAULO, 2011).

Em outras localidades, também há a recomendação da notificação da doença em humanos e a vigilância dos casos em animais. No município de Belo Horizonte, após um surto na região de Barreiro, em 2016, envolvendo o gato como transmissor aos humanos, a notificação da doença tornou-se obrigatória (PREFEITURA DE BELO HORIZONTE, 2018). No ano de 2018, a cidade de Salvador também passou a notificar os casos de esporotricose humana devido a proximidade da cidade com o município de Camaçari, onde os casos da doença são frequentes (PREFEITURA DE SALVADOR, 2018).



Figura 1. Distribuição global da esporotricose.

Fonte: adaptado CHAKRABARTI et al., 2015.

2.3. Complexo *Sporothrix schenckii*

O gênero *Sporothrix* pertence à Divisão *Ascomycota*, Classe *Pyrenomycetes*, Ordem *Ophiostomatales*, Família *Ophiostomataceae* (Tabela 1), recebendo esta taxonomia após a revisão taxonômica de fungos realizada por Guarro, Gené e Stchigel (1999), sendo considerado o principal patógeno do grupo *Ophiostomatales*. No entanto, o gênero conta com 51 espécies, na maioria sapróbias (De BEER;

DUONG; WINGFIELD, 2016). Por muitos anos, o agente etiológico da esporotricose era referido como *Sporothrix schenckii*. Porém, após estudos de Biologia Molecular, foi demonstrado que os isolados *S. schenckii* apresentavam polimorfismos (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Desta forma, sabe-se que a esporotricose não é causada por uma única espécie. Com base em características morfológicas, assimilação de sacarose e rafinose, capacidade de crescimento a 37 °C e na sequência do gene da calmodulina, Marimon et al. (2006, 2007, 2008) descreveram novas espécies patogênicas com importância clínico-epidemiológica em diferentes regiões geográficas, formando o complexo *Sporothrix schenckii*. São elas: *S. albicans*, *S. brasilienses*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. schenckii sensu stricto*.

Tabela 1. Classificação taxonômica do fungo *Sporothrix*.

Reino	Fungi
Divisão	Ascomycota
Classe	Sordariomycetes
Ordem	Ophiostomatales
Família	Ophiostomataceae
Gênero	<i>Sporothrix</i>
Espécies	<i>S. schenckii</i> ; <i>S. brasiliensis</i> ; <i>S. globosa</i> ; <i>S. luriei</i> , dentre outras.

Na última revisão taxonômica, De Beer, Duong e Wingfield (2016) reagruparam as espécies de *Sporothrix* em diferentes complexos. Espécies patogênicas de grande valor clínico-epidemiológico, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. schenckii sensu stricto*, pertencem ao clado patogênico. Enquanto que, *S. mexicana* e *S. pallida* estão presentes no complexo *Sporothrix pallida* (Tabela 2). Ressalta-se que, a partir do estudo desenvolvido por De Meyer e colaboradores (2008) a nomenclatura *S. albicans*, bem como, *S. nivea* passaram a ser sinônimos da espécie *S. pallida*. Essa modificação foi levada em consideração por De Beer Duong e Wingfield na realização da revisão taxonômica descrita acima.

Tabela 2. Classificação taxonômica de espécies de *Sporothrix* por De Beer, Duong e Wingfield (2016).

<i>Sporothrix</i>	Espécies	F. sexual	Conídio	Colônia	Origem	Continente
Clado patogênico	<i>S. brasiliensis</i>	Não	h/p	Marrom	p	América do Sul
	<i>S. globosa</i>	Não	h/p	Marrom	p/a	Ásia, Europa, América do Norte e do Sul
	<i>S. luriei</i>	Não	h	Branca	p	África
	<i>S. schenkii</i>	Não	h/p	Marrom	p/a	África, Ásia, Austrália, Europa, América do Norte, Central e do Sul.
Complexo <i>S. pallida</i>	<i>S. mexicana</i>	Não	h/p	Marrom	p/a	Europa, América Central e do Sul
	<i>S. pallida</i>	Não	h	Branca	p/a	Ásia e Europa

Conídio: h= hialino, p= pigmentado. Origem: p= patógeno, a= ambiental.

Fonte: adaptado De Beer, Duong e Wingfield (2016).

Na natureza, este fungo vive como um sapróbio em vegetação viva e em decomposição, excrementos de animais e no solo. Ambientes ricos em matéria orgânica, principalmente em celulose, com pH entre 3,5 e 9,4, alta umidade e temperatura em torno de 30 °C são fundamentais para o desenvolvimento do micélio (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

A característica de dimorfismo térmico, ou seja, de alterar o estilo de vida micelial em ambiente a 25-30 °C para a forma leveduriforme com o aumento da temperatura (35 °C-37 °C) é responsável por transformar este fungo sapróbio em um patógeno de mamíferos (GREMIÃO et al., 2017). O dimorfismo e outros fatores como a melanização dos conídios e a via de infecção são aspectos associados ao grau de virulência e de impacto clínico de uma cepa (SCHEUFEN et al., 2015).

Ainda não é totalmente clara a epidemiologia da esporotricose felina e seu impacto nos casos da doença em humanos. Porém, já se sabe que os gatos desempenham um papel significativo nas áreas de surto da doença, sendo a espécie *S. brasiliensis* prevalentemente associada à esporotricose felina e de

ocorrência restrita no Brasil. Também, é observado que surtos em gatos influenciam a ocorrência de *S. brasiliensis* nos casos humanos na mesma área geográfica. Este fato é evidenciado no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, onde essa espécie é isolada com alta frequência em gatos e humanos (RODRIGUES et al., 2013).

Segundo Arrillaga-Moncrieff et al. (2009), *S. brasiliensis* apresenta alta virulência, sendo a mais virulenta dentre as espécies em termos de mortalidade, dano tecidual e carga fúngica tecidual em modelos laboratoriais. Neste experimento, também foi visualizado sua capacidade de se disseminar por órgãos, como fígado, rins e cérebro, causando uma infecção sistêmica. No comprometimento do fígado, o *S. brasiliensis* é encontrado no interior das células de Kupffer, enquanto as formas fúngicas de *S. schenckii* aparecem no centro dos granulomas hepáticos.

Na literatura, são encontrados diversos relatos da ocorrência do *S. brasiliensis* em animais. No Rio Grande do Sul, sete isolados felinos foram identificados como *S. brasiliensis* (OLIVEIRA et al., 2011b). Esta espécie também foi caracterizada em trinta gatos e dois cães provenientes do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2013). Montenegro et al. (2014) isolaram o *S. brasiliensis* em 48 gatos oriundos da região metropolitana de São Paulo. Na epidemia do Rio de Janeiro, esta espécie ocorre em maior frequência nos humanos, na qual Oliveira et al. (2011a) observaram o *S. brasiliensis* em duzentos e seis pacientes.

A segunda espécie mais patogênica do complexo é o *Sporothrix schenckii sensu stricto* (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Há poucos relatos do isolamento desta espécie no Brasil. Oliveira et al. (2011a) caracterizaram 15 isolados humanos provenientes do Rio de Janeiro. Recentemente, Almeida-Paes et al. (2014) identificaram o *Sporothrix schenckii sensu stricto* em 5 pacientes nesta mesma localidade.

Sporothrix schenckii sensu stricto apresenta uma distribuição mundial, porém com maior ocorrência nas Américas. Há relatos da circulação desta espécie em países como México, Guatemala, Colômbia, Brasil, Peru, Bolívia, Argentina, Venezuela e EUA (MADRID et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2011a). Em países da Europa como França, Itália, Reino Unido, bem como, na África do Sul e Japão esta espécie também já foi descrita (MADRID et al., 2009; ROMEO; SCORDINO; CRISEO, 2011).

Sporothrix globosa é a terceira espécie do complexo em grau de maior virulência (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009), sendo relatada em casos de esporotricose humana na Espanha, Itália, EUA, China, México, Guatemala, Colômbia e Índia (MADRID et al., 2009). Recentemente, em Portugal, foi relatado o primeiro caso autóctone (DE OLIVEIRA et al., 2014). No Brasil, foram descritos casos no estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA et al., 2010), Minas Gerais, Ceará e Goiás (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013).

Sporothrix mexicana é considerada a menos comum dentre as espécies do complexo *Sporothrix*, em termos de ocorrência. Por tempos, essa espécie ficou estritamente relacionada ao México, mas atualmente foi isolada de um caso humano em Portugal e em três pacientes no Brasil (DIAS et al., 2011; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2013).

Sporothrix luriei anteriormente foi denominado *Sporothrix schenckii* var. *luriei*. A denominação foi alterada após estudos filogenéticos demonstrarem uma separação genética entre essa espécie e as demais pertencentes ao complexo. Além das características genéticas, há diferenças na morfologia e fisiologia como a ausência de conídios sésseis pigmentados e a presença de conídios longos (MARIMON et al., 2008). Casos ocasionados por essa espécie são raros, com relatos na Índia (PADHYE et al., 1992), África do Sul (MARIMON et al., 2008) e Brasil (OLIVEIRA et al., 2011b).

Sporothrix albicans é considerada uma espécie ambiental não patogênica, com poucos relatos na literatura de sua ocorrência como agente causador de infecções. Dentre os escassos estudos, Oliveira e colaboradores (2011b) isolaram *S. albicans* em um felino doméstico no Brasil. De Meyer et al. (2008) apontaram uma grande similaridade genética entre *S. albicans* e uma outra espécie ambiental denominada *S. pallida*, propondo que ambas fossem chamadas de *S. pallida*.

2.4. Características morfológicas, fisiológicas e genéticas

Sporothrix é um fungo sapróbio, com dimorfismo térmico. Em sua fase sapróbia ou quando cultivada a 25-30 °C assume a forma filamentosa. Em temperaturas de cultivo maiores, em torno 37 °C, ou em seu hospedeiro mamífero,

esse fungo adquire a forma leveduriforme (OROFINO-COSTA et al., 2017; GUIRADO et al., 2018).

A fase filamentosa é composta de hifas hialinas septadas com células conidiogênicas provenientes de hifas indiferenciadas, que formam grupos de conídios em pequenos dentículos agrupados, semelhante a uma flor de margarida (OLIVEIRA et al., 2011a). Os conídios podem ser globosos, ovais ou triangulares e não produzem cadeias, porém, também podem estar ligados individualmente ao longo da hifa, na forma de conídios sésseis (MARIMON et al., 2007). Essas estruturas apresentam paredes celulares espessas hialinas ou demácias, na qual a melanização distingue as espécies patogênicas das não patogênicas (CRUZ, 2013) (Figura 2).

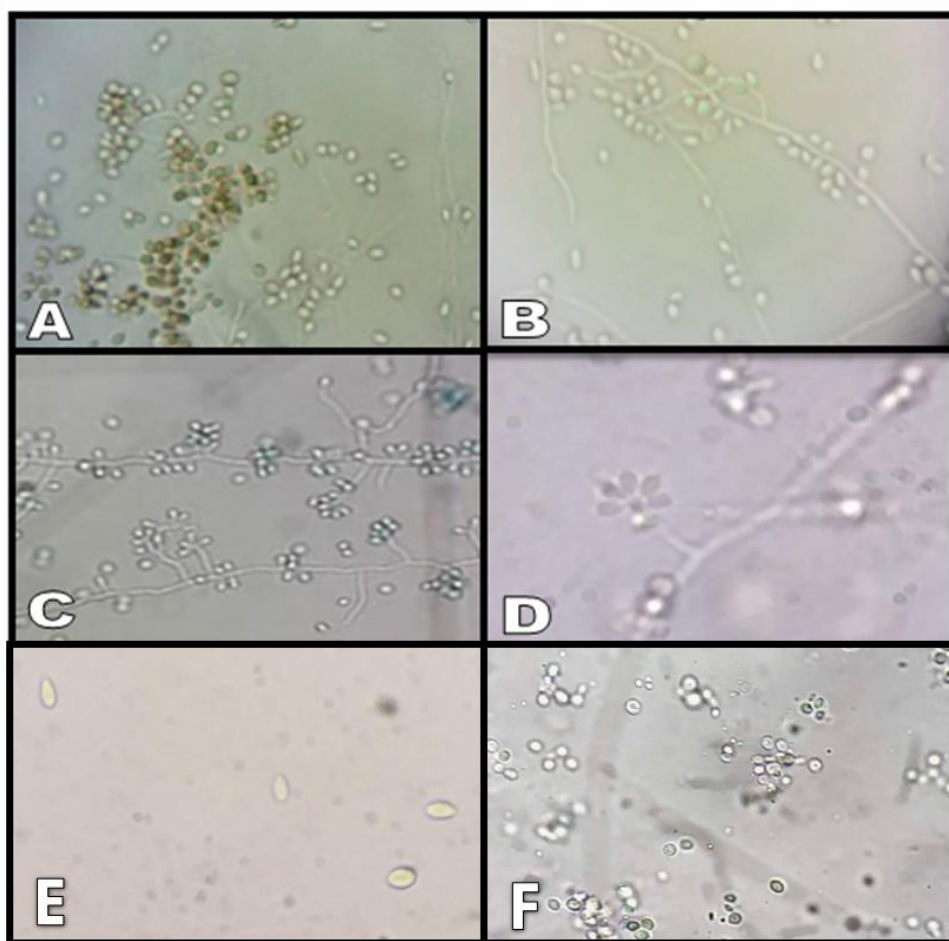


Figura 2. Micromorfologia do *Sporothrix* sp. A e B: conídios pigmentados sésseis, lâmina preparada com ácido láctico, aumento de 400X. C e D: hifas e conídios hialinos destaca-se a presença de conídios agrupados em formato semelhante a uma flor de margarida, lâmina corada com azul de algodão, aumento de 400X (C) e 1000X (D). E: leveduras, lâmina de colônia leveduriforme preparada com ácido

lático, aumento de 400X. F: leveduras, lâmina de exame direto (secreção de lesão) preparada com KOH, aumento de 400X.

Fonte: Laboratório de Microbiologia – Famerp.

Macroscopicamente, as colônias filamentosas podem ser lisas ou enrugadas e até mesmo cremosas, mas nunca cotonosas. Possuem coloração branca, inicialmente, mudando para marrom até ficarem totalmente enegrecidas após alguns dias, devido à produção tardia de melanina (GUIRADO et al., 2018). Contudo, algumas cepas têm a capacidade de formar colônias escuras desde o início do crescimento (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011) (Figura 3A).

As leveduras são encontradas em vários tamanhos e formas, desde arredondadas ou ovais até formas alongadas semelhantes a um charuto, com diâmetros de 2 a 6 μm . Macroscopicamente, as colônias leveduriformes são lisas de coloração creme ou levemente amarronzada (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011) (Figura 3B).

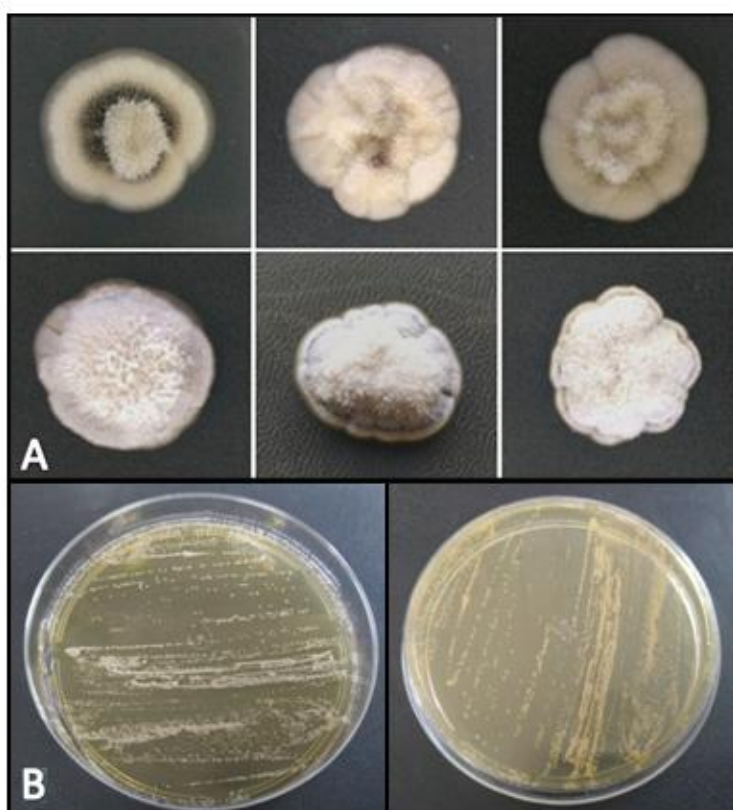


Figura 3. Macromorfologia do *Sporothrix* sp. A: colônias filamentosas em ágar dextrose-batata, com 7 dias de crescimento. B: colônias leveduriformes em ágar infusão de coração e cérebro, com 5 dias.

Fonte: Laboratório de Microbiologia – Famerp.

A forma morfológica do fungo é influenciada pela temperatura. A transição de filamentoso para levedura pode ser obtida através do cultivo de micélios ou conídios a uma temperatura de 35 °C a 37 °C (MARIMON et al., 2007). O meio de cultura é outro fator importante, por exemplo, o *Sporothrix* cresce bem no ágar Sabouraud mas, neste processo de conversão, meios mais ricos, como o ágar infusão de cérebro-coração, são ideais (CRUZ, 2013).

A transição da forma filamentosa para leveduriforme é o fenômeno que acontece após um indivíduo se infectar com filamentos do fungo presentes o meio ambiente. A transformação ocorre através da formação de estruturas semelhantes a um broto nas pontas e ao longo das hifas, não há brotamento direto dos conidiósporos. Na etapa seguinte, há a septação das hifas com formação das células oidiais, sem alteração do conteúdo citoplasmático da célula parental (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Mecanismos moleculares regulam a proliferação e manutenção da célula leveduriforme. Nestes processos, estão envolvidas as proteínas quinases dependentes de cálcio e a via de interação entre fosfolipase citosólica e proteína G (VALLE-AVILES et al, 2007). A transição levedura-micélio também é dependente de cálcio, que induz a síntese de RNA e proteína na célula. Inicialmente, a levedura passa por divisão nuclear, com posterior concepção de um tubo germinativo e origem de um septo (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

As células leveduriformes e filamentosas, bem como os conídios, apresentam diferenças na espessura e nas invaginações da membrana plasmática. No caso das leveduras, as invaginações são longas e estão em menor número, enquanto a membrana plasmática das hifas é lisa e não possui invaginações. Já, nos conídios, as invaginações estão em abundância, sendo mais curtos (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Há pouca diferença nos componentes glicídicos da parede celular micelial e de leveduras. Na fase micelial, a parede celular apresenta grandes quantidades de lipídeos e proteínas, menor concentração de manose e grânulos de melanina. A composição dessa estrutura em células conidiais pode ser afetada pelo tempo de cultura, havendo diminuição de ramnose e aumento de manose (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

A parede celular da levedura também contém grânulos de melanina e proteínas envolvidas na aderência, sendo um importante fator de virulência fúngica. Neste contexto, destaca-se uma glicoproteína de 70 kDa composta por glicanas ligados a nitrogênio, sem evidência de oligossacáridos ligados a oxigênio. Essa possui uniforme distribuição na superfície da célula e participa da adesão à matriz extracelular dérmica (RUIZ-BACA et al, 2009).

Diferenças na parede celular entre as espécies de *Sporothrix* já foram descritas. O *S. schenckii sensu stricto* apresenta uma parede celular com espessura de 100 nm, sendo observada uma única camada de fibrilas finas em células jovens (3 a 4 dias em cultura) e uma dupla camada em culturas mais antigas (7 a 10 dias). Já, o *S. brasiliensis*, exibe uma parede celular interna mais espessa e camada fibrilar externa de 400 nm, havendo maior conteúdo de quitina e ramnose em relação à espécie *S. schenckii* (LOPES-BEZERRA et al., 2018).

A temperatura ideal para o crescimento do *Sporothrix* é de 28-37 °C, com o crescimento inviável a 40 °C. Embora, o fungo seja capaz de crescer a 37 °C, seu desenvolvimento é mais favorável em temperaturas em torno de 28 °C (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011). Em seu metabolismo, carboidratos como glicose, frutose, manose e celobiose podem ser assimilados, mas há variabilidade na assimilação de sacarose, arabinose, amido, rafinose e ribitol (MARIMON et al., 2007; 2008). Assim, a capacidade de assimilação de fontes carbônicas é variável dentre as espécies desse fungo, ressaltando que nenhuma delas fermenta carboidratos (ZHAO et al, 2015).

Em relação ao pH, *Sporothrix* pode crescer em sua forma micelial na faixa 3.0 a 11.5, porém as células leveduriformes crescem apenas dentro do intervalo de pH de 3.0 a 8.5. As leveduras são mais osmotolerante do que a fase filamentosa. Enquanto as leveduras crescem bem em NaCl a 11%, a fase micelial resiste até 7% de NaCl (GHOSH et al., 2002). Outras características fisiológicas são a capacidade de quebrar a uréia, realizar aquisição redutora de ferro através de enzimas extracelulares e tolerar a cicloheximida a 0,25% (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Ainda pouco se sabe sobre a composição genômica de *Sporothrix*. Estudos sobre a composição do DNA genômico apontam um conteúdo médio de guanina e citosina (54,7 mol%). O cariótipo analisado de oito cepas isoladas em humanos de

uma pesquisa no Japão, mostrou que o *S. schenckii* possui seis a oito cromossomos com 460 a 6.200 kb e tamanho total do genoma de aproximadamente 28 Mbp. No entanto, há relatos na literatura que apontam um genoma com 45 Mbp para *S. schenckii*. Além disso, descrevem que esse fungo é um organismo diploide possuindo cerca de 50 fg de DNA por célula, seja na fase micelial ou leveduriforme (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Os estudos moleculares são geralmente baseados na análise do DNA mitocondrial. A técnica de polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) utilizando a enzima de restrição *HaeIII* é frequentemente empregada (XU et al., 2010). Mais de 30 tipos de DNA mitocondrial já foram descritos com base em estudos com cepas de *S. schenckii* de diferentes origens geográficas (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

2.5. Transmissão zoonótica

A esporotricose ou o contato com o *Sporothrix*, além dos humanos, já foi relatada em chimpanzés, gatos, cães, mulas, cavalos, camelos, vacas, cabras, porcos, ratos, tatus, golfinhos e aves (MADRID et al., 2012; SCHUBACH; MENEZES; WANKE, 2015). Entretanto, dentre os animais, os gatos apresentam maior relevância devido ao seu envolvimento no ciclo zoonótico de grandes epidemias e ao alto potencial de transmissibilidade e de suscetibilidade à infecção por *Sporothrix* sp. (ROSA et al., 2017).

O potencial zoonótico de gatos infectados é observado pela elevada carga do *Sporothrix* em lesões cutâneas. Podendo ainda, mesmo que assintomáticos, carregar o fungo em suas garras, na cavidade oral ou nasal, atuando como fonte de contaminação para humanos e animais, e o próprio ambiente (MADRID et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; BAZZI et al., 2016).

Diferente da forma clássica de transmissão, derivada do contato com hifas saprobióticas em material vegetal, na via zoonótica os gatos transmitem o fungo diretamente para outros animais e para o homem por meio de mordeduras, arranhaduras ou contato com lesões (CHAVES et al., 2013). A transmissão direta, gato-gato e gato-humano, envolve a inoculação de células leveduriformes, que

atuam de forma mais virulenta do que a fase micelial, sendo um mecanismo importante na dispersão da doença (RODRIGUES et al., 2013).

A via de transmissão interfere no processo de instalação do patógeno no organismo hospedeiro. No caso de um animal ou um humano, sadios e recém-contaminados através de um ferimento causado por um animal adoecido, inúmeras leveduras são transferidas ao tecido lesionado, iniciando imediatamente a reprodução destas estruturas. Entretanto, quando a contaminação é derivada de um ferimento traumático de origem vegetal, o fungo estará na forma filamentosa, necessitando da sua transformação em célula leveduriforme para que assim ocorra o processo de multiplicação. Dessa forma, o período de incubação da doença é maior na contaminação por traumas com vegetais do que na transmissão zoonótica (CRUZ et al., 2013).

A ocorrência da doença é predominantemente associada à ocupação profissional, na forma de transmissão clássica, afetando pessoas que lidam com a terra, como floricultores e agricultores. Porém, neste início de século, a ocorrência tem sido relacionada com profissionais que lidam com animais, como veterinários (BAZZI et al., 2016). Além disso, é comum a ocorrência de surtos familiares, visto que o manejo dos animais doentes é complicado, com possibilidade de contaminação ao medicá-los e nos cuidados com as lesões (BARROS et al., 2010; CORDEIRO et al., 2011; CRUZ, 2013; BAZZI et al., 2016).

2.6. Aspectos clínicos e de diagnóstico

A esporotricose, tanto nos humanos como nos animais, pode ocorrer em diferentes níveis de gravidade, de acordo com o sistema imune do hospedeiro e com a virulência da cepa de *Sporothrix* (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Dessa forma, a imunossupressão e casos envolvendo o *S. brasiliensis* tendem a uma maior gravidade, devido à debilidade do sistema imune e à alta virulência dessa espécie (LOPES-BEZERRA et al., 2018).

A carga microbiana transmitida no momento da inoculação interfere na instalação da doença. A partir do local do ferimento, o fungo pode permanecer no tecido subcutâneo, ou ainda, alcançar a circulação linfática e sanguínea, havendo assim, uma disseminação sistêmica (LARSSON, 2011). Nos felinos domésticos, a

esporotricose evolui de forma grave, o que não é observado em outros animais. A doença pode manifestar-se na forma cutânea fixa, linfocutânea, extracutânea e disseminada; na qual nos gatos pode ocorrer, concomitantemente, mais de uma forma clínica (BARROS et al., 2010).

A forma cutânea fixa refere-se à ocorrência de uma ou mais lesões situadas apenas no local de inoculação do agente, geralmente essas são ulceradas com bordas eritematosas. Já, as lesões linfocutâneas apresentam-se, inicialmente, como pápulas ou pústulas, com posterior formação de nódulos subcutâneos; com a propagação do fungo, surgem lesões secundárias ao longo do trajeto dos vasos linfáticos. A forma cutânea disseminada é caracterizada por múltiplas lesões cutâneas em locais não contíguos. O patógeno pode também causar lesões na mucosa nasal e na conjuntiva. Além da pele e mucosas, o fungo pode se desenvolver em órgãos como os ossos e pulmões, originando as formas extracutâneas (BARROS et al., 2010).

Assim, os sinais clínicos nos gatos vão desde uma única lesão até lesões múltiplas e formas sistêmicas, geralmente fatais (SCHUBACH et al., 2004; NUNES, et al., 2011). Lesões múltiplas em pele e mucosas estão entre as principais manifestações clínicas, podendo ser ulceradas com liberação de exsudato castanho-escuro, nodulares com comprometimento de vasos linfáticos adjacentes ou eritematosas (PIRES, 2017). Também são observadas linfadenite, linfangite nodular ascendente, além de regiões de necrose que podem expor a musculatura e ossos (COLODEL et al., 2009; LARSSON, 2011).

Sinais extracutâneos podem ou não estar presentes na esporotricose felina. Quando ocorrem, geralmente são alterações respiratórias como espirros e coriza, porém diversas áreas podem ser acometidas como pulmão, fígado, rins, articulações, sistema nervoso central e trato gastrointestinal. Emagrecimento, febre, depressão, letargia e anorexia também podem ser observados (SCHUBACH et al., 2004; COLODEL et al., 2009).

Gatos machos adultos, bem como, não castrados e de livre acesso a rua apresentam maior predisposição a doença, além de contribuírem com a transmissão aos humanos e ao ambiente. Esse fato está relacionado ao comportamento desses felinos, como o hábito de afiar as garras em vegetais, escavar o solo para encobrir as fezes e brigas durante o acasalamento ou disputas territoriais (NUNES et al.,

2011). Em consequência das brigas, são observadas com frequência lesões nos membros, cauda e na região da cabeça, principalmente nariz e orelhas (Figura 4). Cerca de 40% dos animais acometidos apresentam lesões cutâneas em três ou mais localizações não contínuas (SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2011).



Figura 4. Lesões cutâneas em gatos atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de São José do Rio Preto. A: lesão ulcerada em cavidade oral. B: lesão ulcerada em região nasal. C: lesões na região da cabeça. D: lesão ulcerada em membro posterior.

Fonte: Centro de Controle de Zoonoses de São José do Rio Preto.

A intensa carga do fungo encontrada nas lesões, bem como nas unhas, justifica o sucesso da atuação desses animais na transmissão do agente. Em exames histopatológicos e citopatológicos de exsudatos lesionais, empregados no diagnóstico presuntivo da doença (PEREIRA et al., 2011), é observado uma alta quantidade de leveduras (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2016). Para o

diagnóstico definitivo, é necessário o isolamento do fungo em cultura, metodologia considerada padrão-ouro (RIPPON, 1988).

Casos clínicos mais agressivos em gatos, geralmente apresentam granulomas malformados com grande quantidade de leveduras no exame histopatológico (MIRANDA et al., 2013). A existência demasiada de leveduras também está associada ao predomínio de macrófagos, enquanto que a maior presença de células epitelióides é correlacionada com baixa carga fúngica (BAZZI et al., 2016). O diagnóstico citopatológico é utilizado rotineiramente na prática clínica veterinária, preparado a partir do *imprint* das lesões em lâminas coradas, onde pode ser evidenciada grande quantidade de estruturas leveduriformes arredondadas, ovais ou em forma de charuto dentro dos macrófagos e neutrófilos ou extracelularmente (PEREIRA et al., 2011; MACÊDO-SALES et al., 2018).

Na cultura, o fungo é isolado em temperatura abaixo de 37 °C na forma filamentosa e a 37 °C na forma de levedura (PEREIRA et al., 2011). São utilizados meios de cultura ricos como ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol ou ágar Mycosel, com tempo de incubação em torno de 5 a 7 dias. A colônia filamentosa resultante com o tempo adquire a capacidade de produzir melanina. A conversão do fungo para a fase leveduriforme é obtida através da inoculação em meio de infusão de cérebro e coração (*brain heart infusion* - BHI) com incubação a 37°C por cinco a sete dias, adquirindo a coloração amarelada e aspecto cremoso (RIPPON, 1988; BARROS et al., 2010).

Para a identificação a nível de espécie, torna-se necessário a aplicação de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares (OLIVEIRA et al., 2011a). Diferentes amostras biológicas podem ser utilizadas no isolamento do fungo, como exsudato de lesões obtidas através de um *swab* estéril (PEREIRA et al., 2011). Também podem ser analisados fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas obtidos por biópsia, aspirado purulento proveniente de abscesso, sangue, unhas, secreções nasais e orais (SCHUBACH et al., 2002).

2.7. Aspectos terapêuticos

O tratamento da esporotricose felina, em muitos casos, é um desafio para os veterinários e requer um longo período de uso de antifúngicos (PEREIRA et al.,

2010). A administração por via oral é difícil e exige o confinamento do animal, o que leva a baixa adesão dos proprietários no tratamento dos seus *pets*, acarretando no abandono e na solicitação de eutanásia (CHAVES et al., 2013; CRUZ, 2013; REIS et al., 2016). Além disso, as opções terapêuticas são limitadas e as drogas utilizadas apresentam variados efeitos adversos (GREMIÃO et al., 2011).

Protocolos terapêuticos para animais não são completamente consolidados e os que estão preconizados apresentam, por vezes, uma baixa efetividade (PEREIRA et al., 2010; GREMIÃO, 2011). Até mesmo os esquemas de tratamento para humanos, recomendados pela Infectious Diseases Society of America, são empíricos, baseados em relatos de casos, revisões e ensaios não randomizados (KAUFFMAN et al., 2007).

O número de fármacos existentes com ação antifúngica é diminuto quando comparado às drogas antibacterianas (REIS-GOMES et al., 2012). Dentre os antifúngicos empregados no tratamento da esporotricose estão os azólicos itraconazol (ITZ) e cetoconazol (KTZ), os iodetos de potássio (IK) e sódio, a anfotericina B (AMB) e a terbinafina (TBF) (PEREIRA et al., 2010; MAHAJAN et al., 2014). Estudos realizados com gatos oriundos da epidemia do Rio de Janeiro encontraram percentuais de cura clínica entre 28,6% e 47,9%, para tratamentos com antifúngicos azólicos e iodeto de potássio (PEREIRA et al., 2010; REIS et al., 2012).

Outros recursos terapêuticos, como a terapia de calor local, a remoção cirúrgica das lesões (PEREIRA et al., 2009) e a criocirurgia (SECCHIN et al., 2017) também são aplicados no tratamento dos felinos domésticos.

2.7.1. Iodeto de potássio

O tratamento da esporotricose iniciou-se com o uso do iodeto de potássio, empregado por Beurmann e Ramond, em 1903, no tratamento de humanos. O uso desse fármaco ainda é considerado no tratamento de formas cutâneas fixas e linfocutâneas, devido ao baixo custo e efetividade (YAMADA et al., 2011; COSTA et al., 2013), porém não é efetivo em casos mais complicados, como nas formas extracutâneas (MAHAJAN, 2014).

O iodeto de potássio pertence ao grupo dos iodetos inorgânicos, sendo constituído de 76% de halogênio-iodo e 23% de metal alcalino potássio, é

fotosensível e altamente solúvel em água (STERLING; HEYMANN, 2000). Seu mecanismo de ação ainda não é bem definido, entretanto, acredita-se que os compostos iodados tenham ação direta no patógeno causando dano tecidual e o potássio auxilie na resposta imunológica do hospedeiro (HIMURA; KAGAWA, 1987). Assim, sugere-se que este fármaco atue na modulação da resposta inflamatória e no aumento da resposta imune (MARANI; VENTURI, 1986; COSTA et al., 2013).

A dose de 10 a 20 mg/kg de iodeto de potássio é recomendada para o tratamento da esporotricose felina, sendo administrada por via oral de 12 h em 12 h ou de 24 h em 24 h, havendo relatos de cura clínica em gatos com o uso de 10 mg/kg a cada 12 h (SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2009). Porém, os gatos podem não responder ao tratamento e evoluírem com piora clínica ou óbito, por sua sensibilidade aos iodetos. Principalmente nesses casos, os animais podem apresentar uma intoxicação denominada iodismo, derivando sintomas como: depressão, anorexia, vômito, diarreia, icterícia, descamação de pele, hiperemia, tremores e insuficiência cardíaca (NOBRE et al., 2002; SCHUBACH; MENEZES; WANKE, 2015).

A substituição dos iodetos pelos azóis é recomendada para melhor efetividade e segurança nos casos que ocorram efeitos adversos graves. Em casos refratários aos azólicos, a terapia combinada entre iodeto de potássio e itraconazol pode ser adotada (WELSH, 2003; GREMIÃO et al., 2015). Reis e colaboradores (2016) observaram uma melhor eficácia no tratamento combinado, havendo ação de início mais rápida e moderados efeitos adversos. Nesse estudo, os gatos foram tratados com 100 mg de ITZ e, inicialmente, 2,5 mg/kg de IK, com aumento progressivamente até uma resposta clínica ou até a dose atingir 20 mg/kg. Como resultado, encontrou-se 96,15% de cura clínica e 50% dos casos ocorreram efeitos adversos.

2.7.2. Itraconazol

No tratamento da esporotricose humana o itraconazol é o medicamento preconizado para as formas cutâneas, linfocutâneas, pulmonares e osteo-articulares. No acometimento pulmonar, disseminado e nos casos de meningite, seu uso é indicado em associação com a anfotericina B (KAUFFMAN et al., 2007). Na

medicina veterinária, esse tem sido utilizado com sucesso no tratamento de diversas micoses em gatos, sendo considerado o principal fármaco na maioria dos casos de esporotricose, mesmo com seu alto custo. Alcançando bons níveis de eficácia e segurança, além de ter baixa toxicidade e boa tolerância, mesmo em longos períodos de uso (PEREIRA et al., 2009; GREENE, 2012).

O itraconazol é um triazólico de primeira geração, pertencente assim à classe dos azólicos, grupo de compostos sintéticos de estruturas químicas semelhantes, na qual agem inibindo a enzima 14 α -demetilase, presente no citocromo P-450 da célula fúngica, impedindo a demetilação do precursor lanosterol. Consequentemente, ocorre a inibição da biossíntese do ergosterol, interferindo na composição e fluidez das membranas fúngicas, que perdem a capacidade de atuarem como barreiras de permeabilidade (GLUJOY et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2016).

No tratamento de gatos, é recomendado dosagens de 5 a 10 mg/kg, administradas por via oral, com intervalos de administração entre 12 ou 24 h. O período de tratamento é longo e deve estender-se por pelo menos um mês após a remissão clínica completa para obter a cura micológica (SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2009). Em casos refratários ao tratamento convencional com itraconazol, opções terapêuticas alternativas podem ser adotadas, como associação do itraconazol com outras drogas antifúngicas (ROCHA, 2014). GREMIÃO et al. (2011) analisaram a eficácia do uso da anfotericina B intralesional combinada ao uso oral de itraconazol em 26 gatos com esporotricose refratária, apresentando lesões cutâneas persistentes. A pesquisa verificou a remissão clínica em 84,6% dos casos.

2.7.3. Cetoconazol

Outro agente antifúngico azólico, porém do grupo do imidazólicos, empregado no tratamento da esporotricose é o cetoconazol. Assim, quando o fungo é exposto à concentração adequada dessa droga, sofre alterações estruturais e funcionais em suas membranas, provenientes da inibição da síntese de ergosterol (BORBA-SANTOS et al., 2016). Os azólicos tornaram-se os antifúngicos mais recomendados para o tratamento da esporotricose, sendo o cetoconazol o primeiro azólico utilizado na terapêutica desta micose (KAUFFMAN et al., 2007).

Entretanto, os resultados do seu uso no tratamento da esporotricose humana são limitados e sua baixa efetividade somada a diversos fatores adversos fez com que o cetoconazol não seja mais recomendado. Para a terapêutica dos animais, esse fármaco é mais difundido, embora existam poucos relatos para a esporotricose felina (KAUFFMAN et al., 2007; PEREIRA et al., 2009). Nas infecções por *Sporothrix*, são recomendadas dosagens entre 6 mg/ml até concentrações iguais ou maiores que 100 mg/ml, sendo sugeridas doses de 5-30 mg/kg/dia para cães e gatos (NOBRE et al., 2002).

Pereira et al. (2010) avaliaram a efetividade do tratamento com os azólicos cetoconazol e itraconazol em 773 gatos com esporotricose. Destes animais, 30,8% obtiveram cura com uma média de 28 semanas de tratamento, 13,6% foram a óbito por diferentes causas e 55,6% abandonaram ou ainda estavam em tratamento no momento da análise. Com esses resultados, administração de cetoconazol (13,5 a 27 mg/kg) apresentou menor efetividade e maior quantidade de efeitos colaterais, como perda de apetite, vômitos e diarreia, quando comparado ao itraconazol (8,3 a 27,7 mg/kg).

2.7.4. Terbinafina

A terbinafina é um antifúngico pertencente à classe das alilaminas, que apresenta alta atividade *in vitro* contra isolados de *Sporothrix* sp. Com apresentações orais e tópicas, este antifúngico age inibindo a enzima esqualeno epoxidase, que por consequência bloqueia a biossíntese do ergosterol, além de ocasionar um acúmulo tóxico de esqualetto na parede da célula fúngica, resultando em efeitos fungicidas e fungistáticos (DARKER; SCOTT; GOA, 2003; MAHAJAN, 2014).

No tratamento de humanos, esse medicamento é utilizado principalmente na impossibilidade de utilização de itraconazol, e apresenta elevada efetividade na concentração de 250 mg/dia. Entretanto, sua resposta terapêutica é considerada satisfatória somente para as formas cutâneas e linfocutâneas (FRANCESCONI et al., 2009). Seu sucesso como tratamento alternativo já foi relatado em casos humanos com recidivas após o uso de itraconazol e iodeto de potássio (HEIDRICH et al., 2011).

Na terapêutica dos felinos domésticos, o uso da terbinafina deve ser considerado em casos de resistência ou intolerância ao itraconazol (LLORET et al., 2013). Alguns estudos *in vitro* já demonstraram a boa atividade desse fármaco contra o *Sporothrix* (MEINERZ et al., 2007). Em estudos de toxicidade animal, foi observado que as reações adversas e interações medicamentosas são menores quando comparado aos azólicos (JAHAM; PARADIS; PAPICH, 2000).

2.7.5. Anfotericina B

A anfotericina B é um antifúngico macrolídeo poliênico, produzido pelo actinomiceto *Streptomyces nodosus*. A ação antimicrobiana deste grupo de fármacos consiste na alteração da permeabilidade celular da membrana fúngica, na qual os efeitos celulares da anfotericina B dependem de vários fatores, como a fase de crescimento das células fúngicas, a dose e a forma de administração (ROCHA; SIDRIM, 1999; CATALÁN; MONTEJO, 2006).

Essa droga pode agir como fungistática ou fungicida, dependendo da sensibilidade do fungo e da concentração do fármaco. O efeito fungistático ocorre em doses mais baixas, quando a anfotericina B liga-se de forma reversível a membrana do fungo, provocando aumento da permeabilidade. Em altas concentrações, a ligação à membrana fúngica é irreversível e requer gasto energético, causando a morte celular a partir das alterações físico-químicas nessas estruturas (LYMAN; WALSH, 1992).

A anfotericina B possui maior afinidade pelo ergosterol dos fungos do que pelo colesterol das células mamíferas. Entretanto, o seu principal efeito colateral é a nefrotoxicidade, justamente resultante da sua ligação ao colesterol (ROCHA; SIDRIM, 1999). Apesar disso, é recomendada como primeira escolha no tratamento da esporotricose humana para os casos em gestantes e nas formas mais graves da doença, principalmente em crianças. Recomenda-se, ainda, nas formas clínicas disseminadas em crianças, a realização da terapia inicial com anfotericina B seguida pelo itraconazol como terapia progressiva (KAUFFMAN et al., 2007).

Na medicina veterinária, o uso da anfotericina B ainda é restrito, apresentando poucos relatos do seu uso em animais. Em casos de esporotricose felina com falência terapêutica ao itraconazol, a associação da anfotericina B, via

subcutânea ou intralesional, pode ser utilizada como uma alternativa de tratamento (GREMIÃO et al., 2009). Estudos, como de Gremião et al. (2011), descrevem o sucesso da terapia em gatos utilizando a anfotericina B intralesional associada ao itraconazol por via oral.

2.8. Aspectos imunológicos

A instalação e evolução das infecções fúngicas estão estreitamente relacionadas às condições do sistema imunológico do hospedeiro. Em humanos, algumas condições, como AIDS, quimioterapia para tratamento do câncer e procedimentos hospitalares invasivos, como o uso de cateteres, contribuíram significativamente para o aumento no número de casos (ALMEIDA et al., 2018). Em gatos, a imunodepressão geralmente está associada à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV) e Vírus da Leucemia Felina (FeLV) (PEREIRA et al., 2010).

Na esporotricose, a interação patógeno-hospedeiro tem início após o fungo ultrapassar a primeira linha de defesa, que envolve a pele e mucosas. O sistema imunológico inato do hospedeiro elimina as células fúngicas através da fagocitose realizada pelos macrófagos e neutrófilos, e também pela produção de espécies reativas de oxigênio (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2014; MORA-MONTES et al., 2015).

A parede celular do *Sporothrix* é a principal estrutura envolvida no processo imunopatológico, na qual apresentam receptores que são reconhecidos pelos macrófagos, desencadeando a secreção de citocinas como IFN- β , IFN- γ , TNF- α e IL-17A, responsáveis pelo recrutamento de células fagocíticas (KAJIWARA et al., 2004; UENOTSUCHI et al., 2006).

Além da imunidade mediada por células, a resposta do hospedeiro contra fungos patogênicos também envolve a imunidade humoral, que se refere à ação de anticorpos. Neste contexto, a aglutinação de células fúngicas, opsonização, neutralização de moléculas imunorreguladoras, ativação do complemento, inibição da ligação de células fúngicas e citotoxicidade celular estão entre os principais mecanismos de ação humoral contra patógenos (ALMEIDA et al., 2014; PORTUONDO et al., 2016).

A resposta humoral contra o fungo *Sporothrix* ainda não é totalmente conhecida (ALMEIDA, 2012; RODRIGUES et al., 2015a). Sabe-se que anticorpos IgG, IgM e IgA contra exoantígenos miceliais podem ser detectados durante o tratamento da esporotricose, porém diminuem ao longo da terapia. Contudo, os níveis desses anticorpos diferem entre as formas clínicas da doença. Diferente das formas cutâneas disseminadas e extracutâneas, pacientes com esporotricose cutânea e linfocutânea fixa não apresentam níveis altos de anticorpos (ALMEIDA-PAES et al., 2007).

Essas diferenças de concentrações de anticorpos entre as formas clínicas podem ser explicadas pela carga fúngica. Em casos mais graves, há uma maior quantidade de fungos, o que leva à apresentação contínua de antígenos e, conseqüentemente, à produção contínua de anticorpos. Ressaltando que cada tipo de anticorpo desempenha um papel importante na patogênese da doença. O IgM, por exemplo, ativa a via clássica do sistema complemento e o IgA participa na defesa em mucosas (ALMEIDA-PAES et al., 2007).

Certas proteínas presentes na parede celular e moléculas secretadas durante a infecção são altamente imunogênicas, estimulando a produção de anticorpos (ALBA-FIERRO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015a; PORTUONDO et al., 2016). Em sua forma leveduriforme, as proteínas de 60 e 70 kDa são conhecidas como os principais antígenos, já para o *Sporothrix* micelial, são descritos cinco importantes antígenos, as proteínas de 48, 55, 66, 67, 70 kDa. A proteína de 70 kDa, presente nas duas morfologias, acredita-se ser a Gp70, sendo a principal molécula antigênica estudada (RUIZ-BACA et al., 2011). Essa glicoproteína aparenta ser um importante fator de virulência, já que sua secreção é verificada em cepas que são consideradas mais virulentas (ALMEIDA et al., 2017).

Estudos recentes produziram anticorpos monoclonais contra Gp70, denominados P6E7, visando à produção de vacinas contra a esporotricose. Em modelo experimental, camundongos infectados com cepas de alta virulência receberam o este anticorpo antes, durante e após a infecção, sendo visualizada uma diminuição da carga fúngica ao examinar os órgãos dos animais acometidos. A queda do número de células fúngicas no baço resulta em melhor prognóstico, porém foi visualizada até o 21º dia de infecção. No fígado, essa diminuição ocorreu apenas no estágio inicial da infecção, indicando que mais doses, ou em maiores

concentrações, poderiam gerar um melhor controle da infecção (ALMEIDA et al., 2017).

Almeida et al. (2018) identificaram possíveis peptídeos promissores na produção de vacina. Os peptídeos ZR3, ZR4 e ZR8 como vacina diminuíram o diâmetro das lesões em camundongos imunizados, indicando uma indução da resposta imunitária protetora contra esporotricose subcutânea causada por *S. brasiliensis*. Esses são resultados promissores, contudo o desenvolvimento de vacinas contra infecções fúngicas ainda é um desafio, dada a relativa complexidade genética das células fúngicas eucarióticas.

As maiores descobertas do processo imunopatológico da esporotricose envolvem estudos em humanos, havendo assim, poucas informações acerca da esporotricose felina (CARNERO et al., 2018). Porém, sabe-se que nos gatos aparecem os mesmos antígenos reconhecidos pela IgG humana. Assim, as principais moléculas antigênicas reconhecidas pelos anticorpos felinos são Gp60 na infecção pelo *S. brasiliensis* e Gp70 no *S. schenckii* (RODRIGUES et al., 2015b).

Ao contrário da esporotricose humana e canina, na qual as lesões cutâneas apresentam baixa carga de leveduras, as lesões da esporotricose felina possuem alta carga fúngica (MIRANDA et al., 2016). No entanto, ainda não há associação entre a gravidade, número e distribuição das lesões nos gatos com os mecanismos imunológicos (RODRIGUES et al., 2015b). Acredita-se que a elevada carga pode estar relacionada à granulomas malformados, sugerindo que a resposta imune celular está envolvida no controle da doença em gatos (MIRANDA et al., 2013).

Casos de esporotricose felina com granulomas malformados e elevada carga de fungos geralmente apresentam contagens baixas de células CD8. Em contrapartida, lesões únicas com inflamação organizada e menor carga fúngica há correlação com aumento de células CD4 (MIRANDA et al., 2016).

Em modelo murino experimental de imunodeficiência mediada por células, ocorre o desenvolvimento de granulomas que dificultam a fagocitose das células fúngicas (MIYAJI, NISHIMURA, 1982). Camundongos imunocompetentes infectados por *S. schenckii* apresentam lesões com formação de granulomas e fragmentação de leveduras, ao passo que os animais imunodeficientes as formas leveduriformes permanecem intactas durante todo o período de observação (PENG-CHENG et al., 1993).

3. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A esporotricose no Brasil, desde sua descrição por Lutz e Splendore em 1907, tem sido relatada em casos isolados, surtos ou epidemias em diversas localidades. O estado do Rio de Janeiro, em especial a cidade do Rio de Janeiro e arredores, enfrenta, desde a década de 1990, a maior epidemia brasileira dessa zoonose (PEREIRA et al., 2014).

O Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/ Fundação Oswaldo Cruz registrou 759 casos de esporotricose em humanos e 1503 em gatos no período de 1998 a 2004 (FREITAS et al., 2010). Já nos últimos anos, entre 2015 e 2018, foram confirmados mais de 3.500 casos humanos, conforme o boletim epidemiológico da Secretaria Estadual de Saúde do RJ, enfatizando a importância crescente dessa micose como problema de saúde pública.

A ocorrência da doença na forma de surtos em outros estados, como Rio Grande do Sul (SANCHOTENE et al., 2015) e São Paulo (MONTENEGRO et al., 2014), comprovam a circulação do fungo e o potencial de disseminação da esporotricose para outras localidades. Ressalta-se também a influência dos gatos nestes surtos, já que há a correlação deste animal com o aumento no número de casos em humanos.

A esporotricose felina apresenta-se como um desafio a ser superado, não apenas por sua casuística, mas também por fatores relacionados ao tratamento e manejo dos animais afetados. O alto custo dos medicamentos associado ao longo período de tratamento torna-se um ponto desfavorável, principalmente para tutores de baixa renda. Outro fator impactante é a interrupção do tratamento, seja pelo abandono ou pela falsa interpretação de cura baseada na cicatrização das lesões; contexto que resulta na reincidência da doença e seleção de resistência aos antifúngicos (ROCHETTE; ENGELEN; VANDEN BOSSCHE, 2003; CHAVES et al., 2013).

O manejo dos gatos afetados é por vezes complicado, havendo a possibilidade de contaminação no momento da administração de medicamentos ou nos cuidados com as lesões (BARROS et al., 2010; CRUZ, 2013). O abandono de animais doentes em vias públicas e o descarte inadequado de suas carcaças promovem a liberação do fungo no meio ambiente, colaborando também na

disseminação da esporotricose (BARROS et al., 2010; CHAVES et al., 2013; CRUZ, 2013).

Assim sendo, a esporotricose é considerada uma importante enfermidade emergente, com a necessidade de ações de saúde pública, que visem o controle da doença, especialmente em áreas endêmicas (SILVA et al., 2012). A falta de conhecimento do número de casos e do comportamento da doença pode acarretar no seu descontrole. Municípios onde não há notificação compulsória ou epidemias visivelmente instaladas, a real ocorrência da doença pode estar sendo subestimada, deixando de identificar o início de possíveis surtos e endemias.

Estudos acerca dos fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos contribuem no estabelecimento de ações de controle da doença. Com isso, surtos e epidemias podem ser evitados através de melhorias nas políticas públicas de saúde. Além disso, contribuem na capacitação dos profissionais de saúde, no desenvolvimento de políticas públicas e de programas para conscientização da população.

Pelo acima exposto, este estudo apresenta relevância fundamental para o conhecimento dos fatores envolvidos nos casos de esporotricose em felinos domésticos, buscando contribuir para a melhor compreensão da doença e para o desenvolvimento de estratégias de saúde pública no município de São José do Rio Preto/SP, onde o aumento dos casos de esporotricose felina está sendo observado pelos profissionais do Centro de Controle de Zoonoses e de clínicas veterinárias.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O presente estudo busca identificar casos de esporotricose em gatos no município de São José do Rio Preto/SP, por meio do isolamento do fungo *Sporothrix* em amostras clínicas de animais sintomáticos e avaliar os fatores micológicos, epidemiológicos e clínicos relacionados à doença.

4.2. Objetivos específicos

- a) Diagnosticar a esporotricose a partir de amostras clínicas de felinos domésticos sintomáticos utilizando técnicas micológicas.
- b) Identificar os isolados do complexo *S. schenckii* com base em critérios morfológicos, fisiológicos e moleculares.
- c) Determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos itraconazol, cetoconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B.
- d) Avaliar os aspectos epidemiológicos e clínicos associados à esporotricose a partir de dados informados em fichas de investigação.
- e) Determinar as áreas de ocorrência da esporotricose no município de São José do Rio Preto/SP, com base em métodos de georreferenciamento.

5. MATERIAL E MÉTODOS GERAIS

5.1. Comissão de ética em pesquisa

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) em reunião ordinária sob o número de protocolo 001-001592/2018 (Anexo A). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) foi preenchido e assinado pelos proprietários dos animais no momento da coleta. No caso dos animais de rua, que não possuem um proprietário, o emprego do termo foi dispensado.

5.2. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo analítico transversal delineado para identificar casos de esporotricose em felinos no município de São José do Rio Preto/SP a partir do isolamento do fungo *Sporothrix* sp. em amostras de secreção e/ou biópsia de animais sintomáticos, errantes, domiciliados ou semidomiciliados.

5.3. Coleta das amostras

As amostras foram coletadas por médicos veterinários do CCZ e de clínicas veterinárias (CLV) particulares por técnicas já utilizadas na rotina clínica e padronizadas pela Medicina Veterinária. A participação das CLV's na pesquisa foi aberta a todas as clínicas do município, mediante comunicado e reuniões com a Associação de Médicos Veterinários de São José do Rio Preto. Assim, seis CLV's enviaram amostras biológicas de gatos com suspeita de esporotricose.

Durante o período de coleta de 18 meses, entre setembro de 2017 e fevereiro de 2019, 245 amostras foram coletadas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia - FAMERP para as análises. As características clínico-epidemiológicas associadas aos casos de esporotricose foram determinadas com base nas informações presentes em fichas de investigação formuladas (Apêndice B).

As coletas das amostras e o acondicionamento adequado das mesmas, bem como, o preenchimento das fichas de investigação foram de responsabilidade dos

médicos veterinários. Após a coleta, os *swabs* e/ou biópsias foram introduzidas em tubos de ensaio contendo caldo sabouraud dextrose (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) identificados com numeração específica, e então, encaminhados em caixas de transporte de material biológico para o Laboratório de Microbiologia (FAMERP), conforme fluxograma estabelecido (Apêndice C).

5.4. Isolamento fúngico

Para possibilitar o isolamento de *Sporothrix* spp., as amostras foram inoculadas em três tubos distintos, contendo ágar sabouraud dextrose (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK), ágar sabouraud dextrose (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) acrescido de ciprofloxacina 2 mg/ml (0,2%) (Genérico - Isofarma, Precabura Eusébio, Ceará, Brasil) e ágar mycobiotic (Himedia, Mumbai, Índia).

As culturas foram incubadas em temperatura ambiente (25-30 °C) e observadas diariamente até a formação de colônias. Na fase micelar, o crescimento é relativamente lento e suas colônias são enrugadas com cor creme, inicialmente, depois se tornam acastanhadas a enegrecidas devido à produção de melanina (Figuras 5A e 5B). Culturas positivas apresentando colônias com padrão morfológico sugestivas de *Sporothrix* spp. foram isoladas em ágar dextrose-batata (PDA) (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) e incubadas em estufa a 30 °C. Culturas sem o aparecimento de colônias após 30 dias foram consideradas negativas.

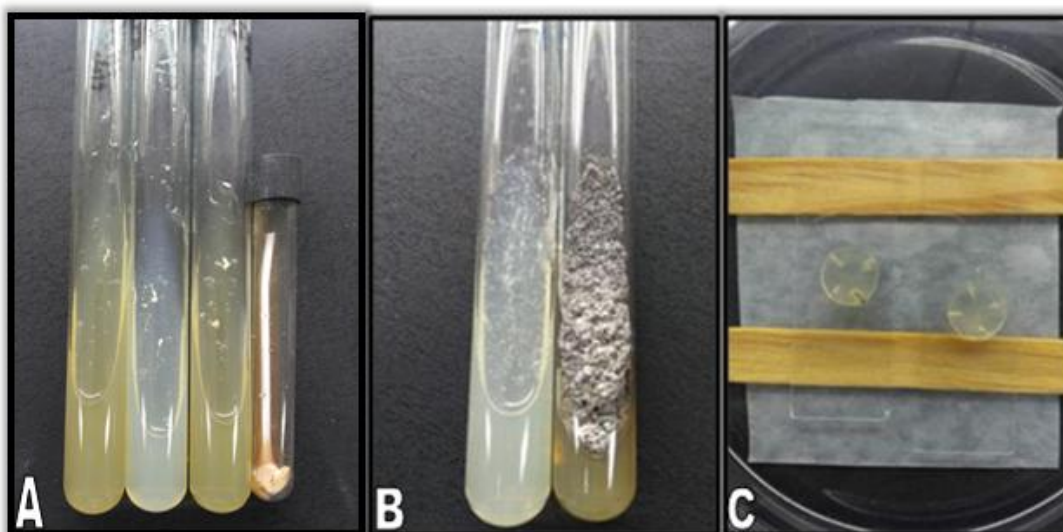


Figura 5. Processamento das amostras e isolamento de colônias. A: semeadura de biópsia em tubos contendo ágar sabouraud dextrose, ágar mycobiotic e ágar

sabouraud dextrose modificado com ciprofloxacina, caldo sabouraud dextrose contendo a biópsia (esquerda para direita). B: crescimento de colônias características de *Sporothrix*, tubo ágar mycobiotic (esquerda) com crescimento de 6 dias e tubo ágar sabouraud dextrose (direita) com crescimento de 20 dias. C: microcultivo com PDA em câmara úmida.

Fonte: Laboratório de Microbiologia – Famerp.

5.5. Caracterização fenotípica

Para melhor analisar o padrão morfológico das hifas, conidióforos e conídios, foram realizados microcultivo em lâmina utilizando PDA, com incubação em câmara úmida em temperatura ambiente (Figura 5C). Após 7 dias, as lâminas foram observadas em microscópio óptico, sendo visualizado hifas septadas e finas, conidióforos formados a partir das hifas, originando conídios nas extremidades que se arranjam em formato semelhante a uma flor margarida, característico de *Sporothrix* spp.

A caracterização fenotípica para identificação da espécie foi obtida através da análise dos aspectos morfofisiológicos possibilitando a diferenciação das espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, conforme descrição de Marimon et al. (2006, 2007) (Tabela 3). Para as análises fenotípicas foram utilizados como isolados iniciais as colônias em PDA com crescimento de 7 dias a uma temperatura de 30 °C. Ressalta-se que todos os testes fenotípicos foram executados e analisados obedecendo ao princípio do observador dependente.

Tabela 3: Aspectos morfofisiológicos chaves para a diferenciação das espécies do complexo *S. schenckii*.

Espécie	Presença de conídios pigmentados sésseis	Colônias excedem 50 mm em 21 dias	Crescimento a 37 °C	Teste de assimilação	
				Sacarose	Rafinose
<i>S. brasiliensis</i>	SIM	NÃO	SIM	-	-
<i>S. luriei</i>	NÃO	NÃO	SIM	-	-
<i>S. globosa</i>	SIM	NÃO	NÃO	+	-
<i>S. mexicana</i>	SIM	SIM	SIM	+	+
<i>S. schenckii</i>	SIM	NÃO	SIM	+	+
<i>S. albicans</i>	NÃO	SIM	SIM	+	-

Fonte: adaptação Marimon et al. (2006, 2007).

5.5.1. Diâmetro das colônias e dimorfismo fúngico

Membros do complexo *Sporothrix schenckii* possuem a capacidade de desenvolvimento em diferentes temperaturas, o que reflete no diâmetro de suas colônias. Para analisar essa propriedade, foram utilizados os métodos descritos por Marimon e colaboradores (2007).

Utilizaram-se placas de Petri (90 mm x15 mm) contendo 20 ml de PDA para inocular um fragmento de aproximadamente 1 mm de diâmetro dos isolados clínicos. O tamanho do fragmento foi respeitado em todas as sementeiras para garantir a padronização das colônias a serem mensuradas. Cada isolado foi inoculado em duas placas distintas, sendo uma incubada em estufa a 30 °C e a outra a 37 °C. O diâmetro resultante foi mensurado após 21 dias de incubação com auxílio de régua e os valores obtidos foram tabulados em planilhas para análise.

O dimorfismo fúngico dos isolados foi observado através da conversão da forma filamentosa para forma leveduriforme. Para isso fragmentos miceliais foram estriados em placas com ágar BHI (Oxoid, Basingstoke, Hants, UK) com incubação em estufa a 37 °C. Após 5 dias foi observado macroscopicamente as colônias e verificado a presença de leveduras através da confecção de lâminas a fresco.

5.5.2. Características micromorfológicas

A fim de estudar a conidiogênese e as características macroscópicas, os isolados foram cultivados em tubos com ágar *Corn Meal* (CMA) (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e incubados a 30 °C durante 12 dias. As colônias foram observadas macroscopicamente quanto ao seu aspecto e coloração, como a presença pigmentos negros que correspondem à produção de melanina. As características microscópicas, como a melanização de conídios sésseis, foram determinadas através da confecção de lâminas com o emprego de ácido láctico visualizadas em microscopia óptica em aumento de 400x (MARIMON et al., 2007).

Em microscopia óptica é possível visualizar hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas de onde partem os conidióforos delgados do tipo simpodial, que originam conídios hialinos ou demáceos dispostos em formato floral, podendo ser globosos, ovais, alongados ou triangulares. Além do mais, conídios sésseis

pigmentados e de parede celular espessa também podem ser observados, estes estão arrançados em ambos os lados das hifas ligados por pequenos dentículos ou simplesmente agrupados (OROFINO-COSTA et al, 2017). A presença ou ausência de conídios sésseis pigmentados é uma importante característica para a distinção entre as espécies de *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007).

5.5.3. Assimilação de carboidratos

A capacidade assimilativa dos isolados frente às fontes carbonadas foi analisada conforme procedimento descrito por Marimon et al. (2007), analisando a assimilação dos açúcares glicose (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil), sacarose (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) e rafinose (Vetec Química, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil). Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno de 96 poços estéreis, sendo acrescentado aos poços 100 µl de caldo *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (0,5 g sulfato de magnésio, 1,0 g fosfato de potássio e 5,0 g sulfato de amônio para 1.000 ml de água destilada).

Os açúcares foram utilizados a uma concentração de 0,5%, sendo a glicose usada como controle positivo de assimilação com adição de 50 µl deste açúcar nos poços das colunas 2, 6 e 10, já as colunas 1, 5 e 9 foram usadas como controle negativo possuindo 100 µl de água destilada e nenhuma fonte carbonada. A quantidade de 50 µl de sacarose foi adicionada nos poços das colunas 3, 7, 11 e o mesmo volume de rafinose nas colunas 4, 8, 12.

O inóculo foi preparado acrescentando 5 ml de água destilada estéril ao tubo de PDA (crescimento a 30 °C por 7 dias) com raspagem das colônias filamentosas utilizando alça descartável, posteriormente a suspensão formada foi filtrada com funil de papel filtro estéril. A suspensão de conídios foi ajustada a uma concentração de 2.10^5 até 2.10^6 UFC/ml, sendo verificada por leituras de densidade ótica a 530 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro com variação adequada entre 0,21 e 0,29.

Desta forma, após todas as amostras estarem na concentração desejada, aplicou-se 50 µl da solução do inóculo na placa já preparada com o meio de cultura e com os substratos carbonados, seguindo a sequência: controle negativo – controle positivo – sacarose – rafinose (Figura 6) e assim todos os poços atingiram um

volume total de 200 µl. As placas foram então incubadas em estufa a 30 °C com leitura após 5 e 10 dias.

	1 C-	2 GLI	3 SAC	4 RAF	5 C-	6 GLI	7 SAC	8 RAF	9 C-	10 GLI	11 SAC	12 RAF
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 6. Esquema de montagem da placa de assimilação de carboidratos. Disposição dos açúcares testados (sacarose – SAC e rafinose – RAF) e dos controles positivos (glicose – GLI) e negativos (C-) utilizados no teste de assimilação de carboidratos. Controle de qualidade do teste *Rhodotorula mucilaginosa*, inoculada nos poços A1 – A4. Cada cor representa um isolado testado.

Fonte: elaborado pelo autor.

Em todas as placas foi adicionado inóculo da cepa clínica de *Rhodotorula mucilaginosa* (espécime clínica 6658) por assimilar ambos os açúcares testados, sendo então o seu crescimento em todos os poços inoculados necessários para validar o teste (placa). A leitura das placas ocorreu de modo visual, sendo os resultados positivos evidenciados pelo crescimento fúngico na presença da fonte de carbono testada, ou seja, positivo com crescimento semelhante ao do meio com glicose e negativo aqueles semelhantes aos poços sem carboidrato.

5.6. Caracterização genotípica

A identificação molecular das espécies foi feita utilizando colônias identificadas por características morfológicas como *Sporothrix* spp. em fase filamentosa. Primeiramente, os isolados foram cultivados em PDA com incubação a 30 °C por 7 dias.

Para a extração de DNA utilizou-se o kit FastDNA[®] (MP Biomedical, Solon, Ohio, Estados Unidos da América), seguindo o protocolo de extração para DNA fúngico determinado pelo fabricante. A quantificação do DNA extraída foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América) com leituras a 260 nm e 280 nm, estabelecendo como valor padrão 1DO = 50 µg/ml de DNA dupla fita e o nível de pureza foi determinado pela relação DO 260/280 nm, sendo o ideal valores entre 1,7 e 2,0. As amostras com este perfil foram consideradas de boa qualidade, isentas de proteínas e outros resíduos.

As espécies do complexo *Sporothrix schenckii* possuem como principal fator de diferenciação molecular o polimorfismo na sequência de nucleotídeos do gene da calmodulina (CAL) (O'DONNELL, 2000; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2014). A amplificação dessa região do DNA genômico foi realizada pela técnica da PCR (*Polymerase Chain Reaction*) espécie-específico, possuindo como alvo de investigação as sequências genômicas pertencentes a duas espécies, *S. schenckii sensu stricto* e *S. brasiliensis* (RODRIGUES, DE HOOG, DE CAMARGO, 2015c).

Nas reações de pesquisa para *S. schenckii sensu stricto* foram utilizados os oligonucleotídeos Ssch-forward com a sequência 5'- TTT CGA ATG CGT TCG GCT GG - 3' e Ssch-reverse correspondendo 5' - CTC CAG ATC ACC GTG TCA - 3', que amplificam um fragmento de 331 pares de base (pb). Para *S. brasiliensis*, os oligonucleotídeos utilizados foram Sbra-forward de sequência 5' - CCC CCG TTT GAC GCT TGG - 3' e Sbra-reverse obedecendo a sequência 5' - CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT - 3', amplificando uma fração de 469 pb, conforme figura 8 (RODRIGUES, DE HOOG, DE CAMARGO, 2015c).

Utilizou-se um controle interno para assegurar e avaliar a qualidade da reação de PCR. Este controle trata-se de uma sequência de oligonucleotídeos que reconhece um seguimento genômico no operon comum a todos os fungos, ou seja,

na presença de qualquer DNA fúngico na amostra ocorrerá uma amplificação. Assim, os oligonucleotídeos utilizados foram: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG) e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). Além disso, foram incluídas amostras já identificadas genotipicamente como *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, funcionando como controles positivos. Os controles negativos utilizados não continham material genético, sendo utilizada água MilliQ estéril, para averiguar se houve contaminação durante a preparação da reação.

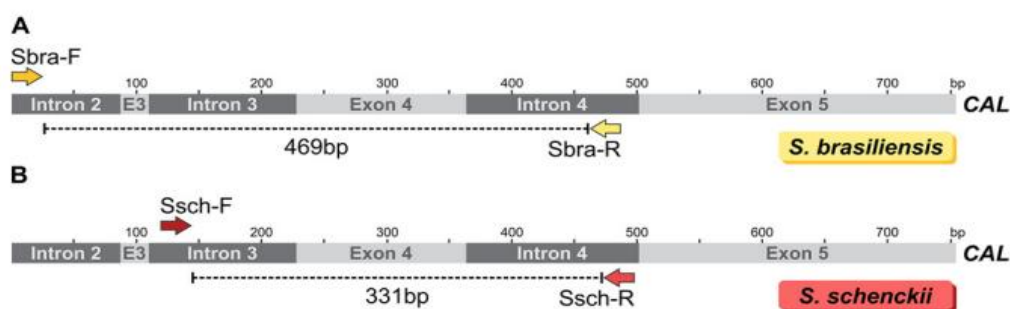


Figura 7. Região do gene da calmodulina (CAL) e locais de reconhecimento dos primers específicos para espécies *S. brasiliensis* (A) e *S. schenckii* (B).

Fonte: adaptado de Rodrigues, de Hoog, de Camargo, 2015c.

Para as reações de PCR, primeiramente, em um microtubo Eppendorf (200µl) foram adicionados, para cada amostra, 12,5 µl de PCR Master Mix (Promega®) contendo MgCl₂, dATP, dTTP, dCTP, dGTP e Taq polimerase, 8,5 µl de água MilliQ estéril, 1 µl do primer follow – Ssch ou Sbra (100 µmol/µl) e 1 µl do primer – Ssch ou Sbra reverse (100 µmol/µl), 0,5 µl do primer ITS-F e 0,5 µl do primer ITS-R e 1 µl de DNA de *Sporothrix* spp., perfazendo um volume total de 25 µl (RODRIGUES, DE HOOG, DE CAMARGO, 2015c).

Posteriormente, as amostras foram incubadas em termociclador (Eppendorf, Vapo Protect) utilizando um programa com desnaturação inicial a 95 °C por 4 minutos, 35 ciclos de desnaturação 94 °C com duração de 1 minuto, anelamento *touchdown* variando a temperatura entre 70-60 °C e polimerização a 72 °C por 1 minuto, para finalizar ocorre um período final de extensão com duração de 10 minutos a 72 °C (RODRIGUES, DE HOOG, DE CAMARGO, 2015c).

Os produtos finais da PCR retirados do termociclador foram aplicados em gel de agarose 2%. Para isso as amostras foram preparadas em uma microplaca estéril

de 96 poços, sendo pipetados 4 µl do produto da PCR com 6 µl de água MilliQ estéril e 2 µl de tampão de carga, constituído de xileno cianol, corante orange blue, bromofenol e gel red. Destas soluções, 10 µl foram inseridos nos orifícios presentes no gel de agarose juntamente com um marcador de peso molecular de 100 pb, importante deixar toda cuba submersa para a aplicação.

As amostras mais os controles foram então submetidas à eletroforese em tampão TBE 1X com parâmetros constantes de 100 V, 400 mA por 60 minutos, seguido da leitura em transiluminador de ultravioleta. Os padrões de banda gerados foram comparados com o controle positivo de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* para conseguir uma identificação em nível de espécie. Para validar a reação e aceitar os resultados referentes à identificação das espécies, foram necessárias as amplificações dos controles positivos juntamente com os controles internos ITS, além da não amplificação dos controles negativos.

5.7. Teste de suscetibilidade aos antifúngicos

Para verificar o perfil de suscetibilidade dos isolados frente a antifúngicos foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo com uso em microplacas de poliestireno contendo 96 poços. A escolha dos medicamentos foi baseada nos relatos da literatura e do uso dos fármacos no tratamento da esporotricose em gatos ao longo dos anos. Assim, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) dos antifúngicos: anfotericina B (Sigma, Alemanha), cetoconazol (Sigma, Alemanha), itraconazol (Sigma, Alemanha), iodeto de potássio (Sigma, Alemanha) e terbinafina (Sigma, Alemanha).

A montagem das placas e demais etapas da execução do teste de sensibilidade aos antifúngicos ocorreram com base no documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) (Figura 7). As placas foram preparadas com os antifúngicos em meio de cultura líquido RPMI-1640 (Sigma, Alemanha) tamponado com ácido morfopropileno sulfônico (MOPS) (Sigma, Alemanha) e suplementado com glicose 2%, ajustando-se o pH em 7,0 com ácido clorídrico.

Os antifúngicos AMB, KTZ, ITZ e TBF foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) (Labsynth, Diadema, São Paulo, Brasil) para formar a solução mãe na

concentração de 16.000 mg/l, que a partir desta, realizaram-se diluições seriadas em RPMI de modo que a concentração final obtida após a inoculação alcançasse o intervalo de 16 µl/ml a 0,03 µl/ml (CLSI, 2008). Para a diluição do iodeto de potássio utilizou-se água destilada estéril, formando a solução mãe na concentração de 1.000 mg/ml, as diluições ocorreram na placa contendo 100 µl de RPMI em cada poço de maneira que abrangesse o intervalo de concentração entre 250 mg/ml e 0,488 mg/ml após a adição do inóculo (SILVA, 2017).

Inicialmente, os isolados foram semeados em placas com PDA e incubados a 30 °C por 7 dias e, posteriormente, foram adicionadas 5 ml de salina estéril (NaCl 0,85%) com raspagem das colônias com alça descartável contendo 10 µl de Tween 20 para promover o desprendimento dos conídios. Esta suspensão foi recuperada e filtrada utilizando funis de papel filtro estéreis para reter hifas e artefatos, gerando assim uma suspensão apenas com conídios, que foi ajustada em uma concentração de $1.10^6 - 5.10^6$ UFC/ml utilizando câmara de Neubauer (CÓRDOBA et al., 2018).

A suspensão de conídios foi diluída em RPMI na proporção 1:50, da solução formada, inoculou-se 100 µl em cada poço contendo as diferentes concentrações do antifúngico testado, seguindo as colunas de 2 a 11. A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade possuindo somente 200 µl RPMI e a coluna 12 recebeu o controle de crescimento apresentando 100 µl do meio de cultura RPMI e 100 µl do inóculo, logo, não houve o acréscimo da droga testada.

Para controle de qualidade do teste executado foi incluindo o inóculo de *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em todas as placas. Ressalta-se que o teste de suscetibilidade a antifúngicos foi realizado em duplicata em todos os inóculos e as placas foram mantidas a 28 °C com leitura após 72 horas.

A determinação da CIM foi realizada por análise visual definindo como padrão comparativo de crescimento fúngico o poço com ausência do fármaco (controle de crescimento). A MIC para anfotericina B, iodeto de Potássio e itraconazol foi determinada como a menor concentração capaz de inibir completamente o desenvolvimento fúngico (100%), para terbinafina 80% de inibição e 50% para cetoconazol (CÓRDOBA et al., 2018). Os valores encontrados foram inseridos em planilhas Microsoft Office Excel® para calcular média geométrica, moda, intervalos, MIC₅₀ e MIC₉₀. Além disso, a partir da CIM encontrada para as drogas antifúngicas, as cepas foram categorizadas como selvagens (WT) ou não-WT de acordo com os

valores de cortes epidemiológicos (VCEs) propostos por Espinel-Ingroff e colaboradores (2017).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 8. Esquema da placa de 96 poços utilizada no teste de microdiluição em caldo. Coluna 1 destinada ao controle de esterilidade e coluna 12, controle de crescimento. Colunas de 2 a 11 usadas para as diluições dos antifúngicos. Linha A utilizada como controle de qualidade, com inoculação da *Candida parapsilosis* ATCC 22019. Linhas B a H destinadas aos inóculos de *Sporothrix*.

Fonte: elaborado pelo autor.

5.8. Georreferenciamento e aspectos clínicos e epidemiológicos

Para analisar os aspectos clínicos e epidemiológicos associados ao animal sintomático participante da pesquisa, foi formulada uma ficha de investigação, preenchida pelo médico veterinário. Nesse instrumento de coleta de dados, foi questionado:

- Origem do animal (animal domiciliado, semidomiciliado ou de rua),
- Localização do animal (animal domiciliado utilizado os dados do proprietário, animal de rua referenciado através do bairro na qual foi encontrado),
- Idade e sexo,
- Data de início do tratamento,

- Manifestação clínica das lesões,
- Nível e áreas de acometimento das lesões,
- Sintomas clínicos,
- Tratamento anterior à coleta com antifúngicos ou outras medicações,
- Acesso à rua,
- Castração,
- Indicação à eutanásia
- Indicação de diagnóstico diferencial.

As informações presentes nas fichas foram inseridas em planilhas do programa da Microsoft Office Excel[®]. A análise estatística descritiva foi realizada a partir dos cálculos das medidas de tendência central, de dispersão e contagens de frequências; nas análises das variáveis qualitativas foi utilizado o Teste de Qui-quadrado Clássico utilizando software PRISMA (versão 6.10, 2015). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

Além disso, através do bairro de localização do animal foi possível determinar a distribuição da doença na cidade de São José do Rio Preto, evidenciando as áreas e distritos de saúde com maiores concentrações de animais infectados, mediante a produção de mapas de georreferenciamento utilizando o programa MapInfo 17.0 (Pitney Bowes). Ressalta-se que as áreas e distritos de saúde mencionados tratam-se de agrupamentos estratégicos de bairros, que visam a organização dos serviços de saúde. Assim, segundo o decreto nº17.100/2014, o município de São José do Rio Preto é constituído por 27 áreas de abrangência distribuídas em 5 distritos de saúde.

Clinical and epidemiological aspects of feline sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* and in vitro antifungal susceptibility

Feline sporotrichosis by *S. brasiliensis*

Taiza Maschio-Lima¹, Mariela Domiciano Ribeiro Marques², Thiago Henrique Lemes¹, Natália Seron Brizzotti-Mazuchi², Maicon Henrique Caetano¹, Bianca Gottardo de Almeida¹, Letícia Bianco Monteiro¹, Elza Maria Castilho², Ruan Campos Monteiro³, Anderson Messias Rodrigues³, Zoilo Pires de Camargo³, João Paulo Zen Siqueira², Margarete Teresa Gottardo de Almeida^{1,2}.

1. Universidade Estadual Paulista – UNESP, Instituto de Biociências, Humanas e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, Brazil.
2. Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP, São José do Rio Preto, Brazil.
3. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida.

São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP). Department of Dermatological, Infectious, and Parasitic Diseases. Brigadeiro Faria Lima Av., 5416, 15090-000, São José do Rio Preto, Brazil.

Telephone: +55 17 3201-5843

E-mail: margarete@famerp.br

Acknowledgments: Authors would like to thank the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES) for the financial support, and to the Laboratory of Microbiology of the São José do Rio Preto School of Medicine (FAMERP) and Laboratory of Emerging Fungal Pathogens of the Federal University of Sao Paulo (UNIFESP) for the material and infrastructure provided.

Abstract

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis resulting from the traumatic implantation of the fungus *Sporothrix*. In Brazil, zoonotic transmission plays an important role, involving especially cats. The objective of this study was to assess cases of sporotrichosis in cats, identifying the causative agents, clinical and epidemiological aspects, and in vitro antifungal susceptibility profiles. From September 2018 to February 2019, secretion and/or biopsy samples from symptomatic cats were analyzed by phenotypic and molecular techniques for diagnosis and fungal identification. To assess the antifungal susceptibility profiles of the isolates against five drugs, the broth microdilution method was performed, following the Clinical Laboratory Standards Institute protocol (M38-A2). Clinical and epidemiological aspects were analyzed based on data contained on investigation forms filled by the veterinarians at moment of collection. During the period of study, 245 samples were collected, and *Sporothrix* sp. was isolated in 189 cases (77.2%). Phenotypic and molecular analyses revealed that all isolates were *S. brasiliensis*. Regarding the in vitro susceptibility testing, terbinafine showed the best activity, followed by ketoconazole and itraconazole. The cat population analyzed consisted most of male animals (73.5%), adults (96.3%), living on the streets (53.5%), and uncastrated (69.8%). The success of this *S. brasiliensis* in the occurrence of outbreaks and epidemics is mainly associated with its high virulence, the susceptibility of the feline host, and the habits of these animals.

Keywords: Antifungal agents, Cats, Epidemiology, *Sporothrix*, Sporotrichosis.

Impacts

- The zoonotic sporotrichosis has been causing alarming reports in Brazil. The epidemic scenario of the disease, previously restricted to the state of Rio de Janeiro, is currently emerging to the South, Southeast and Northeast regions of the country.
- The spread of sporotrichosis raises a concern. Actions to aware the population and public health strategies are needed for disease control.

- Cats play an important role in the transmission of the disease to humans. For this reason, these animals need constant monitoring.

Introduction

Sporotrichosis is a mycosis that occurs worldwide, but mainly in tropical and subtropical countries. The infection is due to the implantation of dimorphic fungus *Sporothrix* sp. in the skin and subcutaneous tissue (Chakrabarti, Bonifaz, Gutierrez-Galhardo, Mochizuki & Li, 2015). Since the description of the etiological agent in 1898, it was believed that a single species could cause the disease, *Sporothrix schenckii*. However, phylogenetic analyzes showed a high level of speciation in this genus, leading to the description of cryptic species (Brilhante et al., 2015; Zhou, Rodrigues, Feng, de Hoog, 2013). As a result, different species with clinical and epidemiological importance were observed and grouped as the *Sporothrix schenckii* complex, which includes species, such as, *S. brasilienses*, *S. globosa*, *S. luriei*, and *S. schenckii* sensu stricto (Marimon et al., 2006, 2007). These species, despite having similar morphology, differ in relation to geographic distribution, transmission pathway, pathogenicity, and virulence (Chakrabarti et al., 2015).

The natural reservoir of this fungus is organic matter. The classical form of transmission to humans and other mammals is traumatic contact with contaminated plants and soil. Historically, the dissemination of sporotrichosis has been associated with rural areas and occupational hazard, affecting workers dealing with land and vegetation (Silva et al., 2012). Currently, the zoonotic form of the disease has gained attention, and cats are the most affected and associated with human transmission (Bazzi, Melo, Figuera & Kommers, 2016).

Consequently, cats have an important epidemiological role in the transmission and dissemination of *Sporothrix*, especially the non-castrated and with free access to the street (Nunes, Carneiro, Filgueira, Filgueira & Fernandes, 2011; Schubach et al., 2004). This is related to their habits of sharpening claws on plants, digging up the soil to cover up feces, and fighting over territorial disputes and mating (Nunes et al., 2011). Moreover, the fungal burden in their skin lesions are greater than for other animals (Rodrigues, de Hoog & de Camargo, 2016).

In Brazil, the most common *Sporothrix* species is *S. brasiliensis*. *Sporothrix schenckii* can also be observed, but it is commonly related to the environmental transmission. Infections by *S. brasiliensis* are associated with atypical and more severe clinical manifestations, as well as the zoonotic transmission and feline sporotrichosis (Rodrigues et al., 2013). In the outbreak areas, cats play an important role, as feline sporotrichosis influences the occurrence of *S. brasiliensis* infections in humans in the same area (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Rodrigues et al., 2013).

For decades, the sporotrichosis was self-limited and only sporadic cases were reported in the country. However, in the current scenario, the disease resulting from *S. brasiliensis* has reached epidemic levels, mainly in the South and Southeast regions of the country, leading to a public health problem (Rodrigues et al., 2016). Even in this alarming context, sporotrichosis is considered a neglected disease, attracting few investments for the research of new forms of diagnosis and treatment (Silva et al., 2012).

One of the main challenges for controlling feline sporotrichosis is treatment (Coskun, Saral, Akpolat, Ataseven, & Çiçek, 2004). It is frequent cases of treatment abandonment and discontinuation, due to misperception of wound healing (Chaves et al., 2012). Historically, the main treatment option was systemic chemotherapy with potassium iodide, but cats may not respond or get worse due to iodide sensitivity (Nobre et al., 2002). Nevertheless, in recent decades the azole drug itraconazole has been the most used and effective (Chaves et al., 2012). However, refractory or relapsing cases can be observed. Alternative options include association of itraconazole with other antifungal drugs (Gremião et al., 2011).

The objective of this study was to assess cases of sporotrichosis in cats in the city of São José do Rio Preto, Brazil, identifying the causative agents, clinical and epidemiological aspects, and in vitro antifungal susceptibility profiles of the isolates against five drugs.

Material and Methods

Ethics approval

The study was approved by the Animal Ethics Committee of the São José do Rio Preto School of Medicine (001-001592/2018). The isolates studied here were

registered in the Brazilian National System of Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (A4023F8).

Samples and isolates

Over a period of 18 months (September 2017 to February 2019), 247 secretion and/or biopsy samples were collected from cats with sporotrichosis symptoms. Samples were from the Center for Zoonoses Control (CZC) (n = 212) and private veterinary clinics (VC) (n = 33) of São José do Rio Preto, Brazil. This city is in the northeast region of São Paulo state (20° 49' 12" S, 49° 22' 44" W), with an area of 431,963 km².

Samples were transported in sterile tubes containing Sabouraud broth (Oxoid®). Once in the laboratory, they were inoculated on agar slant tubes with Sabouraud (Oxoid®) and Mycobiotic (Himedia®) media. Tubes were incubated at room temperature and checked periodically for fungal growth. Colonies were isolated on potato-dextrose agar (PDA, Oxoid®) for further analyses.

Phenotypic identification

The *Sporothrix* morphological identification was performed using the slide culture method. Phenotypic characterization followed the parameters of Marimon et al. (2007): presence of thermal dimorphism, growth rates at 30 °C and 37 °C, presence of pigmented conidia, and assimilation of sucrose and raffinose.

DNA extraction and molecular identification

Colonies on the filamentous phase were cultivated on PDA for 7 days at 30 °C. The FastDNA® (MP Biomedical) kit was used for DNA extraction, following the manufacturer's specifications; DNA was quantified using NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific®).

Molecular identification was obtained using species-specific PCR (Rodrigues, de Hoog & de Camargo, 2015). The amplification targeted specific sequences of the calmodulin gene of *S. schenckii* stricto sensu and *S. brasiliensis*. Primers for used for *S. schenckii* were "Ssch-forward" (5'-TTT CGA ATG CGT TCG GCT GG-3') and

“Ssch-reverse” (5'-CTC CAG ATC ACC GTG TCA-3'); and for *S. brasiliensis* were “Sbra-forward” (5'-CCC CCG TTT GAC GCT TGG-3') and “Sbra-reverse” (5'-CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT-3'). As internal control, the ITS region was also amplified in each reaction using the primers ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Rodrigues et al., 2015). Strains *S. schenckii* Ss90 and *S. brasiliensis* Ss54 were used as controls.

Antifungal susceptibility testing

Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined based on the broth microdilution method, document M38-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2008), for five drugs. Four antifungal drugs were tested: amphotericin B (AMB), ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), and terbinafine (TBF) (Sigma®). They were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and tested in final concentrations ranging from 0.03 to 16 µg/ml. Additionally, potassium iodide (KI) was tested. It was diluted in distilled sterile water and final concentrations ranged from 0.49 to 250 mg/ml (Silva, 2017).

Inoculum was prepared from a pure culture incubated on PDA for 7 days at 30 °C. Conidia were scraped from the surface of the colony and filtered through sterile paper filters. Final concentration was adjusted to $0.4 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ UFC/ml in RPMI medium. The conidial suspension was inoculated in sterile microplates containing the drugs in different concentrations. Plates were incubated for 72 h at 28 °C. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was used in each test as quality control.

Endpoint readings were defined as 100% inhibition for AMB, ITZ, and KI; 80% for TBF, and 50% for KTZ. The isolates were classified as wild type (WT) and non-WT, based on the epidemiologic cutoff values (ECV) proposed by Espinel-Ingroff et al. (2017).

Clinical and epidemiological aspects and georeferencing

Investigation forms were designed to collect information on the clinical and epidemiological aspects associated to the animals. They were filled by the veterinarians at the moment of sample collection. Data obtained included: origin,

location (district), age (adult or kitten), gender, symptoms, clinical manifestations of lesions, treatment, level of access to the street, castration, indication for euthanasia, and indication of differential diagnosis.

Information on the forms were tabulated on Microsoft Excel®. Descriptive analyses and qui-square test were performed using the GraphPad Prism® software (v.6.10). The level of significance adopted was $p < 0.05$.

In addition, knowing the district of location of the animals, it was possible to determine the distribution in the city of the cases included in this study. Maps of georeferencing were constructed using the MapInfo software, v.17.0 (Pitney Bowes®).

Results

Identification of the isolates

In the period of analyses, 245 samples were collected from cats with sporotrichosis symptoms. Most of the samples, 212 (86.5%), were from the CZC, while 33 (13.5%) were from veterinary clinics (Table 1). Through mycological techniques, sporotrichosis were diagnosed by the isolation of *Sporothrix* sp. in 189 (77.2%) samples. The CCZ samples showed positivity in 89.4% (169) of the cases, and among the clinics cases, 10.6% (20) were positive.

All isolates exhibited characteristics of the genus *Sporothrix*. Seven days colonies in PDA, at room temperature, showed velvety or smooth texture and colors in shades of brown. White areas could be present. When visualized under microscope, the morphology showed hyaline hyphae and presence of hyaline and dematiaceous conidia. There was no isolation of other fungi genera.

Table 1

The phenotypic characterization revealed that all isolates had patterns expected for *Sporothrix brasiliensis*. Isolates were thermally dimorphic, exhibited growth rates below 50 mm at all temperatures tested, presented sessile conidia, and could not assimilate sucrose or raffinose. The phenotypic identification was

confirmed by the species-specific PCR, which positive reactions were obtained only for *S. brasiliensis*.

Antifungal susceptibility testing

The in vitro susceptibility testing showed that TBF, KTZ, and ITZ were the drugs with better activity against the isolates tested, with MIC ranging from 0.03 to 4.0 µg/ml. Contrarily, AMB and KI, with MIC ranges of 0.125 – 8.0 µg/ml and 31.25 – 250.0 mg/ml, respectively, showed the least activity (Table 2).

Based on Espinel-Ingroff et al. (2017), 86 isolates presented MIC above the proposed ECV for TBF (>0.12 µg/ml), 42 isolates for AMB (>4 µg/ml), and one for ITZ (>2 µg/ml). There are no available ECV for KI.

Table 2

Clinical and epidemiological aspects and georeferencing

The cat population analyzed consisted most of male animals (180; 73.5%), adults (236; 96.3%), living on the streets (131; 53.5%), and uncastrated (171; 69.8%). Among the 245 cases, 127 (51.8%) were suspected of disseminated cutaneous sporotrichosis. Regarding the clinical characteristics, multiple lesions (176; 71.8%), with ulcerated nodules (175; 71.4%) were the most frequent. Nonspecific symptoms, such as weight loss, alopecia, runny nose, and sneezing, were observed in 73.5% (180) of the cases (Table 3). The head, including the neck, was the most affected area (210; 85.7%), followed by thoracic limbs (120; 48.9%), pelvic limbs (104; 42.4%), tail (22; 9%), back (22; 8.9%), and belly (20; 8.1%).

Euthanasia was suggested in 61.2% (150) of the cases. Only 14.3% (35) of the animals have received previous antifungal treatment, and itraconazole was the first drug of choice (94.3%), alone or in combination. Other medications with no antifungal activity, such as antibiotics, antiallergic, or anti-inflammatory drugs, were reported in 8.5% (21) of the cases (Table 3).

Several aspects showed statistical significance when comparing positive and negative cases. In relation to the clinical aspects, these variables were: clinical form

of the disease, type and number of lesions, presence of nonspecific symptoms, previous use of antifungal drugs, and need for differential diagnosis. Regarding the epidemiological characteristics, the variables that showed statistical significance were: level of access to the street, castration, and indication for euthanasia.

Table 3

The confirmed sporotrichosis cases, according to the georeferencing, are distributed mainly in the Jaguaré district (57; 30.2%), followed by Eldorado (19; 9.9%), Central (16; 8.3%), and Jardim Americano (15; 6.1%). In addition, when analyzing the relative values, these districts showed high percentages of positivity (Jardim Americano - 93.8%, Jaguaré - 90.5%, Eldorado - 86.4% and Central - 80%), exceeding the percentage of total positivity of 77.2%. Cases of sporotrichosis were observed in 22 of the 26 districts of the city (Figure 1).

Figure 1

Discussion

Identification and characterization of *Sporothrix* isolates from cat samples are extremely relevant, since these animals represent an important role in the zoonotic transmission to humans (Pereira et al., 2014). Feline sporotrichosis outbreaks can cause an increase in the number of human cases in the same area (Rodrigues et al., 2013). Some studies reported the presence of *Sporothrix* species causing disease in cats in several Brazilian regions (Madrid, Mattei, Fernandes, Nobre, & Meireles, 2012; Montenegro et al., 2014; Oliveira, Almeida-Paes, Muniz, Gutierrez-Galhardo & Zancopé-Oliveira, 2011a; Oliveira, Maifrede, Ribeiro & Zancopé-Oliveira, 2013; Sanchotene et al., 2015; Schubach et al., 2002). Rio de Janeiro state, in the southeast of the country, present the largest case series of feline sporotrichosis in the world (Pereira et al., 2014).

In this study, 189 cases of feline sporotrichosis were observed, and all of them were attributed to *S. brasiliensis*. The phenotypic characterization, in agreement with the species-specific PCR, corroborates with the studies by Marimon et al. (2006,

2007). They evaluated phenotypic methods as an easy and cheap tool for *Sporothrix* species identification, without the need of molecular techniques. The same results were observed in other studies with isolates from cats, dogs, and humans (Oliveira et al., 2011a; Rodrigues et al., 2013).

Infections by *S. brasiliensis* are characterized by high pathogenicity and virulence. This species is still limited to Brazil, and the high prevalence in cats is due the greater susceptibility of these animals and their habits (Montenegro et al., 2014; Sanchotene et al., 2015). Consequently, feline sporotrichosis often promote severe disseminated cutaneous lesions and systemic involvement (Schubach et al., 2004).

A proper treatment regimen is crucial for controlling the transmission of the fungus to other animals and humans (Brilhante et al., 2015). However, it usually takes several months and it must be continued after at least a month after the lesions healed. Nevertheless, after the cure, recurrence or exogenous reinfection are frequent (Gremião et al., 2015).

In vitro susceptibility testing is an important tool to monitor resistance against antifungal drugs. In this study, clinical isolates of *S. brasiliensis* were tested against the most common drugs used for feline sporotrichosis treatment (Pereira et al., 2010; Reis et al., 2012; Mahajan et al., 2015).

The best activity was observed for TBF, KTZ, and ITZ. These results agree with other studies on *S. brasiliensis* susceptibility (Brilhante et al., 2015; Córdoba et al., 2018; Marimon, Gené, Cano & Guarro, 2008; Stopiglia et al., 2014). Higher MIC values were observed for AMB, which was also previously observed (Córdoba et al., 2018; Rojas et al., 2018; Stopiglia et al., 2014). However, the higher MIC value found in those studies were 4.0 µg/ml, whereas, in this study, we detected MIC values over 16.0 µg/ml.

Regarding KI, values found in this study (31.25 – 250.0 mg/ml) were comparable to Silva (2017), who found a MIC range of 125 – 250.0 mg/ml. Unfortunately, further comparisons are hampered by the lack of available data.

Clinical breakpoints are not established for the *S. schenckii* complex yet. Nonetheless, higher rates of resistance to ITZ seem to be present in cases of feline sporotrichosis (Oliveira et al., 2011b). Interesting results were reported by Borba-Santos et al. (2014). They observed that *S. brasiliensis* isolates from an outbreak in

Rio de Janeiro during 2011 and 2012 showed less susceptibility to ITZ and TBF than isolates from 1998 to 2004.

Considering the ECV previously proposed (Espinell-Ingroff et al., 2017), this study identified non-WT isolates for TBF, AMB, and ITZ. Similarly, in another study, non-WT strains for TBF were observed in 66.6% of the cases (Córdoba et al., 2018). These results show the importance of constant monitoring the in vitro susceptibility of these isolates and considering actions to promote the correct treatment of the disease.

In relation to the epidemiological aspects, this study showed that uncastrated, adults, street, male cats were the majority among the animals with suspected sporotrichosis. These characteristics were expected, since adult street cats tend to fight over territory and mating, which increases the probability of fungal implantation, from other cats or the environment (Almeida et al., 2018; Macêdo-Sales et al., 2018; Madrid, Mattei, Martins, Nobre & Meireles, 2010; Madrid et al., 2012; Poester et al., 2018).

The clinical manifestations of the disease found in this study were also in agreement with other reports: disseminated cutaneous lesions, with ulceration, fistulas, and exudate (Almeida et al., 2018; Macêdo-Sales et al., 2018; Madrid et al., 2012). These lesions are mainly located at the head and limbs, which are regions more exposed during fights or in contact with soil and vegetation (Almeida et al., 2018; Macêdo-Sales et al., 2018). In severe cases, unspecific symptoms, such as lethargy and anorexia, which ultimately lead to euthanasia or death, are commonly observed (Almeida et al., 2018). These symptoms make diagnosis difficult and may cause sporotrichosis to be underestimated.

Based on our results, type and number of lesions, access to the street, and castration are determinant in identifying cases of sporotrichosis. In this sense, castration is suggested as a measure for prevention and control of feline sporotrichosis (Pereira et al., 2014).

When looking at the georeferencing map, Central and Jardim Americano are districts near the city dam, regions known to have high numbers of street cats. Nevertheless, also high positivity rates were observed for the Jaguaré and Eldorado district, which is not known to have a prevalence of cats in this condition. However, these districts belong to the northern region of the city, recognized by important

socioeconomic vulnerabilities. It's worth mentioning that there was no active search for sick animals. They were brought to the CZC or clinics by third parties. This fact may have contributed to mask the real distribution of the cases in the city.

The high percentage of positive results observed in this population shows that feline sporotrichosis is present in São José do Rio Preto, Brazil, and *S. brasiliensis* is the etiological agent. These findings represent a warning and highlight the need for public interventions, focused on raising awareness, prevention, and proper management of affected animals, especially in the most affected areas. Those measures should also focus on controlling the fungus circulation among cats, that could be achieved by castration and proper treatment of sick cats.

Conflict of interest: Authors declare there are no conflict of interest.

References

- Almeida, A. J., Reis, N. F., Lourenço, C. S., Costa, N. Q., Bernardino, M. L. A., & Vieira-da-Motta, O. (2018). Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos dos Goytacazes, RJ. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 1438-1443. [doi:10.1590/1678-5150-pvb-5559](https://doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5559)
- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Marine, M., Gene, J., ... Guarro, J. (2009) et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 651-655. [doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x)
- Bazzi, T., Melo S. M. P., Figuera, R. A., & Kommers, G. D. (2016). Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 36, 203-311. [doi:10.1590/S0100-736X2016000400009](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016000400009)
- Borba-Santos, L. P., Rodrigues, M. A., Gagini, T. B., Fernandes, G. F., Castro, R., de Camargo, Z. P., ... Rozental, S. (2014). Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Medical Mycology*, 53, 178-188. [doi:10.1093/mmy/myu056](https://doi.org/10.1093/mmy/myu056)
- Brilhante, R. S. N., Rodrigues, A. M., Sidrim, J. J. C., Rocha, M. F. G., Pereira, A. S., Gremião, I. D. F., ... de Camargo, Z. P. (2015). *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. *Medical Mycology*, 54, 275-279. [doi:10.1093/mmy/myv039](https://doi.org/10.1093/mmy/myv039)
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C., Mochizuki, T., & Li, S. (2015). Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, 53, 3-14. [doi:10.1093/mmy/myu062](https://doi.org/10.1093/mmy/myu062)

Chaves, A. R., de Campos, M. P., Barros, M. B. L., do Carmo, C. N., Gremião, I. D. F., Pereira, S. A., & Schubach, T. M. P. (2012). Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis - Study of 147 Cases. *Zoonoses and Public Health*, 60, 149–153. doi:[10.1111/j.1863-2378.2012.01506.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01506.x)

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008). Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi - document M38- A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Córdoba, S., Isla, G., Szusz, W., Vivot, W., Hevia, A., Davel, G., & Canteros, C. E. (2018). Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii sensu lato* isolated in Argentina. *Mycoses*, 61, 441-448. doi:[10.1111/myc.12760](https://doi.org/10.1111/myc.12760)

Coskun, B., Saral, Y., Akpolat, N., Ataseven, A., & Çiçek, D. (2004). Sporotrichosis Successfully Treated with Terbinafine and Potassium Iodide: Case Report and Review of the Literature. *Mycopathologia*, 158, 53-56. doi:[10.1023/b:myco.0000038440.18814.a9](https://doi.org/10.1023/b:myco.0000038440.18814.a9)

Espinel-Ingroff, A., Abreu, D. P. B, Almeida-Paes, R., Brilhante, R. S. N., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., ... Turnidge, J. (2017) . Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e01057-17. doi:[10.1128/AAC.01057-17](https://doi.org/10.1128/AAC.01057-17)

Gremião, I., Schubach, T., Pereira, S., Rodrigues, A., Honse, C., & Barros, M. (2011). Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Australian Veterinary Journal*, 89, 346-351. doi:[10.1111/j.1751-0813.2011.00804.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2011.00804.x).

Gremião, I. D., Menezes, R. C., Schubach, T. M., Figueiredo, A. B., Cavalcanti, M. C., & Pereira, S. A. (2015). Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*, 53, 15-21. doi:[10.1093/mmy/myu061](https://doi.org/10.1093/mmy/myu061)

Macêdo-Sales, P. A., Souto, S. R. L. S., Destefani, C. A., Lucena, R. P., Rocha, E. M. S., & Baptista, A. R. S (2018). Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 9, 13-19. doi:[10.5123/s2176-62232018000200002](https://doi.org/10.5123/s2176-62232018000200002)

Madrid, I. M., Mattei, A., Martins, A., Nobre, M., & Meireles, M (2010). Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses and Public Health*, 57, 151-154. doi:[10.1111/j.1863-2378.2008.01227.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01227.x)

Madrid, I. M., Mattei, A. S., Fernandes, C. G., Nobre, M. O., & Meireles, M. C. A. (2012). Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*, 173, 265-273. doi:[10.1007/s11046-011-9509-4](https://doi.org/10.1007/s11046-011-9509-4)

- Mahajan, V. K., Karaninder, S. M., Pushpinder, S. C., Mrinal, G., Rajni, S., & Ritu, R. (2015). Fixed cutaneous sporotrichosis treated with topical amphotericin B in an immune suppressed patient. *Medical Mycology Case Reports*, 7, 23-25. doi:[10.1016/j.mmcr.2015.01.002](https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.01.002)
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Lazéra, M. S., & Guarro, J. (2006). Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 3251-3256. doi:[10.1128/JCM.00081-06](https://doi.org/10.1128/JCM.00081-06)
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Deanna, A. Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. (2007). *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 3198-3206. doi:[10.1128/JCM.00808-07](https://doi.org/10.1128/JCM.00808-07)
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008). *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Medical Mycology*, 46, 621-625. doi:[10.1080/13693780801992837](https://doi.org/10.1080/13693780801992837)
- Montenegro, H., Rodrigues, A. M., Dias, M. G., Silva, E. A., Bernardi, F., & Camargo, Z. P. (2014). Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, 269. doi:[10.1186/s12917-014-0269-5](https://doi.org/10.1186/s12917-014-0269-5)
- Nobre, M. O., Meireles, M. C. A., Caetano, D. T., Faé, F., Cordeiro, J. M. C., Meireles, R. M., ... Ferreira, L. (2002). Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*, 9, 36-41. doi:[10.4322/rbcv.2015.347](https://doi.org/10.4322/rbcv.2015.347)
- Nunes, G. D. L., Carneiro, R. S. do, Filgueira, K. D., Filgueira, F. G. F., & Fernandes, T. H. T. (2011). Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, 14, 157-161. doi: [10.25110/arqvet.v14i2.2011.4152](https://doi.org/10.25110/arqvet.v14i2.2011.4152)
- Oliveira, M. M. E., Almeida-Paes, R., Muniz, M. M., Gutierrez-Galhardo, M. C., & Zancoppe-Oliveira, R. M. (2011a). Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*, 172, 257-267. doi:[10.1007/s11046-011-9437-3](https://doi.org/10.1007/s11046-011-9437-3)
- Oliveira, D. C., Lopes, P. G. M., Spader, T. B., Mahl, C. D., Tronco-Alves, G. R., Lara, V. M., ... Alves, S. H. (2011b). Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 49, 3047-3049. doi:[10.1128/JCM.00255-11](https://doi.org/10.1128/JCM.00255-11)
- Oliveira, M. M. E., Maifrede, S. B., Ribeiro, M. A., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2013). Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 936-938. doi:[10.1590/0074-0276130239](https://doi.org/10.1590/0074-0276130239)
- Pereira, S. A., Passos, S. R. L., Silva, J. N., Gremião, I. D., Figueiredo, F. B., Teixeira, J. L., ... Schubach, T. M. P. (2010). Response to azolic antifungal agents

for treating feline sporotrichosis. *Veterinary Record*, 166, 290-294. [doi:10.1136/vr.166.10.290](https://doi.org/10.1136/vr.166.10.290)

Pereira, S. A., Gremião, I. D., Kitada, A. A., Boechat, J. S., Viana, P. G., & Schubach, T. M. (2014). The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47, 292-293. [doi:10.1590/0037-8682-0092-2013](https://doi.org/10.1590/0037-8682-0092-2013)

Poester, V. R., Mattei, A. S., Madrid, I. M., Pereira, J. T. B., Klafke, G. B., Sanchotene, K. O., ... Xavier, M. O. (2018). *Sporotrichosis* in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*, 65, 815-821. [doi:10.1111/zph.12504](https://doi.org/10.1111/zph.12504)

Reis, E. G., Gremião, I. D., Kitada, A. A., Rocha, R. F., Castro, V. S., Barros, M. B., ... Schubach, T. M. P. (2012). Potassium iodide capsule in the treatment of feline sporotrichosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 14, 399-404. [doi:10.1177/1098612X12441317](https://doi.org/10.1177/1098612X12441317)

Rodrigues, A. M., Teixeira, M. D. M., de Hoog, G. S., Schubach, T. M. P., Pereira, S. A., Fernandes, G. F., ... de Camargo, Z. P. (2013). Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7, e2281. [doi:10.1371/journal.pntd.0002281](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002281)

Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., & de Camargo, Z. P. (2015). Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0004190. [doi:10.1371/journal.pntd.0004190](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190)

Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., & de Camargo, Z. P. (2016) *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathogens*, 12, e1005638. [doi:10.1371/journal.ppat.1005638](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005638)

Rojas, O. C., Bonifaz, A., Campos, C., Treviño-Rangel, R. J., González-Álvarez, R., & González, G. M (2018). Molecular Identification, Antifungal Susceptibility, and Geographic Origin of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Mexico. *Journal of Fungi*, 4, 1-9. [doi:10.3390/jof4030086](https://doi.org/10.3390/jof4030086)

Sanchotene, K. O., Madrid, I. M., Klafke, G. B., Bergamashi, M., Della Terra, P. P., Rodrigues, A. M., ... Xavier, M. O. (2015). *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*, 58, 652-658. [doi:10.1111/myc.12414](https://doi.org/10.1111/myc.12414)

Schubach, T. M., Schubach, A. O., dos Reis, R. S., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T. C., Monteiro, D. F., ... Wanke, B. (2002). *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*, 153, 83-86. [doi:10.1023/a:1014449621732](https://doi.org/10.1023/a:1014449621732)

Schubach, T. M. P., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M. B. L., Figueiredo, F. B., Cuzzi, T., ... Wanke, B. (2004). Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 224, 1623-1629. [doi:10.2460/javma.2004.224.1623](https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1623)

Silva, M. B. T. da, Costa, M. M. M., Torres, C. C. S., Galhardo, M. C. G., Valle, A. C. F. do, Magalhães, M. A. F. M., ... Oliveira, R. M. de (2012). Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 28, 1867-1880. [doi:10.1590/S0102-311X2012001000006](https://doi.org/10.1590/S0102-311X2012001000006)

Silva, M. L. Q. (2017). Efeito inibitório, *in vitro*, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosas e leveduriforme. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

Stopiglia, C. D. O., Magagnin, C. M., Castrillón, M. R., Mendes, S. D., Heidrich, D., Valente, P., & Scroferneker, M. L. (2014). Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology*, 52, 56-64. [doi:10.3109/13693786.2013.818726](https://doi.org/10.3109/13693786.2013.818726)

Zhou, X., Rodrigues, A. M., Feng, P., & de Hoog, G. S. (2013). Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*, 66, 153-165. [doi:10.1007/s13225-013-0220-2](https://doi.org/10.1007/s13225-013-0220-2)

Table 1. Number, type, and origin of the samples which were positive and negative for sporotrichosis.

	Positive (n)	Negative (n)	Total (n)
CZC[†]			
Secretion	85	34	119
Biopsy	84	09	93
Total CZC	169 (79.7%)	43 (20.3%)	212 (100%)
VC[‡]			
Secretion	19	12	31
Biopsy	01	01	02
Total VC	20 (60.6%)	13 (39.4%)	33 (100%)
Total	189 (77.2%)	56 (22.8%)	245 (100%)

† Centre of Zoonoses Control

‡ Veterinary clinic

Table 2. Results of the in vitro susceptibility testing for 189 isolates of *S. brasiliensis* against AMB, KTZ, ITZ, TBF ($\mu\text{g/ml}$), and KI (mg/ml): MIC range, geometrical mean, mode, MIC₅₀, and MIC₉₀ (MIC₅₀ and MIC₉₀ values are defined as the lowest concentration of the drug at which 50 and 90% of the isolates were inhibited, respectively).

		AMB	KTZ	TBF	ITZ	IK
<i>S. brasiliensis</i> (n = 189)	Range	0.125–>16	0.03–2	0.03–2	0.03–4	31.25–250
	Mode	1	0.25	0.03	1	125
	GM [†]	2	0.4	0.2	0.5	148.5
	MIC ₅₀	2	0.5	0.25	0.5	125
	MIC ₉₀	8	1	1	1	250

† Geometric mean.

Table 3. Clinical and epidemiological aspects of the animals included in this study.

Variable	Positive culture n (%)	Negative culture n (%)	p-value	Total n
Origin			0.0578	
Street	105 (80.2)	26 (19.8)		131
Semi-domiciled	74 (77.1)	22 (22.9)		96
Indoor	10 (55.6)	08 (44.4)		18
Gender			0.2512	
Male	142 (79)	38 (21)		180
Female	47 (72.3)	18 (27.7)		65
Age group[†]			0.1100	
Adult	184 (78)	52 (22)		236
Kitten	05 (55.6)	04 (44.4)		09
Castration			0.0368	
Yes	51 (68.9)	23 (31.1)		74
No	138 (80.7)	33 (19.3)		171
Access to the street			0.0033	
Yes	182 (79.1)	48 (20.9)		230
No	07 (46.7)	08 (53.3)		15
Indication of euthanasia			< 0.0001	
Yes	133 (88.7)	17 (11.3)		150
No	47 (60)	32 (40)		79
Unanswered	09 (56.3)	07 (43.7)		16
Differential diagnosis			0.0007	
Yes	20 (55.6)	16 (44.4)		36
No	169 (81)	40 (19)		209
Clinical form			0.0006	
Cutaneous (disseminated)	111 (87.4)	16 (12.6)		127
Fixed cutaneous	70 (64.8)	38 (35.2)		108
Extracutaneous	04 (100)	0 (0)		04
Cutaneous lymphatic	03 (75)	01(25)		04
Undetermined	01 (50)	01(50)		02
Main type of lesion			0.0061	
Ulcerate	140 (80)	35 (20)		175
Papule	32 (82.1)	07 (17.9)		39
Erythematous	07 (70)	03 (30)		10
Nodular	02 (25)	06 (75)		08
No specific lesion	01 (50)	01 (50)		02
Unanswered	07 (63.6)	04 (36.4)		11
Number of lesions			< 0.0001	
Multiple	150 (85.2)	26 (14.8)		176
Single lesion	38 (56.7)	29 (43.3)		67
No lesion	01 (50)	01 (50)		02
Nonspecific symptoms[‡]			0.0004	
Yes	150 (83.3)	30 (16.7)		180
No	32 (61.5)	20 (38.5)		52
Unanswered	07 (53.8)	06 (46.2)		13
Use of antifungal drugs			0.0239	

Sim	21 (60)	14 (40)	35
No	160 (79.6)	41 (20.4)	201
Unanswered	08 (88.9)	01 (11.1)	09
Use of other medicines		0.1573	
Yes	13 (61.9)	08 (38.1)	21
No	168 (78.1)	47 (21.9)	215
Unanswered	08 (88.9)	01 (11.1)	09
Total	189 (77.2)	56 (22.8)	245

† Age group: kitten was considered up to 1 year.

‡ Non-specific symptoms: sneezing, runny nose, shortness of breath, weight loss, alopecia, epistaxis, eye discharge, edema, and fever.



Legend: ● Positive

▲ Negative

Figure 1. Map of the districts of São José do Rio Preto, Brazil, and distribution of positive and negative cases of feline sporotrichosis included in this study.

6. CONCLUSÕES

- A alta positividade da doença na população de gatos estudada demonstra que a esporotricose felina está presente no município de São José do Rio Preto/SP, sendo observada, por métodos de georreferenciamento, uma maior concentração de casos nas áreas do Jaguaré, Eldorado, Central e Jardim Americano.
- O *Sporothrix brasiliensis* é a espécie responsável pelos casos de esporotricose felina identificados, sendo consonante com relatos da literatura que associam essa espécie aos episódios da doença em gatos no Brasil.
- Terbinafina apresenta melhor atividade *in vitro* contra *Sporothrix brasiliensis*, seguido pelos azólicos cetoconazol e itraconazol. Entretanto, a maior parte dos isolados considerados não-WT são identificados para a terbinafina.
- A suspeita clínica da esporotricose ocorre, principalmente, em animais com lesões múltiplas e ulceradas, machos, adultos, de rua e não castrados.
- Aspectos como acesso do animal à rua e castração podem ser fatores determinantes na ocorrência da esporotricose.

7. REFERÊNCIAS

- ALBA-FIERRO, C. A. et al. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 86-89, 2014.
- ALENCAR, José de. **Como e porque sou romancista**. In: Alencar, José de. Ficção Completa. Rio de Janeiro: Typ. de G. Leuzinger & Filhos, v. 1, p. 58, 1893.
- ALMEIDA, S. R. Therapeutic monoclonal antibody for sporotrichosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 2010-2013, 2012.
- ALMEIDA, J. R. F. et al. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, v. 53, p. 42-50, 2014.
- ALMEIDA, J. R. F. et al. The efficacy of humanized antibody against the sporothrix antigen gp70 in promoting phagocytosis and reducing disease burden. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 345, 2017.
- ALMEIDA, J. R. F. et al. Abordagem imunoproteômica que revela peptídeos de *Sporothrix brasiliensis* que induzem uma resposta imune celular na esporotricose subcutânea. **Scientific Reports**, v. 8, n. 4192, 2018.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Immunoglobulins G, M, and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 1149-1157, 2007.
- ALMEIDA-PAES, R. et al. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, p. e3094, 2014.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- BARROS, M. B. L. et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology and Infection**, v. 136, n. 9, p. 1192-1196, 2008.

BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BARROS, M. B. L. et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Saude Publica**, v.27, n.6, p.455, 2010.

BAZZI, T. et al. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 303–311, 2016.

Boletim Epidemiológico Esporotricose 001/2018. Vigilância e Cenário Epidemiológico: Esporotricose no estado do RJ. Rio de Janeiro: Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro. Maio de 2018.

BORBA-SANTOS, L. P. et al. $\Delta 24$ -Sterol Methyltransferase Plays an Important Role in the Growth and Development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, Article 311, 2016.

BORGES, T. S. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* From the Claws of Domestic Cats (Indoor and Outdoor) and in Captivity in São Paulo (Brazil). **Mycopathologia**, v. 176, n.1, p. 129–137, 2013.

CARMICHAEL, J. W. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, p. 1137-1173, 1962.

CARNERO, L. C. G et al. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 100, 2018.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos: Farmacodinâmica e farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.

CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 3-14, 2015.

CHAVES, A. R. et al. Treatment abandonment in feline sporotrichosis – Study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, p. 149-153, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. 2ed. Approved standard. CLSI document M38- A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

- COLODEL, M. M. et al. Esporotricose cutânea felina no Estado de Santa Catarina: relato de casos. **Veterinária em foco**, v. 7, n. 1, p. 18-27, 2009.
- CORDEIRO, F. N. et al . Ocorrência familiar de esporotricose zoonótica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 121-124, 2011.
- CÓRDOBA, S. et al. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. **Mycoses**, v. 61, p. 441-448, 2018.
- COSTA, R. O. et al. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 396-402, 2013.
- CRISEO, G. et al. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. **Mycopathologia**, v.166, p. 159–162, 2008.
- CRISEO, G.; ROMEO, O. Ribosomal DNA sequencing and phylogenetic analysis of environmental *Sporothrix schenckii* strains: comparison with clinical isolates. **Mycopathologia**, v.169, p. 351–358, 2010.
- CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*: Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.08-28, 2013.
- DARKER, M. J.; SCOTT, L. J.; GOA, K. L. Terbinafine: a review of its use in onychomycosis in adults. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, n. 1, p. 39-65, 2003.
- DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in Mycology**, v. 83, p. 165-191, 2016.
- DE BEURMANN, L.; GOUGEROT, H.; VAUCHER, V. Sporotichoses cutanées du chat. **Royal Society of Biology**, v. 66, p. 370-372, 1909.
- DE MEYER, E. M. et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. **Mycology**, v. 100, n. 4, p. 647-661, 2008.

DE OLIVEIRA, M. M. et al. First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 388–390, 2014.

DIAS, N. M. et al. Sporotrichosis Caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1975-1976, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A. et al. Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

FRANCESCONI, G. et al. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 11, p. 1273-1276, 2009.

FREITAS, D. C.; MIGLIANO, M. F.; ZANI-NETO, L. Esporotricose. Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 601-604, 1956.

FREITAS, D.F.S. et al. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. **Clinical infectious diseases**, v. 50, p. 453, 2010.

FUKUSHIRO, R. Epidemiologia e ecologia da esporotricose no Japão. **Zentralbl Bakteriell Mikrobiol HygA**, v. 257, p. 228-233, 1984.

GHOSH, A. et al. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 45, p. 449–454, 2002.

GLUJOY, M. et al. Percutaneous drug delivery systems for improving antifungal therapy effectiveness: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, p. 8-16, 2014.

GREENE, C. E. Antifungal Chemotherapy. In: GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 4. ed. Saint Louis: Elsevier, 2012. 1376 p.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localized sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 720-723, 2009.

GREMIÃO, I. D. F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346-351, 2011.

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

GREMIÃO, I. D. F. et al. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, e1006077, 2017.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 454-500, 1999.

GUIRADO, G. M. P. et al. Analysis of laser therapy effects in *Sporothrix schenckii* inactivation in vivo. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 93-101, 2018.

HEIDRICH, D. et al. Sucesso terapêutico da terbinafina em um caso de esporotricose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 4, p. 182-185, 2011.

HEKTOEN, L; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 5, p. 77-89, 1900.

HIRUMA, M.; KAGAWA, S. Ultrastructure of *Sporothrix schenckii* treated with iodine-potassium iodide solution. **Mycopathologia**, v. 97, n. 2, p. 121-127, 1987.

JAHAM, C.; PARADIS, M.; PAPICH, M. G. Antifungal dermatologic agents: azoles and allylamines. **Continuing education for veterinarians Compendium**, v. 22, n. 6, p. 548-558, 2000.

KAJIWARA, H. et al. Impaired Host Defense against *Sporothrix schenckii* in Mice with Chronic Granulomatous Disease Impaired Host Defense against *Sporothrix schenckii* in Mice with Chronic Granulomatous Disease. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 5073–5079, 2004.

KAUFFMAN, C. A. et al. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by the Infectious Diseases Society of America. **IDSA Guidelines for Management of Sporotrichosis**, v. 45, n. 10, p. 1255-1265, 2007.

LARSSON, C. E. Sporotrichosis. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Sci**, v. 48, n. 3, p. 250–259, 2011.

LLORET, A. et al. Sporotrichosis in Cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Paredes celulares dos patógenos dimórficos fúngicos *Sporothrix schenckii* e *Sporothrix brasiliensis* apresentam estruturas bilaminadas e desprendimento de camadas extensas e intactas. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006169, 2018.

LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Systemically Administered Antifungal Agents: A Review of Their Clinical Pharmacology and Therapeutic Applications. **Drugs**, v. 44, n. 1, p. 9–35, 1992.

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

MACÊDO-SALES, P. A. et al. Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p. 13-19, 2018.

MADRID, I. M. et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: a Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, p. 265–273, 2012.

MADRID, H. et al. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 3, p. 218–222, 2009.

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology research and practice**, v. 2014, Article ID 272376, 2014.

MAHAJAN, V. K. et al. Fixed cutaneous sporotrichosis treated with topical amphotericin B in an immune suppressed patient. **Medical Mycology Case Reports**, v. 7, p. 23–25, 2015.

MARANI, L; VENTURI, S. Iodio e immunita ritardata. **Minerva Medica**, v. 77, p. 805-809, 1986.

MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, p. 621-625, 2008.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. A et al. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, p. 62-66, 2014.

MEINERZ, A. R. et al. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 60-62, 2007.

MIRANDA, L. H. et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 36, n. 4, p. 425-432, 2013.

MIRANDA L. H. M. et al. Esporotricose felina grave associada a um aumento da população de células CD8 ^{baixas} e uma diminuição em células CD4 ⁺. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29–39, 2016.

MIYAJI, M., NISHIMURA, K. Papel defensivo do granuloma contra a infecção por *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 80, p. 117-124, 1982.

MORA-MONTES, H. M. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS Yeast Research**, v. 15, p. 1-10, 2015.

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

MORRISON, A. S. et al. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical Mycology**, v. 2, p. 88–90, 2013.

NASCIMENTO, R. C.; ALMEIDA, S. R. Humoral immune response against soluble and fractionate antigens in experimental sporotrichosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 43, p. 241-247, 2005.

NOBRE, M. O. et al. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.9, n.1, p.36-41, 2002.

NUNES, G. D. L. et al. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. **Arquivos Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 2, p. 157-161, 2011.

O'DONNELL, K. et al. Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v.41, p. 61-78, 2000.

OLIVEIRA, M. M. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257-267, 2011a.

OLIVEIRA, D. C et al. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047-304, 2011b.

OLIVEIRA, M. M. et al.. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. **Mycopathologia**, v. 169, p. 359–363, 2010.

OROFINO-COSTA, R. et al. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

PADHYE, A. A. et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2492-2494, 1992.

PENG-CHENG, L. et al. Estudos histopatológicos de *Sporothrix schenckii* - camundongos inoculados - Possíveis funções de leucócitos polimorfonucleares em camundongos normais e imunocomprometidos (nus congenitamente atímicos). **Mycopathologia**, v.122, p. 89-93, 1993.

PEREIRA, S. A. et al. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 331-341, 2009.

PEREIRA, S. A. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.

PEREIRA, S. A. et al. Sensibilidade do exame citopatológico no diagnóstico da esporotricose felina. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 4, p. 220-223, 2011.

PEREIRA, S. A. et al. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 392-393, 2014.

PÉREZ-ELIZONDO, A. D; PINEDA-PINEDA, J. A.; SÁNCHEZ-CASTILHO, J. L. Esporotricosis en la población pediátrica: a propósito de dos casos. **Infectio**, v. 16, n. 2, p. 128–131, 2012.

PIRES, C. Esporotricose felina: revisão de literatura. **Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia do Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 16-23, 2017.

PORTUONDO, D. et al. A cell wall protein-based vaccine candidate induces protective immune response against *Sporothrix schenckii* infection. **Immunobiology**, v. 221, p. 300-309, 2016.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE. Secretaria Municipal de Saúde. **Esporotricose protocolo de enfrentamento da doença em Belo Horizonte**. Belo Horizonte, 2018.

PREFEITURA DE GUARULHOS. Secretaria Municipal de Saúde. Portaria nº 064/2016 de 29 de julho de 2016. Determinar a notificação compulsória, de importância municipal, dos casos suspeitos e confirmados de esporotricose humana. **Diário Oficial do Município de Guarulhos**, Guarulhos, SP, 29 jul. 2016, p. 27.

PREFEITURA DE SALVADOR. Secretaria Municipal de Saúde. Nota Técnica DVIS/CCZ/CIEVS Nº 04/2018, 23 de fevereiro de 2018. **Orientações sobre notificação da Esporotricose no município de Salvador, BA**. Salvador, 2018.

PREFEITURA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. Prefeitura Municipal. Decreto Nº 17.100, de 04 de junho de 2014. **Reorganiza os distritos de saúde, os núcleos de apoio aos distritos de saúde e as áreas de abrangência das unidades de saúde.** São José do Rio Preto, 2014.

PREFEITURA DE SÃO PAULO. Secretaria Municipal de Saúde. Informe técnico 01/2011, de 26 de agosto de 2011. **Esporotricose município de São Paulo.** São Paulo, 2011.

QUEIROZ-TELLES, F. et al. Neglected endemic mycoses. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. 367-377, 2017.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 4, n.1, p. 51–54, 2000.

REIS, E. G. et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 399-404, 2012.

REIS-GOMES, A. R. et al. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 4, p. 272-284, 2012.

REIS, E. G. et al. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v. 54, n. 7, p. 684-690, 2016.

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

ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Drogas antifúngicas. In: SIDRIM, J. J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 36-44.

ROCHA, F. R. D. B. **Tratamento da esporotricose felina refratária com a associação de iodeto de potássio e itraconazol oral.** Rio de Janeiro: IPEC-FIOCRUZ, 2014. 62p. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas), Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, 2014.

ROCHETTE, F.; ENGELEN, M.; VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in

animal health – practical applications. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 31-53, 2003.

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

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, 2014.

RODRIGUES, A. M. et al. Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of Proteome Research**, v. 115, p. 8-22, 2015a.

RODRIGUES, A.M. et al. Proteomics-based characterization of the humoral immune response in sporotrichosis: Toward discovery of potential diagnostic and vaccine antigens. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, p. e0004016, 2015b.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015c.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. **PLOS Pathogen**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.

ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CRISEO, G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. **Mycopathologia**, v. 172, p. 179 – 186, 2011.

ROSA, C. S. et al. Terapêutica da esporotricose: Revisão. **Science and animal head**, v. 5, n. 3, p. 212-228, 2017.

RUIZ-BACA, E. et al. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Medical Mycology**, v. 47, p. 185-196, 2009.

RUIZ-BACA, E. et al. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 248–250, 2011.

SANCHOTENE, K. O. et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, p. 652-658, 2015.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporothrichia. Bull. **Johns Hopkins Hospital**, v. 9, p. 286-290, 1898.

SCHEUFEN, S. et al. Clinical manifestation of an amelanotic *Sporothrix schenckii* complex isolate in a cat in Germany. **JMM Case Reports**, v. 4, n. 2, 2015.

SCHUBACH, T. M. et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v.153, n. 2, p. 83-86, 2002.

SCHUBACH, T. M. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). Journal of the American Veterinary Medical Association, v. 224, n. 10, p. 1623-1629, 2004.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C.; WANKE, B. Esporotricose. In: GREENE, C. E. **Doenças Infeciosas em cães e gatos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p. 678-684.

SECCHIN, P. et al. Criocirurgia como tratamento adjuvante na esporotricose: relato de três casos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 9, n. 3, p. 255-258, 2017.

SINGER, J. I.; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis. Etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State Journal Medical**, v. 52, p. 2147-2153, 1952.

SILVA, M. L. Q. Efeito inibitório, *in vitro*, do iodeto de potássio e da miltefosina frente a cepas do complexo *sporothrix schenckii* em biofilme nas formas filamentosas e leveduriforme. 2017. **Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica)**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILVA, M. B. T. et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, 2012.

STERLING, J. B.; HEYMANN, W. R. Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for 21st century uses, adverse effects, and contraindications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, p. 691-697, 2000.

UENOTSUCHI, T. et al. Differential induction of Th1-prone immunity by human dendritic cells activated with *Sporothrix schenckii* of cutaneous and visceral origins to determine their different virulence. **Infection and Immunity**, v. 18, p. 1637-1646, 2006.

VALLE-AVILES, L. et al. Functional, genetic and bioinformatic characterization of a calcium/calmodulin kinase gene in *Sporothrix schenckii*. **BMC Microbiology**, v.7, p. 107, 2007.

XU, T. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by Nested PCR Assay. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 161-165, 2010.

WALLER, S. B. et al. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 896–901, 2016.

WELSH, R. D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 8, p. 1123-1126, 2003.

YAMADA, K. et al. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: a 24 year experience in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, n. 2, p. 89-93, 2011.

ZHAO, M. et al. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 16, n. 11, p.940-947, 2015.

Apêndice A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na resolução nº 714/2002)

Pesquisadores Responsáveis:

Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo Almeida – Coordenadora CRBio 01.865/01-D

Ma. Mariela Domiciano Ribeiro Marques – Doutoranda CRBio 89732/01-D

Espa. Taiza Maschio de Lima – Mestrando CRBio 97749/01-D

Para obter maior conhecimento dos fatores epidemiológicos, ambientais, clínicos, micológicos e terapêuticos relacionados à esporotricose, zoonose com perfil endêmico causada por fungos, os pesquisadores estão desenvolvendo uma pesquisa científica a fim de elucidar questões a respeito da ocorrência desta doença em gatos. Nesse âmbito, o projeto de pesquisa intitulado “Complexo *Sporothrix schenckii* em felinos: avaliação dos fatores epidemiológicos, ambientais, clínicos e micológicos”, sob orientação da professora Dr^a. Margarete Teresa Gottardo Almeida, busca identificar casos de esporotricose em felinos no município de São José do Rio Preto através do isolamento do fungo em amostras clínicas de animais sintomáticos, contribuindo para a melhor compreensão da doença e para o desenvolvimento de estratégias de saúde pública.

Para tanto, é preciso que as amostras clínicas possuam alta qualidade, visto que serão submetidas às análises laboratoriais sensíveis. Portanto, o método de colheita é de suma importância para o êxito das futuras avaliações. Assim, será coletada uma amostra da secreção e/ou biópsia da lesão cutânea do animal. **Não haverá mudança no atendimento, na técnica de coleta e nem na conduta do veterinário.** Os procedimentos adotados pelo médico veterinário não serão alterados ou interferidos pela pesquisa, ou seja, permanecerão conforme a rotina veterinária habitual.

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido sobre a utilização de amostra proveniente de secreção e/ou biópsia da lesão cutânea do animal, com procedimento já estabelecido pelo médico veterinário para o diagnóstico, eu

.....
proprietário (a) do animal em questão, consinto em participar livre e espontaneamente deste estudo, doando a amostra e respondendo com veracidade a ficha de investigação de esporotricose (fornecidas pelos pesquisadores) nos itens destinados ao proprietário.

São José do Rio Preto,..... de de 2018.

Assinatura:.....

Contato telefônico:.....

Atenciosamente, pesquisadores responsáveis.

Contato: Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida - e-mail margarete@famerp.br. Mariela Domiciano Ribeiro Marques - e-mail marieladomiciano@gmail.com. Taiza Maschio de Lima – taizamlima@yahoo.com.br.

Apêndice B

Nº

FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE SUSPEITA DE ESPOROTRICOSE

Nome do Coletor	Tipo de Amostra: ☐ Secreção ☐ Biópsia ☐ Secreção e biópsia	Data da coleta / /
-----------------	--	-----------------------

Origem do Animal: Doméstico ☐ Rua ☐	
Em caso de animal de rua, local onde o animal foi encontrado (Rua, Bairro):	
Nome do Responsável	
Endereço (logradouro, nº, complemento, referências)	Telefone
Bairro	Município

Nome do Animal	Gênero ☐ Macho ☐ Fêmea	Idade ☐ Filhote ☐ Adulto	Primeiros Sintomas / /
----------------	--	--	---------------------------

Manifestação da doença: ☐ Cutânea localizada ☐ Cutânea linfática ☐ Cutânea disseminada ☐ Extra cutânea Lesão cutânea: ☐ Única lesão ☐ Múltiplas lesões ☐ Sem lesões específicas Tipo de lesão: ☐ Pápula ☐ Ulcerada ☐ Eritematosa ☐ Nodular Sinais e sintomas: ☐ Coriza ☐ Espirros ☐ Emagrecimento ☐ Alopecia ☐ Desconf. respiratório ☐ Sem sintomas ☐ Outro: _____
Uso de antifúngico: ☐ Não ☐ Sim. Neste caso preencher os itens abaixo *Nome do antifúngico _____ *Posologia _____ *Período do tratamento (dias) _____ * Número de tratamentos _____

Outras medicações administradas: () Não () Sim. Neste caso preencher os itens abaixo

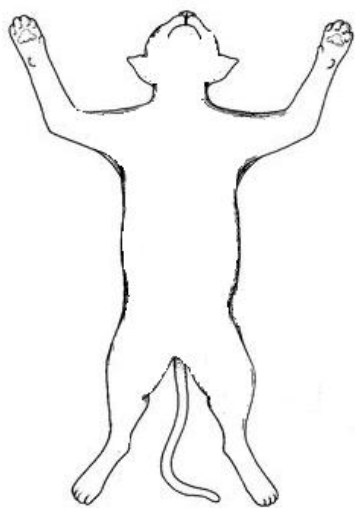
*Nome do medicamento _____

*Posologia _____

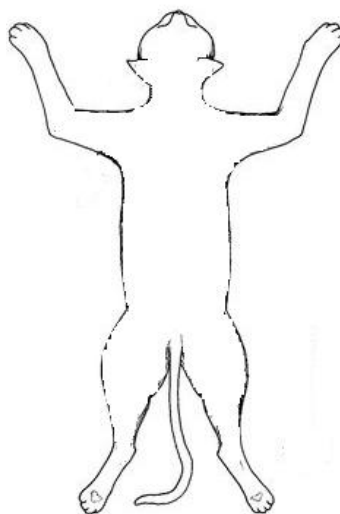
*Período do tratamento
(dias) _____

* Número de tratamentos _____

Local das lesões: (assinale com um "X" a localização das lesões)



Decubito ventral



Decubito dorsal



Face

Animal castrado:

() Sim

() Não

Em caso de animal doméstico, o animal tem acesso à rua:

() Sim

() Não

Há indicação para eutanásia:

() Sim

() Não

Há indicação para diagnóstico diferencial?

() Não

() Sim. Para qual doença _____

Após a consulta, qual foi a conduta adotada:

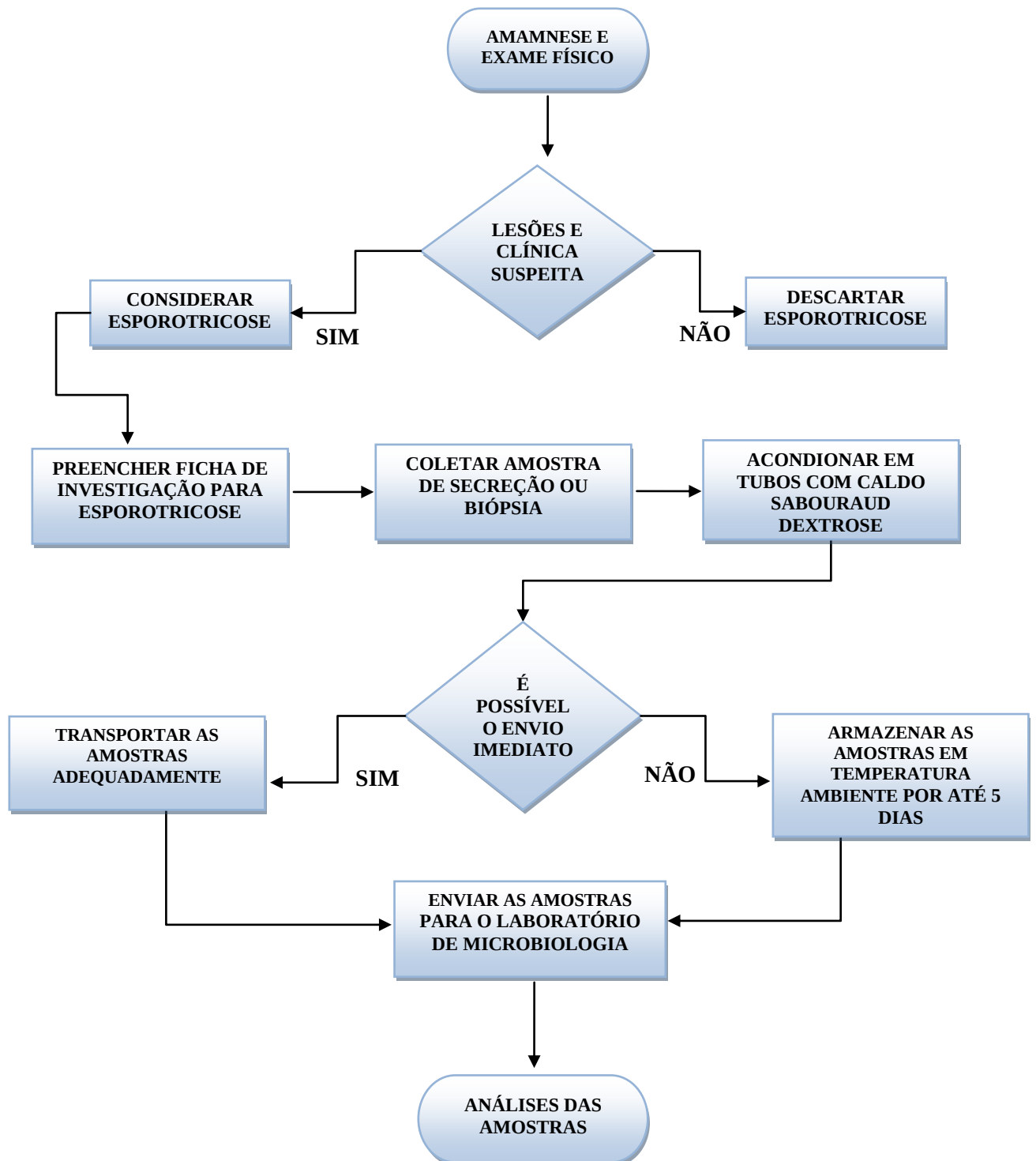
() Animal iniciou o tratamento

() Animal foi eutanasiado

() Outra _____

Observações:

Apêndice C



Anexo A



Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP
Autarquia Estadual – Lei nº 8899 de 27/09/94
(Reconhecida pelo Decreto Federal nº 74.179 de 14/06/74)



LICENÇA CEUA 02/2018

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

AUTORIZAÇÃO DE PROJETO APROVADO

(DE ACORDO COM ORIENTAÇÃO TÉCNICA CONCEA Nº 08 DE 18 DE MARÇO DE 2016)

Certificamos que a proposta intitulada "Complexo *Sporothrix schenckii* em felinos: avaliação dos fatores epidemiológicos, ambientais, clínicos e micológicos.", protocolo FAMERP nº **001-001592/2018**, em 15 de Março de 2018, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida, que envolve a produção/ manutenção/utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de ensino, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FAMERP (CEUA-FAMERP) em reunião de 28 de março de 2018.

FINALIDADE	Pesquisa Científica
VIGÊNCIA DA AUTORIZAÇÃO	13 de abril de 2018/ 01 de fevereiro de 2020
ESPÉCIE	Felinos
NÚMERO DE ANIMAIS	-
PESO/IDADE	-
SEXO	-
ORIGEM	Clinicas veterinária e Centro de zoonoses

São José do Rio Preto, 04 de abril de 2018.

Renato Ferreira da Silva
Prof. Livre Docente
CRM-SP 63.607
Prof. Dr. Renato Ferreira da Silva
Presidente CEUA

(Portaria FAMERP 109, de 28 de outubro de 2014 – DOESP de 05 de novembro de 2014, Poder Executivo – Seção I, 124(209) – 57)