

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA

DISSERTAÇÃO

**Caracterização Fenotípica, Genotípica e Perfil de
Sensibilidade a Antifúngicos de Isolados Clínicos de Cães e
Gatos Pertencentes ao Complexo *Sporothrix schenckii*
Oriundos do Estado do Rio de Janeiro**

Daniel Paiva Barros de Abreu

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E PERFIL DE
SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE
CÃES E GATOS PERTENCENTES AO COMPLEXO *Sporothrix schenckii*
ORIUNDOS DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

DANIEL PAIVA BARROS DE ABREU

Sob a Orientação do Professor
Francisco de Assis Baroni

e Co-orientação da Professora
Irene da Silva Coelho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

Seropédica, RJ
fevereiro de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A162c Abreu, Daniel Paiva Barros de, 1989-
Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de
sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos de
cães e gatos pertencentes ao Complexo Sporothrix
schenckii oriundos do estado do Rio de Janeiro /
Daniel Paiva Barros de Abreu. - 2017.
82 f.: il.

Orientador: Francisco de Assis Baroni.
Coorientadora: Irene da Silva Coelho.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária, 2017.

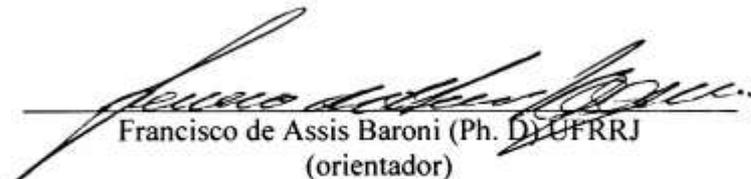
1. Sporothrix brasiliensis. 2. PCR-RFLP. 3.
antifúngicos. I. Baroni, Francisco de Assis, 1958-,
orient. II. Coelho, Irene da Silva, 1979-, coorient.
III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. IV.
Título.

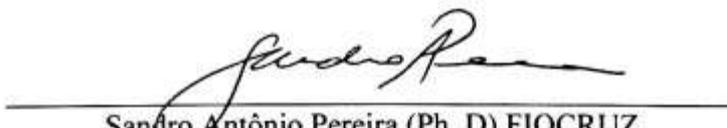
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DANIEL PAIVA BARROS DE ABREU

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia Animal.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20 / 02 / 2017


Francisco de Assis Baroni (Ph. D) UFRRJ
(orientador)


Sandro Antônio Pereira (Ph. D) FIOCRUZ


Luiz Cesso Hygino da Cruz (Ph. D) Universidade Estácio de Sá

AGRADECIMENTOS

A minha mãe **Julia Paiva**, meu pai **Claudio de Abreu**, meu irmão **Pedro Paiva** e meus avós, **Guilhermina dos Santos**, **Altina Gonçalves** (*in memoriam*) e **Claudio Gonçalves** (*in memoriam*) e a toda minha família, sem os quais esta etapa não seria possível.

À **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, pelos nove anos ininterruptos de aprimoramento profissional e pessoal.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária** e, em especial, ao **Prof. Jonimar Paiva**, a **Lorena Florêncio** e demais membros do colegiado executivo.

Aos professores do **Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária – UFRRJ**, pela possibilidade de constante aprendizado.

Ao **Prof. Douglas McIntosh** pelo auxílio em todas as etapas de genotipagem e conhecimentos adquiridos no decorrer do mestrado.

Aos colegas de laboratório **Mário Makita**, **Marisol Alvim**, **Mário Bonci**, **Águida Oliveira**, **Marcia Jansen**, **Caroline Prado**, pela amizade e companheirismo diário.

Aos todos os amigos que a **UFRRJ** me proporcionou, mas em especial a **Jorge Gabriel Teixeira**, **José Philippe Matieli**, **Mariana Braga** e **Cristine Kirsten**.

À **Maria Walderez Szeszs**, **Marilena Martins**, **Marcia Melhem**, **Lucas Bonfietti** e toda a equipe do **Centro de Micologia do Instituto Adolfo Lutz**, pela receptividade e auxílio em diversas etapas do presente estudo.

Aos membros da banca avaliadora **Claudete Rodrigues Paula**, **Luiz Celso Hygino da Cruz**, **Sandra Maria Gomes Thomé** e **Sandro Antonio Pereira** ao tempo dedicado para o aprimoramento do presente trabalho.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro** pela viabilidade financeira para realização deste projeto de pesquisa, bem como à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** pela bolsa de estudos fornecida no decorrer destes dois anos.

À **Prof. Irene dos Santos Coelho** agradeço a co-orientação, acessibilidade e contribuição no delineamento experimental, bem como a revisão desta dissertação.

Ao **Prof. Francisco de Assis Baroni** agradeço a amizade e orientação dos últimos sete anos. Sua paciência e dedicação ao ensino e a instituição são inspiradores e serviram de incentivo para que eu chegasse até aqui.

A todos que de alguma forma contribuíram para que estes resultados fossem alcançados, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Caracterização fenotípica, genotípica e perfil de sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos de cães e gatos pertencentes ao Complexo *Sporothrix schenckii* oriundos do estado do Rio de Janeiro.** 2017. 82f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Patologia e Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Fungos dimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* são responsáveis pela esporotricose, importante infecção fúngica que apresenta distribuição mundial. Sua conhecida característica antroponótica apresenta grande relevância no estado do Rio de Janeiro, onde se verifica aumento significativo no número de pacientes humanos e animais acometidos pela doença nas últimas décadas, destacando-se em tais casos o papel do felino como agente transmissor. A descrição de novas espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, baseada em características fenotípicas e genotípicas, demonstrou o envolvimento de outros componentes deste gênero na epidemia instalada no estado. A verificação de isolados resistentes a itraconazol, antifúngico amplamente utilizado na medicina humana e veterinária para o tratamento da doença, é fato preocupante e tem possível associação a recidivas e falhas terapêuticas. O presente estudo objetiva a identificação fenotípica e genotípica de 168 exemplares oriundos de pacientes felinos e caninos, obtidos na rotina do Diagnóstico Microbiológico Veterinário - UFRRJ, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente à anfotericina B (AMB), cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), terbinafina (TRB) e voriconazol (VRC). A partir de características morfofisiológicas foi possível identificar 159 (94,64%) isolados como *S. brasiliensis* e 9 (5,36%) como *S. luriei*. Contudo, metodologias moleculares identificaram 168 (100%) *S. brasiliensis*, a partir de PCR-RFLP em gene responsável pela síntese de calmodulina. O teste de sensibilidade, realizado a partir do documento M38-A2 (CLSI) determinou maior eficácia *in vitro* para TRB, seguido por ITC, KTC, AMB e VRC, respectivamente. Cepas resistentes a ITC não foram detectadas no presente estudo. Tais resultados demonstram que a identificação alcançada exclusivamente por métodos fenotípicos não é recomendada para caracterização de componentes do complexo *Sporothrix schenckii*. Comprova-se ainda a predominância de *S. brasiliensis* em outras regiões do estado do RJ. A maior eficácia de TRB, somada a ausência de exemplares resistentes a ITC, reforça a necessidade de estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos para otimização dos protocolos terapêuticos atualmente utilizados. Obtenção de maiores informações acerca dos isolados provenientes de amostras provenientes de cães e gatos correlacionados a espécies dentro do complexo *S. schenckii*, bem como a avaliação da eficácia *in vitro* de antifúngicos proporcionam conhecimento sobre alternativas terapêuticas. Tais informações auxiliam no entendimento do quadro instalado no estado do Rio de Janeiro e fornece dados de grande utilidade para o tratamento humano e veterinário.

Palavras-chave: *Sporothrix brasiliensis*, PCR-RFLP, Antifúngicos

ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Phenotypic and molecular characterization and antifungal susceptibility profile of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* complex obtained from dogs and cats from the state of Rio de Janeiro.** 2017. 82p. Dissertation (Master Science in Animal Pathology) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2017.

Dimorphic fungi belonging to *Sporothrix schenckii* complex are responsible for sporotrichosis, important fungal infection with worldwide distribution. The anthroponotic characteristic is of high relevance in the state of Rio de Janeiro, where an increasing in the number of cases in human patients was observed in the last decades, highlighting the role of domestic cat as a transmitter agent. The description of new species compounding de *Sporothrix* genus, based on phenotypic and genotypic evaluations, showed the involvement of other members of this group in the epidemic status installed in Rio de Janeiro. The verification of strains resistant to itraconazole, a widely used antifungal in human and animal medicine for the treatment of this mycosis, is an important factor that possibly results in relapse and therapeutic failure of this disease. The present study aimed to identify, by phenotypic and molecular approaches, 168 isolates obtained from the routine of Veterinary Clinical Microbiology Laboratory – UFRRJ, and the determination of minimal inhibitory concentration (MIC) for amphotericin B (AMB), ketoconazole (KTC), itraconazole (ITC), terbinafine (TRB) and voriconazole (VRC). Based on morphophysiological characteristics it was possible to identify 159 (94.64%) isolates as *S. brasiliensis* and 9 (5.36%) as *S. luriei*. However, applying PCR-RFLP of calmodulin 168 (100%) samples were identified as *S. brasiliensis*. The susceptibility test, based on M38-A2 document (CLSI), showed that TRB was the most effective antifungal tested, followed by ITC, KTC, AMB, and VRC, respectively. No ITC resistant isolates were detected in the present study. These results demonstrate that the identification reached only by phenotypic evaluation is not recommended for the characterization of *Sporothrix schenckii* complex components. It also proves the predominance of *S. brasiliensis* in other regions of RJ state. The better efficacy of TRB added to the absence of isolates resistant to ITC support the necessity of pharmacodynamics and pharmacokinetics studies for the optimization of the therapeutic protocols. More information about isolates from dogs and cats correlated with the species from the *S. schenckii* complex, as well as *in vitro* antifungal efficacy evaluation provide knowledge about therapeutic alternatives. In this way, the present study also provides relevant information about the endemic status in Rio de Janeiro and important data for the treatment of human and animal sporotrichosis.

Key words: *Sporothrix brasiliensis*, PCR-RFLP, Antifungals

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|--------------|
| Tabela 1 | Classificação taxonômica do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> | p. 05 |
| Tabela 2 | Diâmetros de colônia obtidos em Ágar Batata Dextrose após 14 e 21 dias de desenvolvimento com incubação a 30 °C e 37 °C | p. 38 |
| Tabela 3 | Fragmentos obtidos a partir da ação enzimática de <i>HhaI</i> sobre gene CAL para diferenciação de componentes do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> | p. 41 |
| Tabela 4 | Perfis de suscetibilidade a antifúngicos de 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> oriundos de animais frente a cetoconazol, itraconazol, voriconazol, terbinafina e anfotericina B | p. 42 |
| Tabela 5 | Frequência de concentração inibitória mínima (CIM) verificada a partir das 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ | p. 42 |
| Tabela 6 | Suscetibilidade a cetoconazol verificada a partir de 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015) | p. 43 |
| Tabela 7 | Suscetibilidade a itraconazol verificada a partir de 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015) | p. 43 |
| Tabela 8 | Frequência da concentração inibitória mínima (CIM) verificada a partir das 168 amostras de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015) frente a voriconazol | p. 44 |
| Tabela 9 | Suscetibilidade a terbinafina verificada a partir de 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015) | p. 44 |
| Tabela 10 | Suscetibilidade a anfotericina B verificada a partir de 168 exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015) | p. 45 |
| Tabela 11 | Concentração inibitória mínima (CIM) de exemplares de <i>Sporothrix brasiliensis</i> frente a cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), terbinafina (TRB) e anfotericina B (AMB) em estudos prévios | p. 53 |

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** *Primers* espécie-específicos desenvolvidos para identificação de exemplares do complexo *Sporothrix schenckii* de relevância clínica **p. 22**
- Quadro 2** Características fenotípicas selecionadas para diferenciação de exemplares clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* em nível de espécie **p. 32**
- Quadro 3** *Primers* empregados para amplificação do gene que codifica calmodulina **p. 34**
- Quadro 4** Características da população amostrada para identificação de espécie e suscetibilidade de isolados do complexo *Sporothrix schenckii* (2012-2015, Seropédica – RJ) **p. 37**

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|--------------|
| Figura 1 | Braço esquerdo de paciente apresentando lesões ulceradas e cicatrizes em fase tardia da doença (Fonte: Hektoen & Perkins, 1899) | p. 03 |
| Figura 2 | Ilustração demonstrando transição progressiva da forma leveduriforme para forma filamentosa (Fonte: Lutz & Splendore, 1907) | p. 04 |
| Figura 3a | Fase filamentosa apresentando hifas delgadas, septadas e hialinas com presença de conídios sésseis e conidióforos em conformação característica (Lactofenol Azul de Algodão – 400x) | p. 08 |
| Figura 3b | Fase leveduriforme apresentando células com morfologia fusiforme a ovoide (Fucsina simples – 1000x) | p. 08 |
| Figura 4 | Macromorfologia em Ágar Batata Dextrose da fase filamentosa de <i>Sporothrix brasiliensis</i> com diferentes períodos de desenvolvimento | p. 08 |
| Figura 5a | Felino macho atendido no Setor de Clínica Geral do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA - UFRRJ), apresentando lesão ulcerada e aumento de volume em plano nasal | p. 13 |
| Figura 5b | Felino macho atendido no Setor de Dermatologia do HVPA, apresentando lesões ulceradas em face e membros anteriores e posteriores | p. 13 |
| Figura 6 | Figura 6 – Paciente canino atendido no Setor de Clínica Geral do HVPA, apresentando lesões ulceradas em membro posterior esquerdo (Gentilmente cedido por Natália Lôres Lopes) | p. 15 |
| Figura 7 | Prevalência mundial de esporotricose humana evidenciando a ampla distribuição da micose (Modificado de Chakrabarti et al., 2015) | p. 16 |
| Figura 8 | Avaliação citológica de paciente felino evidenciando grande quantidade de estruturas leveduriformes fusiformes a ovaladas com halo mais claro ao redor da célula (seta) no interior de macrófagos e em meio extracelular (Panótico – 1000x) | p. 23 |
| Figura 9 | Interpretação esquemática dos perfis gerados após eletroforese dos produtos de PCR-RFLP do gene CAL com a enzima <i>HhaI</i> (Fonte: Rodrigues et al., 2014) | p. 35 |
| Figura 10 | Colônias leveduriformes de exemplar pertencente ao complexo <i>Sporothrix schenckii</i> em Ágar Infuso de Cérebro e Coração acrescido de sangue de carneiro 5% e cloranfenicol | p. 38 |
| Figura 11 | Diâmetros de colônia obtidos após 21 dias de desenvolvimento a 30 °C em Ágar Batata Dextrose | p. 39 |
| Figura 12 | Diâmetros de colônia obtidos após 21 dias de desenvolvimento a 37 °C em Ágar Batata Dextrose | p. 39 |
| Figura 13 | Verificação de conídios sésseis pigmentados após 10 dias de desenvolvimento em <i>Corn Meal Agar</i> (Ácido Lático – 400x) | p. 40 |
| Figura 14 | Determinação do perfil de assimilação de fontes carbonadas de isolados do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> . A/E: glicose, B/F: rafinose, C/G: sacarose, D/H: YNB isento de fontes carbonadas | p. 40 |

Figura 15

Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos de PCR-RFLP do gene CAL utilizando a enzima de restrição *HhaI* em cepas padrão (Sb: *S. brasiliensis*, Sg: *S. globosa*, Sl: *S. luriei*, Sm: *S. mexicana*, Ss: *S. schenckii*) e 01-13: exemplares obtidos a partir do Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ. M = 50 bp DNA Ladder (Invitrogen™)

p. 41

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMB – Anfotericina B

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain and Heart Infusion* (Caldo Infuso de Cérebro e Coração)

BHIA – *Brain and Heart Infusion Agar* (Ágar Infuso de Cérebro e Coração)

CBS – Centraalbureau voor Schimmelcultures

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CMA – *Corn Meal Agar* (Ágar Fubá)

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Etilenodiaminotetracético

ES – Espírito Santo

GMS – *Grocott-Gomori Methenamine Silver Stain* (Prata-Metenamina de Grocott-Gomori)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

H&E – Hematoxilina e eosina

HVPA – Hospital Veterinário de Pequenos Animais

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

IPEC – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas

ITC – Itraconazol

KTC – Cetoconazol

PCR-RFLP – *Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism* (Reação em Cadeia de Polimerase – Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)

PAS – *Periodic Acid-Schiff* (Ácido Periódico de Schiff)

PBS Buffer – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato-salino)

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia de Polimerase)

PDA – *Potato Dextrose Agar* (Ágar Batata Dextrose)

RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA* (Reação de Amplificação Aleatória de DNA)

RJ – Rio de Janeiro

RS – Rio Grande do Sul

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute Medium*

SDA – *Sabouraud Dextrose Agar* (Ágar Sabouraud Dextrose)

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

SP – São Paulo

SRD – Sem Raça Definida

TRB – Terbinafina

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

VRC – Voriconazol

YNB – *Yeast Nitrogen Base* (Base Nitrogenada para Leveduras)

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|--------------|
| 1 | INTRODUÇÃO | p. 01 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | p. 03 |
| 2.1 | Histórico | p. 03 |
| 2.2 | Taxonomia | p. 04 |
| 2.3 | Fisiologia | p. 06 |
| 2.4 | Morfologia | p. 07 |
| 2.5 | Patogenia | p. 09 |
| 2.6 | Fatores de Virulência | p. 09 |
| 2.6.1 | Termotolerância | p. 10 |
| 2.6.2 | Melanina | p. 10 |
| 2.6.3 | Dimorfismo | p. 11 |
| 2.7 | Esporotricose Humana | p. 12 |
| 2.8 | Esporotricose Animal | p. 13 |
| 2.8.1 | Felinos | p. 13 |
| 2.8.2 | Caninos | p. 14 |
| 2.9 | Epidemiologia | p. 15 |
| 2.9.1 | Transmissão e fontes de infecção | p. 15 |
| 2.9.2 | Distribuição geográfica | p. 16 |
| 2.9.3 | Transmissão zoonótica | p. 18 |
| 2.9.4 | Estado do Rio de Janeiro | p. 19 |
| 2.10 | Métodos de Identificação | p. 20 |
| 2.10.1 | Métodos fenotípicos de identificação | p. 20 |
| 2.10.2 | Métodos genotípicos de identificação | p. 20 |
| 2.11 | Diagnóstico | p. 22 |
| 2.11.1 | Coleta de amostras | p. 22 |
| 2.11.2 | Exame direto | p. 23 |
| 2.11.3 | Isolamento fúngico | p. 23 |
| 2.11.4 | Histopatologia | p. 24 |
| 2.11.5 | Detecção molecular | p. 24 |
| 2.12 | Tratamento | p. 25 |
| 2.12.1 | Iodeto de potássio | p. 25 |
| 2.12.2 | Anfotericina B | p. 26 |
| 2.12.3 | Cetoconazol | p. 26 |
| 2.12.4 | Itraconazol | p. 27 |
| 2.12.5 | Terbinafina | p. 27 |
| 2.12.6 | Voriconazol | p. 28 |
| 2.12.7 | Demais modalidades de tratamento | p. 28 |
| 2.12.8 | Suscetibilidade a agentes antifúngicos | p. 29 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | p. 31 |
| 3.1 | Comissão de Ética | p. 31 |
| 3.2 | Origem dos Exemplos Fúngicos | p. 31 |
| 3.3 | Purificação dos Isolados | p. 31 |
| 3.4 | Identificação Fenotípica | p. 32 |
| 3.4.1 | Diâmetros de colônias | p. 32 |
| 3.4.2 | Produção de conídios sésses pigmentados | p. 32 |
| 3.4.3 | Provas de assimilação de fontes carbonadas | p. 33 |

| | | |
|----------|--|--------------|
| 3.5 | Identificação Genotípica | p. 33 |
| 3.5.1 | Extração de ácidos nucleicos | p. 33 |
| 3.5.2 | Amplificação do gene da calmodulina (CAL) | p. 34 |
| 3.5.3 | Digestão enzimática | p. 35 |
| 3.6 | Teste de Sensibilidade a Antifúngicos | p. 35 |
| 3.6.1 | Preparação de antifúngicos | p. 36 |
| 3.6.2 | Preparação do inóculo | p. 36 |
| 3.6.3 | Incubação e leitura | p. 36 |
| 4 | RESULTADOS | p. 37 |
| 4.1 | Exemplares fúngicos | p. 37 |
| 4.2 | Purificação de Isolados | p. 37 |
| 4.3 | Identificação Fenotípica | p. 38 |
| 4.3.1 | Diâmetros de colônias | p. 38 |
| 4.3.2 | Produção de conídios sésseis pigmentados | p. 39 |
| 4.3.3 | Provas de assimilação de fontes carbonadas | p. 40 |
| 4.4 | Identificação Genotípica | p. 41 |
| 4.5 | Teste de Sensibilidade a Antifúngicos | p. 42 |
| 5 | DISCUSSÃO | p. 46 |
| 6 | CONCLUSÕES | p. 57 |
| 7 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | p. 58 |
| | ANEXOS | p. 73 |

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose, micose subcutânea que acomete o ser humano e animais, é causada por fungos dimórficos pertencentes ao atual complexo *Sporothrix schenckii*. Tais agentes apresentam-se distribuídos na natureza, estando estreitamente relacionados a material vegetal e solos ricos em matéria orgânica. Considerando estes reservatórios principais, os casos de esporotricose, usualmente, apresentavam-se esporadicamente em decorrência de lesões traumáticas e conseqüente inoculação de estruturas fúngicas. Sendo ainda caracterizada como antropozoonose, a transmissão do agente etiológico pode ocorrer através da mordedura ou arranhadura de animais previamente infectados para indivíduos sadios. Destaca-se em tal perfil epidemiológico o papel do felino doméstico.

A crescente casuística da esporotricose nos últimos anos revelou que estamos vivendo um quadro epidêmico, onde toda a população da região metropolitana e adjacências do Rio de Janeiro encontram-se suscetíveis. A situação é bastante agravada em virtude do grande número de felinos acometidos na região, resultando em infecções em humanos e outros animais. A elevada suscetibilidade dos gatos somada ao comportamento dos mesmos e ao manejo semi-domiciliar que é muitas vezes implementado, principalmente em regiões com menor condição socioeconômica, torna a compreensão da esporotricose felina peça chave para o controle da epidemia atualmente instalada. O quadro clínico verificado em felinos é usualmente mais agressivo que os observados em outras espécies animais. Destaca-se ainda a elevada carga microbiana presente na superfície de lesões cutâneas, o que favorece a transmissão do fungo por meio da mordedura e/ou arranhadura dos animais no momento de disputas territoriais ou mesmo durante a contenção para administração de medicamentos por parte dos tutores. O abandono destes felinos, bem como o descarte inadequado de suas carcaças, favorece a disseminação da enfermidade e dificulta ainda mais o controle da esporotricose no estado. Assim sendo, informações correlacionadas com a esporotricose animal são de grande relevância para a saúde pública no estado do Rio de Janeiro.

No acometimento do ser humano, a enfermidade interfere no desempenho da rotina diária, as vezes prejudicando-o nas atividades de trabalho e, após a cura, deixa cicatrizes que promovem profundo desconforto estético e moral. Não se pode pensar na casuística da esporotricose e relevar prejuízos econômicos e principalmente sociais. Por outro lado, a ignorância acerca da fisiopatogenia do agente faz as pessoas pensarem erroneamente que a ausência de lesões superficiais reflete a cura da doença. Além do mais, estamos diante de *Sporothrix brasiliensis* e provavelmente de outras espécies componentes do complexo *Sporothrix schenckii* ainda pouco detectadas em território nacional. É sabido que cepas de um micro-organismo podem variar quanto a produção de fatores de virulência e que espécies diferentes podem também ter um perfil de suscetibilidade diverso. Sendo assim, verificar qual ou quais espécies estão sendo veiculadas no Rio de Janeiro e a qual ou quais antifúngicos podemos recorrer para o tratamento humano e animal é objetivo premente. O crescente número de casos e a conseqüente terapia antifúngica implementada podem resultar no surgimento de isolados resistentes aos fármacos rotineiramente utilizados, como o itraconazol. A errônea descontinuidade do tratamento e resultante recidiva do quadro, problemática presente na medicina humana e veterinária, podem favorecer ainda mais a seleção de estirpes resistentes. A determinação do perfil de suscetibilidade de isolados clínicos possibilita o desenvolvimento de melhores protocolos terapêuticos.

O município de Seropédica encontra-se entre as áreas de maior proliferação de casos de esporotricose felina, refletindo diretamente na população humana. O Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) atende animais oriundos de várias áreas localizadas no âmbito da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, com tutores buscando tratamento para seus animais e orientação acerca da doença. O número de pacientes diagnosticados com esporotricose atendidos no referido Hospital Veterinário e também oriundo de consultórios e clínicas particulares da região pelo Laboratório de Diagnóstico Microbiológico Veterinário demonstrou aumento expressivo nos últimos anos. Apenas três casos de esporotricose foram diagnosticados no ano de 2011, 36 em 2012, 69 em 2013, 101 no ano de 2014 e 62 em 2015, mesmo com um longo período de paralização que interrompeu as atividades da instituição. Evidencia-se, desta forma, que esta enfermidade fúngica apresenta relevância em diferentes regiões do estado, sendo necessária melhor compreensão acerca dos agentes relacionados.

Objetiva-se neste trabalho a caracterização fenotípica e genotípica de isolados pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii*, obtidos a partir de espécimes clínicos de cães e gatos, determinando o perfil de sensibilidade a antifúngicos utilizados na rotina clínica veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A primeira descrição de quadro clínico de esporotricose na literatura data de 1896, realizada por Benjamin Schenck, estudante de medicina do Johns Hopkins School of Medicine, localizado na cidade de Baltimore, Estados Unidos. A verificação de lesões na mão e braço direito de paciente do sexo masculino, de 36 anos, com acometimento da cadeia linfática, gerando pontos inflamados e ulcerados, resultou no isolamento do agente. Schenck realizou a descrição detalhada das características morfológicas observadas, sendo o micro-organismo na época classificado como pertencente ao gênero *Sporothricum* (SCHENCK, 1898). O segundo caso, descrito no ano de 1899, também nos Estados Unidos, envolvia um paciente do sexo masculino, de 5 anos. Após sofrer lesão na mão ao utilizar um martelo, o paciente não apresentou a cicatrização esperada. Posteriormente, acompanhando a cadeia linfática do braço, nódulos ulcerados e não ulcerados agravaram o quadro (Figura 1). Neste episódio o agente recebeu a nomenclatura atualmente utilizada, *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN & PERKINS, 1899).



Figura 1 - Braço esquerdo de paciente apresentando lesões ulceradas e cicatrizes em fase tardia da doença (Fonte: Hektoen & Perkins, 1899)

No Brasil, o primeiro relato desta micose ocorreu em 1907. Lutz e Splendore verificaram lesões em roedores da espécie *Rattus norvegicus* (*Mus decumanus*, Pallas – 1778) no município de São Paulo. A ocorrência de peste na região resultou na avaliação sistemática de milhares de ratos, fornecendo material necessário para o isolamento e recuperação de agente infeccioso capaz de promover lesões cutâneas em roedores. Já nesta época, foi observada a capacidade dimórfica do mesmo, associando-se as mudanças morfológicas decorrentes do substrato e da temperatura de incubação (Figura 2). Foi possível ainda, através da reprodução da enfermidade em cobaias, verificar a via de transmissão através da inoculação traumática de propágulos fúngicos (LUTZ & SPLENDORE, 1907). Em 1952 houve o primeiro relato de esporotricose, destacando a espécie felina como potencial transmissora do fungo. Ressalta-se, entretanto, que a maior parcela de casos descritos até o momento correlacionava a aquisição da doença com fontes ambientais de infecção (SINGER & MUNCIE, 1952).

A ocorrência de infecção naturalmente adquirida envolvendo paciente felino em território nacional foi documentada apenas na década de 50 (FREITAS et al., 1956). No estado do Rio de Janeiro, a primeira descrição da esporotricose felina, realizada por Cruz et al. (1983), evidenciou a enfermidade em dois gatos oriundos da região serrana do estado do Rio de Janeiro. Baroni et al. (1998) tornaram a relatar o acometimento desta espécie animal. Em ambos relatos houve a verificação de múltiplas lesões sugestiva com diagnóstico confirmado através do isolamento do agente infeccioso. O grande intervalo entre estas duas descrições no estado do Rio de Janeiro evidencia a baixa ocorrência desta doença até o final da década de 90.

Posteriormente, profissionais do atual Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), unidade da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), descreveram o expressivo aumento no número de casos de esporotricose humana atendidos na instituição, oriundos de diferentes municípios do Rio de Janeiro. Verificou-se estreita correlação com felinos domésticos também acometidos pela micose subcutânea (SCHUBACH & SCHUBACH, 2000; BARROS et al., 2001). Tal levantamento pode ser considerado o primeiro alerta da atual situação presenciada em todo o estado, principalmente na região metropolitana.

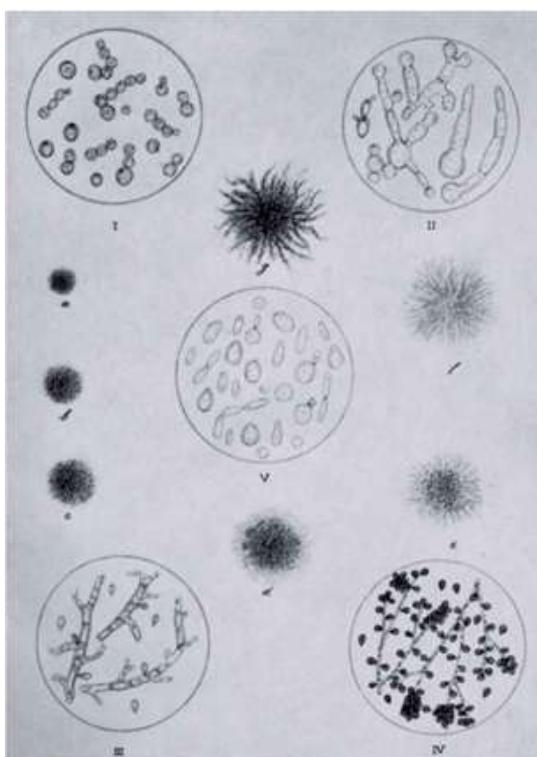


Figura 2 – Ilustração demonstrando transição progressiva da forma leveduriforme para forma filamentosa (Fonte: Lutz & Splendore, 1907)

2.2 Taxonomia

Componentes do gênero *Sporothrix* são seres eucariotas, sem mobilidade, heterotróficos e com presença de quitina em sua parede celular, sendo desta forma classificados como pertencentes ao reino Fungi (GUARRO, et al., 1999). A classificação taxonômica de fungos apresenta grande complexidade. A extensão de suas variações ainda não foi completamente elucidada e estes costumam apresentar ciclos de vida amplamente

distintos, sendo submetidos a diferentes pressões evolucionárias. Suas reproduções sexuadas e assexuadas são extremamente complexas, podendo afetar os padrões evolutivos. Para muitos fungos a fase sexual é ainda desconhecida e, muitas vezes, inexistente (PETERSEN & HUGHES, 1999).

Após extensa revisão na taxonomia fúngica, considera-se atualmente estes micro-organismos como membros da divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (Tabela 1) (GUARRO et al., 1999). Pertence à divisão Ascomycota em virtude de características moleculares e morfológicas. A presença de três genes responsáveis pela síntese de quitina o enquadra na classe Pyrenomycetes (CHUA et al., 1994). A detecção de poros simples nos septos com corpúsculos de Woronin, também são característicos desta divisão (MAUDY & VAN DER VEGTE, 1985). Análises moleculares de DNA ribossomal 18S indicaram que a fase teleomórfica de *S. schenckii* poderia ser *Ophiostoma stenoceras* (BARBEE & TAYLOR, 1992). Tal correlação filogenética foi confirmada ainda pela análise de sequenciamentos da região ITS de isolados de *Ophiostoma* spp. e *Sporothrix schenckii* (DE BEER et al., 2003).

Tabela 1 – Classificação taxonômica do complexo *Sporothrix*

| | |
|-----------------|---|
| Reino | – Fungi |
| Divisão | – Ascomycota |
| Classe | – Pyrenomycetes |
| Ordem | – Ophiostomatales |
| Família | – Ophiostomataceae |
| Gênero | – <i>Sporothrix</i> |
| Espécies | – <i>S. brasiliensis</i> <i>S. globosa</i> <i>S. luriei</i> <i>S. mexicana</i> <i>S. pallida</i> <i>S. schenckii</i> |

Informações baseadas no trabalho: Guarro et al., 1999 e Barros et al., 2010

Schenck (1898) ao realizar a primeira descrição acompanhada de isolamento fúngico, sugeriu que o mesmo pertencia ao gênero *Sporotrichum*. Embora o termo *Sporothrix* tenha sido mencionado na descrição de um segundo caso ao final do século XIX, muitos pesquisadores subsequentes consideraram a nomenclatura *Sporotrichum*, inicialmente aplicada, correta (HEKTOEN & PERKINS, 1899). Comparações morfológicas entre fungos obtidos a partir de quadros de esporotricose e *Sporotrichum aureum* demonstraram que não havia semelhança entre estes. Assim sendo convencionou-se a utilização do gênero *Sporothrix* para classificação deste agente. O autor destacou ainda que a modificação na classificação não resultaria em mudanças no nome da doença, sendo mantido o termo “esporotricose” (CHARMICHAEAL, 1962).

Anteriormente creditava-se apenas ao *S. schenckii* os quadros clínicos relatados. Com o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares e a realização de estudos filogenéticos em isolados oriundos de diferentes regiões geográficas, verificou-se que existem grupos geneticamente distintos. Através de estudos taxonômicos polifásicos, confirmou-se a clara distinção de isolados anteriormente caracterizados como *S. schenckii* e propôs-se a criação das espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*, ocasião em que todos os

isolados originários do Brasil foram então classificados como *S. brasiliensis* (MARIMON et al., 2007). Posteriormente, com base em características fenotípicas e sequenciamento multilocus, os isolados anteriormente classificados como *S. schenckii* var. *luriei* passaram a compor a espécie *S. luriei* (MARIMON, et al 2008). Adicionalmente, outra análise filogenética com as espécies *S. nivea*, *S. albicans* e *S. pallida*, demonstrou significativa similaridade entre elas, sendo proposta a denominação de tais espécies como *S. pallida*, considerando o primeiro relato realizado (MEYER et al, 2008). Verifica-se ainda a descrição de outras espécies pertencentes ao gênero, sendo estas com menor potencial patogênico. *Sporothrix chilensis* foi correlacionada a quadro de onicomicose, sendo ainda identificada a partir de amostras ambientais. Ressalta-se ainda o baixo potencial patogênico de cepas ambientais quando comparadas a espécies classicamente relacionadas a quadros clínicos em humanos e animais (RODRIGUES et al., 2016a; 2016b).

Sabe-se que, além das diferenças na distribuição geográfica, tais espécies apresentam ainda perfil de suscetibilidade a antifúngicos distinto, bem como diferenças na produção de fatores de virulência (OLIVEIRA, D. et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014b). Estudo utilizando modelo murino demonstrou nítida diferenciação quanto a mortalidade, carga microbiana presente em tecidos e lesões teciduais, ao comparar diferentes espécies do complexo *Sporothrix* (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Desta forma, podemos esperar diferenças no quadro clínico apresentado e na resposta a terapêutica implementada.

2.3 Fisiologia

A esporotricose é uma enfermidade amplamente distribuída ao redor do mundo. No entanto, a descoberta de novas espécies e a consideração do complexo *Sporothrix* evidenciou variações fisiológicas envolvendo os seus componentes (MARIMON et al., 2007; BARROS et al., 2011).

De maneira geral, a temperatura ótima de crescimento encontra-se dentro do intervalo de 30 °C a 37 °C. Entretanto, diferenças marcantes são verificadas entre as espécies que compõem o complexo. Isolados oriundos de países como México, Guatemala e Colômbia apresentam diferenças em relação à termotolerância, sendo observada a ocorrência de inibição no desenvolvimento a 35 °C e 37 °C. Tal característica explicaria a apresentação de formas mais brandas da enfermidade *in vivo* nestas regiões (MESA-ARANGO et al., 2002; MARIMON et al., 2007).

A capacidade assimilativa frente a diferentes fontes carbonadas e nitrogenadas também foram avaliadas para o presente gênero. A assimilação de sacarose, rafinose, ribitol, arabinose e amido apresentam variações dentre as espécies relacionadas. O complexo *Sporothrix* não possui atividade fermentativa (GHOSH et al., 2002; MARIMON et al., 2007). O acréscimo de glicose ao meio de cultura parece favorecer a síntese de melanina pelo fungo, sendo este um importante fator de virulência para este agente (ALMEIDA-PAES et al., 2009).

Os fungos pertencentes a este complexo apresentam capacidade de desenvolvimento em substratos com pH diversos. A fase micelial do micro-organismo tem ocorrência em valores variáveis de pH entre 3,0 a 12,0. Quando na forma de levedura, no entanto, a variação de pH observada é de 2,4 a 9,5. Sabe-se, ainda, que na morfologia unicelular o *Sporothrix* apresenta maior tolerância a variações na pressão osmótica e concentração de NaCl, sendo capaz de se desenvolver em meios contendo até 11% de NaCl, enquanto na fase micelial limita-se a 7% (GHOSH et al., 2002).

Ao avaliar diferentes características fisiológicas de isolados pertencentes ao gênero *Sporothrix*, Zhao et al. (2015) evidenciaram maior taxa de crescimento por cepas ambientais quando comparadas a cepas de origem clínica. Tal fato também é verificado na chave de identificação fenotípica sugerida para diferenciação de espécies do complexo. Colônias de *S. mexicana* e *S. pallida*, espécies ambientais ocasionalmente relacionadas a quadros clínicos, apresentam diâmetro de colônia superior a 50 mm, quando cultivadas a 30 °C (MARIMON et al., 2007).

2.4 Morfologia

Lutz e Splendore (1907), ao relatarem o primeiro isolamento de *Sporothrix schenckii* no Brasil, destacaram a visualização de estruturas leveduriformes no material a fresco, analisado com solução de soda ou potassa sódica. No entanto, após o desenvolvimento de colônias na superfície de meios de cultura, eram observadas estruturas características de fungos filamentosos.

Considerando que componentes do complexo *Sporothrix* apresentam duas morfologias distintas, de acordo com o substrato, atmosfera e a temperatura de incubação, estes são classificados como fungos dimórficos. São encontrados sob a forma filamentosa no meio ambiente, em sua fase saprofítica, enquanto no hospedeiro apresenta-se na forma unicelular (BOYCE & ANDRIANOPOULOS, 2015). Tal característica é compartilhada por outros fungos patogênicos como *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Talaromyces marneffe* (KLEIN & TEBBETS, 2007; BOYCE & ANDRIANOPOULOS, 2015).

A fase micelial ou pluricelular é caracterizada pela presença de hifas delgadas e septadas, hialinas, com ramificações contendo finos conidióforos com denticulos no ápice. A partir desta estrutura dá-se origem a conídios hialinos, unicelulares, de formato globoso a ovóide, sendo variável de acordo com a espécie, com morfologia semelhante a margaridas ou crisântemos. Estes conídios podem ainda surgir diretamente do micélio vegetativo, sendo denominados conídios sésseis (Figura 3a). Na fase unicelular, as leveduras apresentam pleomorfismo, promovendo reprodução através de mitose e apresentando morfologia variável de fusiforme, característica deste fungo, a arredondadas, com aproximadamente 2,5 a 5 µm (Figura 3b) (HOOG et al., 2001).

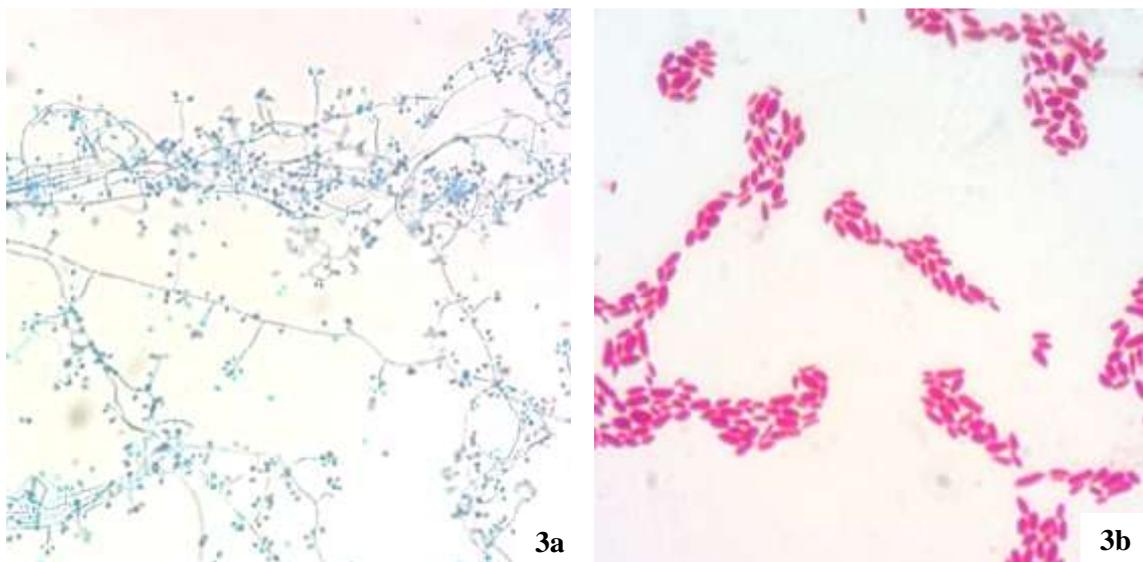


Figura 3a – Fase filamentosa apresentando hifas delgadas, septadas e hialinas com presença de conídios sésseis e conidióforos em conformação característica (Lactofenol Azul de Algodão – 400x); **3b** - Fase leveduriforme apresentando células com morfologia fusiforme a ovoide (Fucsina simples – 1000x)

Quanto à coloração, relevo e textura, pode-se afirmar que o aspecto macromorfológico das colônias filamentosas é geralmente membranoso, com superfície enrugada e coloração clara, inicialmente, podendo apresentar pigmentação escura ou acinzentada com o envelhecimento. Em virtude do denso entrelaçado de hifas finas, a colônia micelial tende a apresentar intensa resistência à manipulação. Na fase leveduriforme, o aspecto colonial é cremoso, com superfície irregular (HOOG et al., 2001).



Figura 4 – Macromorfologia em Ágar Batata Dextrose da fase filamentosa de *Sporothrix brasiliensis* com diferentes períodos de desenvolvimento

Importante destacar que características macro e micromorfológicas isoladamente são incapazes de diferenciar as espécies descritas no atual complexo *S. schenckii*, sendo

necessária a implementação de outros testes complementares para identificação fenotípica do agente (MARIMON et al., 2007).

2.5 Patogenia

Na interação entre o hospedeiro e micro-organismos patogênicos ou oportunistas, diversos fatores devem ser considerados para que ocorra o processo de infecção. Dentre estes, o estado imunológico do paciente e características intrínsecas ao patógeno são alguns fatores relevantes (CASADEVALL, 2006).

Sabe-se que a principal porta de entrada de *Sporothrix* spp. é a pele, através de lesões traumáticas, quando estruturas fúngicas são introduzidas no tegumento. Podemos, ainda que raramente, considerar ainda a via inalatória para ocorrência da esporotricose extracutânea em humanos (BARROS et al., 2011). O período pré-patente da enfermidade é bastante variável, em virtude do dimorfismo apresentado pelo gênero. Após a penetração no tegumento, quando ocorre a invasão da forma filamentosa, é necessário que a mudança morfológica ocorra nas camadas mais profundas do tecido. Por outro lado, quando a forma unicelular é introduzida, como ocorre na transmissão zoonótica, esta etapa não é necessária (LARSSON, 2011).

A verificação dos sinais clínicos ocorre na dependência das condições imunológico do hospedeiro, bem como dos fatores intrínsecos do agente. A carga microbiana depositada no momento da inoculação é outra questão interferente para a instalação da enfermidade (LARSSON, 2011). O agente pode permanecer na derme e tecido subcutâneo, no local de inoculação, se propagar através das estruturas linfáticas resultando em linfangite e linfadenite, ou se disseminar sistemicamente pela via sanguínea (LARSSON, 2011; SCHUBACH et al., 2012).

2.6 Fatores de Virulência

Considera-se como fator de virulência toda e qualquer característica de um micro-organismo que permita ou aumente a capacidade de invasão e desenvolvimento no hospedeiro. Algumas destas características tornam-se óbvias quando tratamos de patógenos de mamíferos, tais como a capacidade de desenvolvimento a 37 °C e em pH fisiológico. (HOGAN et al, 1996). Sabe-se que micro-organismos amplamente distribuídos na natureza encontram-se em constante disputa com outros indivíduos e, desta forma, muitos fatores de virulência foram inicialmente desenvolvidos para obtenção de nutrientes ou meio de sobrevivência contra agressões externas. Quando, em contato com hospedeiros humanos ou animais, tais características tornam-se também importantes para a invasão tecidual, obtenção de nutrientes e resistência à fagocitose, por exemplo (CASADEVALL, 2006). A soma destes fatores apresenta-se de forma distinta ao consideramos as espécies crípticas do complexo *Sporothrix*. Estudo prévio destacou a espécie *S. brasiliensis* como a mais virulenta do complexo, seguida por *S. schenckii* e *S. globosa*. Observou-se, ainda, virulência baixa ou ausente em cepas de *S. mexicana* e *S. pallida*, evidenciando a importância de diferenciação das espécies envolvidas em quadros clínicos (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009).

Fungos pertencentes ao complexo *S. schenckii* apresentam uma série de características intrínsecas que auxiliam na invasão do agente e instalação do processo infeccioso. A produção de enzimas extracelulares, como as proteases (I e II) por este fungo dimórfico é uma

delas e também está presente em outros fungos com potencial patogênico, tais como *Cryptococcus* sp. e *Candida* sp. (DE ARAUJO et al., 2001). Foram ainda caracterizados outros fatores, como a expressão de adesinas ligantes de fibronectinas, sendo esta correlacionada a interação do fungo com células epiteliais. Tais receptores encontram-se presentes nas formas filamentosa e unicelular do fungo. Verifica-se, no entanto, maior capacidade de adesão na forma patogênica do mesmo (LIMA et al., 2004).

Fernandes et al. (1999) estudaram a relação entre a composição de açúcar da parede celular e a virulência. Estes pesquisadores sugerem que a alta concentração de ramnose na parede celular de culturas jovens (4-7 dias de idade) apresenta relação com a patogenicidade de conídios de *S. schenckii*. Verificou-se que culturas jovens produziram entre 40 a 100% de mortalidade quando inoculadas por via intravenosa em camundongos suíços albinos. Em contraste, culturas com 10-12 dias falharam em induzir mortalidade nos camundongos (100% de sobrevivência).

Sabe-se, no entanto, que os fatores de virulência atuam em conjunto e a inibição na expressão de apenas um destes pode ser suficiente para impedir completamente o desenvolvimento da infecção. Deve-se ressaltar, ainda, que diferentes espécies dentro do complexo *S. schenckii* podem apresentar maior ou menor potencial de virulência e, mesmo considerando uma única espécie, podemos detectar diferenças relevantes neste aspecto (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016). Comprovou-se também a capacidade de ampliação da virulência de cepa de *S. brasiliensis* ao promover uma infecção crônica em paciente humano, o que constitui preocupação ao considerarmos as recorrentes recidivas e tratamentos de longa duração para esporotricose (FREITAS et al., 2015).

2.6.1 Termotolerância

A termotolerância consiste em característica fundamental para a infecção em humanos e animais. A capacidade de resistir a temperaturas mais elevadas do que as observadas no ambiente externo torna-se necessária para o desenvolvimento do micro-organismo no interior do hospedeiro (CASADEVALL, 2006). O gênero *Sporothrix*, de modo geral, apresenta temperatura ótima de desenvolvimento entre 30 e 37 °C, sendo todas as espécies inibidas a partir de 40 °C (MARIMON et al., 2007). Verifica-se na espécie *S. globosa*, a baixa capacidade de desenvolvimento a 37 °C. Tal característica fisiológica é refletida no quadro clínico promovido pelo agente. De modo geral, a forma clínica cutâneo-fixa é observada nestes casos, demonstrando a incapacidade do agente de se disseminar através das vias linfáticas (MESA-ARANGO et al., 2002). Em contrapartida, a maior termotolerância demonstrada por exemplares de *S. brasiliensis* pode resultar em maior vantagem do micro-organismo ao promover quadros infecciosos em mamíferos (RODRIGUES et al., 2013b). A capacidade de desenvolvimento a 37 °C de 44 isolados de *S. schenckii* oriundos de felinos, demonstrou maior variabilidade dentro desta espécie, com apenas 36 amostras positivas para este teste (HAN et al., 2017).

2.6.2 Melanina

Melaninas são polímeros com diversas estruturas moleculares, apresentando coloração negra ou marrom escura, formada pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos. Tais componentes são produzidos por ampla gama de organismos, de protozoários a eucariotas. Muitos fungos são capazes de produzir melaninas e a função destes pigmentos está relacionada à sobrevivência em diferentes condições ambientais desfavoráveis, bem como condições encontradas nos hospedeiros (LIU & NIZET, 2009). Para fungos

patogênicos, como *Cryptococcus neoformans*, sabe-se que micro-organismos mutantes, deficientes na produção de melanina, apresentam baixa invasividade e baixa taxa de viabilidade *in vivo* (KWON-CHUNG et al., 1982). A produção de melanina impede a fagocitose desta levedura encapsulada por macrófagos *in vitro* e em modelos murinos, interferindo ainda na ação e eficácia de peptídeos antimicrobianos endógenos e no mecanismo de ação de agentes antifúngicos contra *C. neoformans* (WANG et al., 1995; DE ARAÚJO et al., 2001).

Considerando o dimorfismo do gênero *Sporothrix*, tanto a fase micelial como a fase leveduriforme possuem a habilidade de sintetizar melanina. Embora macroscopicamente apenas as colônias filamentosas apresentem pigmentação característica, a produção de melanina já foi comprovada na fase leveduriforme *in vitro* e durante a infecção em hospedeiro (MORRIS-JONES et al., 2003).

A fase pluricelular ou filamentosa encontra-se amplamente distribuída na natureza. Assim sendo, a melanização atua como importante fator de resistência a condições desfavoráveis no ambiente. Foi demonstrado, ainda, que conídios melanizados aumentam a resistência a fagocitose por macrófagos. Tal fator torna-se importante na patogênese do agente, uma vez que esta estrutura de reprodução é usualmente a estrutura infectiva do fungo (MORRIS-JONES et al., 2003). Como já foi verificado na criptococose, a evolução clínica de cepas albinas demonstrou baixa invasividade em modelos murinos (MESA-ARANGO et al., 2002).

Outro importante papel da melanina já comprovado *in vitro* com exemplares de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* é a diminuição na eficácia de terbinafina em cepas produtoras de melanina. O mesmo não foi comprovado frente ao cetoconazol, itraconazol e anfotericina B (ALMEIDA-PAES et al., 2015).

2.6.3 Dimorfismo

A capacidade de modificar a morfologia de acordo com o substrato e temperatura em que se encontra é uma característica comum a fungos patogênicos, tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Talaromyces marneffeii* e os membros do complexo *Sporothrix schenckii*. Tais patógenos apresentam-se na forma filamentosa quando dispersos no ambiente, modificando para sua morfologia unicelular quando infectando o hospedeiro (KLEIN & TEBBETS, 2007).

As mudanças não consistem apenas em alterações morfológicas, mas também na composição da parede celular, presença de moléculas antigênicas e exposição de características de virulência. A modificação da forma saprofítica para forma patogênica resulta em menor expressão de $\beta(1,3)$ -glucana e maior expressão de $\alpha(1-3)$ -glucana, componentes da parede celular. O nível de $\alpha(1-3)$ -glucana apresenta estreita correlação com a virulência do agente (HOGAN & KLEIN, 1994). Medoff et al. (1987) demonstraram a incapacidade de *H. capsulatum* causar infecção em camundongos após a inibição de transição da fase filamentosa para leveduriforme, com a utilização de agente bloqueador. Em tal estudo foi demonstrado que o fungo ainda era capaz de se desenvolver em altas temperaturas, no entanto, não houve recuperação do agente a partir dos tecidos coletados. Verificou-se em outro estudo a diminuição no desenvolvimento de *H. capsulatum* no interior de macrófagos e na colonização de pulmão de camundongos, após a inibição do gene responsável pela síntese de $\alpha(1-3)$ -glucana (RAPPLEYE et al., 2004). Desta forma, sabe-se que esta capacidade de adaptação morfológica de acordo com o ambiente é essencial para a patogenicidade deste e de

outros fungos dimórficos, como os membros pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* (BOYCE & ANDRIANOPOULOS, 2015).

2.7 Esporotricose Humana

Considerando a esporotricose humana, sabe-se que o principal modo de infecção ocorre através da inoculação cutânea traumática de estruturas fúngicas, verificando-se ainda a rara ocorrência pela via pulmonar, decorrente da inalação de conídios (BARROS et al., 2011). Apesar dos estudos demonstrando o isolamento do agente a partir de alimentos, aparentemente a capacidade de infecção pela via digestiva está descartada (AHEARN & KAPLAN, 1968; KAZANAS, 1986). A inoculação traumática resultante da mordedura e arranhadura de felinos domésticos é a forma de infecção de maior destaque na atual epidemia observada no estado do Rio de Janeiro (BARROS et al., 2004; BARROS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016b). Considerando a ampla distribuição deste fungo na natureza, episódios isolados ocorriam, até então, em virtude do estreito contato com material vegetal, mas o atual estado epidêmico observado no Rio de Janeiro difere desse padrão predominantemente observado (KAUFFMAN, 1999).

A maioria dos casos de esporotricose permanece localizada somente na pele, podendo acometer ainda o tecido subcutâneo e vasos linfáticos. A forma cutâneo-fixa, está relacionada à ausência de termotolerância pela cepa envolvida (KWON-CHUNG, 1979). A verificação de múltiplas lesões está comumente associada a traumas em diferentes sítios, no momento da exposição ao agente. Formas cutâneas e linfocutâneas são as mais frequentemente observadas e geralmente não apresentam risco de morte ao indivíduo, mas raramente apresentam resolução espontânea, sem a administração de terapia antifúngica (KAUFFMAN et al., 2007).

O acometimento osteoarticular é uma manifestação pouco observada envolvendo fungos do complexo *Sporothrix*. Podemos nestes casos verificar o acometimento de uma ou múltiplas articulações. Estruturas osteoarticulares tornam-se infectadas secundariamente à disseminação hematogênica do agente, ou através de inoculação direta no local. Como consequência, em grande parte resultante da demora em alcançar o diagnóstico ou em virtude de baixa imunidade do hospedeiro, ocorrem danos articulares irreparáveis (CROUT et al., 1977; CHOWDHARY et al., 1991; KAUFFMAN et al., 2007).

A esporotricose pulmonar, outra rara manifestação, resulta da inalação de conídios de *Sporothrix* spp.. Apresenta prognóstico desfavorável, devido à frequente demora no alcance do diagnóstico e ainda a fatores predisponentes, tais como imunossupressão decorrente de co-infecção pelo vírus HIV e protocolos quimioterápicos. Tratamentos conservadores ou associados à ressecção cirúrgica não resultam em sucesso para todos os quadros da infecção quando ocorrem neste sítio (PLUSS & OPAL, 1986; KAUFFMAN et al., 2007).

Infecções disseminadas envolvendo isolados do complexo *Sporothrix* são incomuns, apresentando grande correlação com condições imunossupressoras predisponentes, como pacientes transplantados, HIV+ com baixa contagem de células CD4, sob tratamento quimioterápico ou fazendo uso de corticosteroides. Verifica-se o acometimento do sistema nervoso central em muitos dos quadros disseminados (GULLBERG et al., 1987; GOTTLIEB et al. 2003; KAUFFMAN et al., 2007; GEWEHR et al., 2013).

2.8 Esporotricose Animal

Embora a enfermidade ou contato com *Sporothrix* spp. já tenha sido previamente relatado em chimpanzés, suínos, roedores, mulas, equinos, jumentos, bovinos, cabras, raposas, tatus, golfinhos, camelos e aves (COSTA et al., 1994; CROTHERS et al., 2009; BARROS et al., 2011; SCHUBACH et al., 2012), maior relevância clínica vem sendo atribuída à espécie felina após o início da epidemia verificada no Brasil e à espécie canina devido ao estreito contato com felinos infectados (BARROS et al., 2001).

2.8.1 Felinos

Espécie mais acometida pela esporotricose em território nacional, sendo de grande preocupação para medicina humana e veterinária, considerando que constituem grande potencial de transmissibilidade (BARROS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016b). Gatos são altamente suscetíveis à infecção por *Sporothrix* spp., apresentando evolução de forma grave, diferente do que é observado em outras espécies. Em virtude do seu comportamento, adultos do sexo masculino e animais não castrados apresentam maior predisposição. Os sinais clínicos verificados englobam desde uma única lesão até formas sistêmicas fatais, ocorrendo em virtude da disseminação pela via hematogênica (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013).

As formas clínicas observadas com maior frequência são múltiplas lesões de pele e mucosas (Figuras 5a e 5b), podendo-se verificar o acometimento das mucosas conjuntival, nasal, oral ou genital. Adicionalmente, podem ser observadas lesões nodulares e ulcerosas em pele e mucosas, linfangite, linfadenite e regiões de necrose profundas, com possível exposição de estrutura muscular e óssea. Lesões em região de cabeça são mais frequentemente observadas, destacando-se o plano nasal e as orelhas. Dentre os sinais extra-cutâneos podemos considerar ainda as alterações respiratórias (SCHUBACH et al., 2004; LARSSON, 2011).



Figura 5a – Felino macho atendido no Setor de Clínica Geral do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA - UFRRJ), apresentando lesão ulcerada e aumento de volume em plano nasal
Figura 5b – Felino macho atendido no Setor de Dermatologia do HVPA, apresentando lesões ulceradas em face e membros anteriores e posteriores

Outra característica marcante da esporotricose na espécie felina é a frequente verificação de grande quantidade de células do micro-organismo em questão, ao realizarmos a avaliação citológica de exsudatos lesionais. Tal fato é concordante com o papel de destaque de felinos para a inoculação do fungo e consequente transmissão do mesmo (RODRIGUES et al., 2016b). Aparentemente, a contenção do agente infeccioso e posterior destruição no interior de granulomas pelo sistema imune são fatores que influenciam na agressividade e disseminação do quadro clínico verificado, bem como na presença de leveduras em lesões. Na esporotricose felina, a visualização de granulomas bem formados é inversamente proporcional à quantificação de estruturas fúngicas. Felinos com quadro clínico mais agressivo usualmente apresentam, ao exame histopatológico, granulomas mal formados e consequentemente uma maior quantidade de leveduras (MIRANDA et al., 2013). As células recrutadas para restringir e combater a infecção fúngica também parecem estar estreitamente relacionadas à carga microbiana verificada. Padrões histológicos com o predomínio de macrófagos estão mais associados à grande presença de leveduras nas lesões, enquanto que maior presença de células epidelióides é correlacionada com baixa carga fúngica (BAZZI et al., 2016).

Verifica-se a ocorrência desta micose de implantação preponderantemente em indivíduos do sexo masculino, com percentuais que variam de 65% a 76,9%, dependendo da região avaliada. A enfermidade é ainda, amplamente verificada em pacientes jovens e adultos, com idade média entre 24 a 108 meses (CHAVES et al., 2013; LARSSON, 2011). Tais aspectos são justificados pelo notório comportamento da espécie, cujos animais adultos constantemente entram em conflito no decorrer de seus passeios noturnos, seja na disputa por fêmeas ou por territórios (CRUZ, 2013). Considerando o perfil socioeconômico das regiões acometidas, animais sem raça definida são aqueles em que a esporotricose é mais verificada, chegando a 79,6% do total de pacientes atendidos no INI (FRIOCRUZ) entre os anos de 1998 e 2005 (CHAVES et al., 2013).

2.8.2 Caninos

A esporotricose canina pode ser considerada uma enfermidade benigna e pouco frequente quando comparada ao extenso acometimento em felinos. Na forma cutânea verifica-se o surgimento de lesões isoladas ou múltiplas, localizadas tipicamente em tronco, membros e cabeça, destacando-se o plano nasal (Figura 6). Tais lesões, inicialmente nodulares, podem evoluir para úlceras, com consequente drenagem de exsudato purulento (LARSSON, 2011; SCHUBACH et al., 2012). Bem como observado na esporotricose felina, nos casos extracutâneos, o sistema respiratório é o mais acometido quando consideramos os cães (SCHUBACH et al., 2006).

O acompanhamento de 44 cães no intervalo entre 1998 e 2003 evidenciou a ocorrência de lesões isoladas em 18 animais (40,9%), tendo sido baixa a visualização de estruturas leveduriformes em análises histopatológicas (16,7%). A avaliação retrospectiva destes pacientes exemplifica as diferenças marcantes entre as espécies canina e felina frente a esporotricose (SCHUBACH et al., 2006). A baixa verificação de estruturas fúngicas presentes nos exsudatos e amostras teciduais oriundas de cães, justifica a ausência de casos na literatura correlacionando a espécie canina à transmissão de *Sporothrix* spp (LARSSON, 2011).



Figura 6 – Paciente canino atendido no Setor de Clínica Geral do HVPA, apresentando lesões ulceradas em membro posterior esquerdo (Gentilmente cedido por Natália Lôres Lopes)

2.9 Epidemiologia

Verificou-se No decorrer dos anos, verificou-se uma alteração no perfil epidemiológico da esporotricose, com mudanças na frequência, distribuição geográfica e modo de transmissão. Tal modificação poderia ser explicada, em parte, por fatores ambientais, aumento da urbanização e desenvolvimento de técnicas de auxílio ao diagnóstico. Devemos considerar, ainda, que a determinação de notificação compulsória é relativamente recente no estado do Rio de Janeiro (RJ) para esporotricose humana, o que resulta na subestimação do número de casos conhecidos (RESOLUÇÃO SES-RJ nº 647 de 12 de junho de 2013). Ao incluir posteriormente epizootias na lista de doenças de notificação compulsória, a esporotricose felina também passou a ser computada com maior confiabilidade (PORTARIA GM/MS nº 1.271 de 06 de junho de 2014).

2.9.1 Transmissão e fontes de infecção

Tradicionalmente, a esporotricose foi relacionada durante longos períodos ao estreito contato de indivíduos suscetíveis com material vegetal contaminado, quando lesões podem ser ocasionadas por espinhos e acúleos ou outras porções vegetais. Considerando tal perfil, a enfermidade ficou conhecida como “doença do jardineiro” (ENGLE et al., 2007). A obtenção de isolados a partir de amostras de solos com posterior comprovação de sua patogenicidade através da inoculação em modelos murinos demonstra a estreita correlação desta micose com fontes ambientais, sendo esta uma das principais fontes de infecção (MACKINNON et al., 1969). Para o desenvolvimento da fase saprofítica, torna-se necessária a presença de matéria orgânica no solo, com pH entre 3,5 e 9,4, temperatura em torno de 31 °C e umidade relativa não inferior a 92% (NORIEGA et al., 1993).

Sabe-se, no entanto, que outras fontes de infecção também apresentam relevância epidemiológica. Na literatura, encontramos relatos envolvendo mordeduras e arranhaduras por diferentes espécies animais, como gatos, esquilos, insetos e tatus, por exemplo (MILLER & KELLING, 2002; BARROS et al., 2011). No estado do Rio de Janeiro, o papel do felino doméstico para a transmissão e manutenção do perfil endêmico da micose é conhecido. De 1.848 casos de esporotricose humana ocorridos no RJ entre 1997 e 2007, 80,3% tiveram como fonte de infecção, felinos em ambiente domiciliar. Em contrapartida, apenas nove pacientes (0,48%) lidavam diretamente com a terra (SILVA et al., 2012). A elevada carga de leveduras

Na Austrália, casos de esporotricose vêm sendo reportados nas últimas três décadas. Conias e Wilson (1998), ao avaliarem 16 casos humanos, correlacionaram a infecção ao contato prévio com feno mofado. Tal suspeita foi posteriormente confirmada com a análise molecular de cepas de origem clínica e ambiental, comprovando que a cepa de *Sporothrix schenckii*, predominante na porção oriental do país, apresentava envolvimento com quadros clínicos há pelo menos 15 anos anteriores ao estudo. Como medida preventiva recomendou-se o uso de luvas e camisas de manga comprida para manipulação do feno, o que resultou na diminuição no número de casos (O'REILLY & ALTMAN, 2006).

Na Ásia, Japão e China são os países de maior incidência. No Japão, a revisão de aproximadamente 2.500 casos de esporotricose humana no intervalo entre 1946 e 1982 evidenciou a alta prevalência em algumas regiões, sendo considerada a micose subcutânea mais frequente no Japão (FUKUSHIRO, 1984). No entanto, verifica-se nos últimos levantamentos, que houve decréscimo no número de casos, sendo este possivelmente justificado pela diminuição das atividades agrárias e redução de crianças na população. Tais frações da população era anteriormente relacionada à grande maioria dos casos (CHAKRABARTI et al., 2015). Na China, os registros de esporotricose são verificados em todas as províncias, exceto em Xizhang e Hainan. Sua transmissão encontra-se estreitamente relacionada com o contato de material vegetal. Maior número de casos é verificado durante o inverno, quando material vegetal é utilizado para atividades domésticas e para aquecimento no interior do domicílio, aumentando assim o contato de pessoas suscetíveis a material infectante (SONG et al., 2011; CHAKRABARTI et al., 2015;). Na China e demais países asiáticos, verificou-se a prevalência de casos envolvendo a espécie *S. globosa* (LIU et al., 2014).

No continente europeu, a incidência de esporotricose diminuiu consideravelmente após as primeiras décadas do século XX. Registros deste período demonstram elevada incidência na França, com cerca de 200 casos relatados no ano de 1920. Atualmente, tem sido baixa a incidência de casos autóctones da França (DE ARAUJO et al., 2001; MAGAND et al., 2009). Na Itália, 58 casos foram registrados no intervalo entre 1962 a 1992, sendo destacada a região sul do país. Existem ainda relatos em países como Espanha, Portugal e Inglaterra (CHAKRABARTI et al., 2015). Outro estudo italiano utilizando cepas clínicas e ambientais identificou 26 isolados de *S. pallida* dentre as amostras utilizadas. A predominância desta espécie, clinicamente pouco relevante, poderia justificar a baixa incidência de esporotricose na Itália e na Europa, de modo geral (ROMEIO et al., 2011).

Na América do Norte, mais especificamente nos Estados Unidos, foram verificados surtos epidêmicos, associados ao contato com material vegetal. Em 1975 e 1976, trabalhadores florestais encarregados pelo reflorestamento de regiões do Mississipi adquiriram esporotricose cutânea pelo contato com musgo utilizado para acondicionamento de sementes (POWELL et al., 1978). O acompanhamento de surtos em anos posteriores confirmou a estreita correlação entre *Sporothrix* spp. e o musgo, sendo este uma fonte ambiental de infecção (GROTTE & YOUNGER, 1981). No Canadá os poucos relatos existentes na literatura, são correlacionados principalmente a fontes ambientais de infecção (BUNCE et al., 2012).

Nos países que compõem a América Latina, bem como observado em outras áreas tropicais e subtropicais, a ocorrência de micoses subcutâneas é um problema de saúde frequente. A esporotricose acomete principalmente indivíduos com baixa condição socioeconômica, moradores de áreas rurais com atividades como agricultura, jardinagem e caça (QUEIROZ-TELLES et al., 2011). Podemos verificar o acometimento de pessoas de

ambos os sexos, diferentes faixas etárias e sem predisposição racial. Destaca-se o número de casos no Brasil, Colômbia, El Salvador, México, Uruguai e Venezuela. Há menor incidência na Argentina, Equador e Panamá (CHAKRABARTI et al. 2015). Estudos destacam as diferentes formas da enfermidade em cada região, onde se verifica a predominância da forma linfocutânea em países como México, Uruguai e El Salvador, enquanto na Costa Rica, Colômbia e Venezuela a forma cutâneo fixa é mais frequente (DÍAZ, 1989). Anteriormente creditavam-se tais variações às diferentes temperaturas ambientais, influenciando diretamente na apresentação clínica (MACKINNON & CONTI DÍAZ, 1962). Sabe-se atualmente que, espécies que compõem o complexo *Sporothrix* apresentam características fisiológicas distintas entre si, o que pode justificar as diferentes formas clínicas observadas (MARIMON et al., 2007).

2.9.3 Transmissão zoonótica

A elevada prevalência da esporotricose como antropozoonose difere das demais micoses endêmicas (CHAKRABARTI et al., 2015). O primeiro isolamento do agente a partir de animais, mais especificamente de roedores, foi realizado no Brasil por Lutz & Splendore (1907). Em meados do século XX, houve o primeiro relato de transmissão zoonótica da esporotricose correlacionando um felino apresentando lesões de pele como agente transmissor deste fungo (SINGER & MUNCIE, 1952). Read & Sperling (1982) destacaram o grande potencial de disseminação desta enfermidade a humanos a partir de felinos domésticos. Neste episódio, seis indivíduos apresentaram quadro clínico compatível com esporotricose após contato prévio com gato naturalmente infectado. É importante destacar a baixa frequência com que a enfermidade era observada em felinos, até então

Barros et al. (2001) evidenciaram aumento expressivo no número de casos de esporotricose humana e animal no estado do Rio de Janeiro. Um total de 66 pacientes humanos foram diagnosticados com esporotricose no atual INI (FIOCRUZ) no intervalo entre 1998-2000 e, em paralelo, 117 felinos foram atendidos com a mesma enfermidade. Já naquela época, foi possível verificar que 78,8% dos pacientes humanos atendidos possuíam em seu histórico o contato prévio com gatos. Dados mais recentes registram um total de 4.669 casos de esporotricose humana, com transmissão do agente através da espécie felina, em território nacional (GREMIÃO et al., 2017). O envolvimento desta espécie na transmissão de *Sporothrix* spp. para humanos e outros animais pode ocorrer por meio de mordeduras, arranhaduras ou contato com exsudato oriundo de lesões ulceradas (CHAVES et al., 2013). Ressalta-se que a estreita correlação da esporotricose com felinos domésticos não ocorre de forma restrita em nosso território nacional, havendo relatos prévios em países como Estados Unidos e Japão (SINGER & MUNCIE, 1952; READ & SPEARLING, 1982; WATANABE et al., 2016). A intensa carga de leveduras observada nas lesões em felinos e o comprovado isolamento de *S. schenckii* a partir das unhas desta espécie justificam o sucesso de transmissão por esta via (SOUZA et al., 2006; LARSSON, 2011).

Sendo assim, a esporotricose felina apresenta-se como um desafio a ser superado para a diminuição de sua casuística (CHAVES et al., 2013). O alto custo de medicamentos antifúngicos associado ao longo período de tratamento torna-se complicadores para tutores de baixa renda. O manejo de felinos domésticos é, muitas vezes, complicado, devendo-se atentar para a possibilidade de se contrair a infecção no momento da administração de medicamentos e cuidados com as lesões (BARROS et al., 2010; CRUZ, 2013). O caráter sistêmico da enfermidade faz com que alguns tutores interrompam o tratamento sem que tenha havido a cura, baseando-se apenas na cicatrização das lesões cutâneas. Tal fato pode resultar em reincidência e desenvolvimento de resistência aos antifúngicos comumente utilizados

(ROCHETTE et al, 2003; CHAVES et al., 2013). Devemos atentar ainda para o abandono de animais doentes em vias públicas e para o descarte inadequado de suas carcaças, o que favorece a disseminação do agente pelo ambiente e agrava o quadro endêmico atual (BARROS et al., 2010; CHAVES et al., 2013; CRUZ, 2013). A ocorrência de surtos em outros estados como Rio Grande do Sul (SANCHOTENE et al., 2015) e São Paulo (MONTENEGRO et al., 2014), comprovam não somente a emergência do agente fora do estado do Rio de Janeiro como o potencial de disseminação da enfermidade para outras localidades. Ressalta-se também, nestes estados, a correlação da espécie felina com o aumento no número de casos.

2.9.4 Estado do Rio de Janeiro

No estado do Rio de Janeiro, o INI, unidade da FIOCRUZ, responsável por atividades de pesquisa clínica, assistência e ensino especializado em doenças infecciosas e parasitárias, realizou levantamentos da casuística nas últimas duas décadas. Foi verificada, no intervalo entre 1987 e 1998, a ocorrência de 13 casos humanos atendidos pelo Instituto. Nos anos seguintes foi observado aumento expressivo no número de casos, quando foram diagnosticados 66 casos em humanos, 117 em felinos e 7 em cães no período entre 1998 e 2000 (BARROS et al. 2001). Em avaliação mais abrangente, englobando o período entre 1998 e 2009, foi detectada a ocorrência de cerca de 2.200 humanos, 3.244 felinos e mais de 120 cães acometidos pela enfermidade (BARROS et al., 2010). Até o ano de 2012 o número de diagnósticos alcançados na Instituição superou 4.000 casos em humanos e 3.800 casos em felinos (PEREIRA et al., 2014). Ao considerarmos a casuística de esporotricose felina registrada até o ano de 2015, o número de diagnósticos totaliza 4.703 casos (GREMIÃO et al., 2017). Destacaram-se em tais estudos retrospectivos, a estreita relação de pacientes humanos acometidos e o contato prévio com felinos infectados. Devemos atentar, ainda, que os levantamentos epidemiológicos referentes à esporotricose apresentam uma casuística subestimada, devido à ausência de notificação compulsória nos anos anteriores.

SILVA et al. (2012) realizaram avaliação exploratória sócioespacial dos casos de esporotricose humana atendidos no INI, no intervalo entre 2007 e 2011. O georeferenciamento de 1.681 casos demonstrou que 95,13% dos pacientes residiam na Região Metropolitana do Rio de Janeiro. Foi possível, ainda, verificar elevada concentração do número de casos nos municípios do Rio de Janeiro, Duque de Caxias, Nilópolis e São João de Meriti. Entretanto, na capital fluminense, a área central e zona sul não apresentaram focos de densidade da doença nestes períodos. Tal fato justifica-se, possivelmente, pelas melhores condições socioeconômicas, de infraestrutura e habitação. Outro possível fator que auxilia na permanência e disseminação do fungo em ambiente domiciliar consiste no ambiente em que este animal é mantido. Verificou-se a presença de plantas no quintal (83,5%), áreas de terra (59,9%), bem como materiais de construção e entulho (43,8%) no ambiente domiciliar destes animais (BARROS et al., 2010).

A ausência de políticas públicas para o controle da esporotricose, tratamento gratuito para o homem e animais, falta de programas que busquem o controle da esporotricose animal, bem como a escassez de unidades de atendimento populares para animais com esporotricose e o desconhecimento da população acerca desta doença, são alguns dos desafios que devem ser superados para que se obtenha o controle da enfermidade no estado do Rio de Janeiro (BARROS et al, 2010).

2.10 Métodos de Identificação

2.10.1 Métodos fenotípicos de identificação

Características fenotípicas são empregadas para definição de espécies. Na prática micológica, a utilização de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas para diferenciação de espécies é amplamente utilizada, principalmente em se tratando de fungos filamentosos. Tal prática, no entanto, pode ser insatisfatória, uma vez que diferenças tênues podem passar despercebidas para observadores menos atentos (CRUZ, 2013).

Inicialmente, a classificação de micro-organismos suspeitos de pertencerem ao complexo *Sporothrix* é realizada com a avaliação macromorfológica e micromorfológica dos isolados. A confirmação é realizada com a verificação do termodimorfismo, em que o fungo é repicado em meio enriquecido, como Ágar Infuso de Cérebro e Coração (*Brain and Heart Infusion Agar* - BHIA) ou Ágar Sangue de Carneiro 5% com incubação à 37 °C, verificação a partir do terceiro dia. A visualização de estruturas leveduriformes compatíveis atesta a capacidade termodimórfica do agente (CRUZ, 2013).

Tendo conhecimento das variações filogenéticas presentes em diferentes regiões do mundo (MARIMON, 2006) e da ampla variedade de suscetibilidade *in vitro* a diferentes antifúngicos (JOHNSON et al., 1998; McGUINNIS et al., 2001; TRILLES et al., 2005), MARIMON et al. (2007) realizaram extensa bateria de avaliações morfológicas e fisiológicas com 127 isolados oriundos de diferentes países, objetivando determinar uma chave de testes para auxiliar na identificação laboratorial de isolados pertencentes ao complexo. Desta forma, definiu-se que a capacidade de crescimento a 37 °C em Ágar Batata Dextrose (*Potato Dextrose Agar* - PDA), a produção de conídios sésseis e pigmentados, o diâmetro da colônia formada a 30 °C e o perfil de assimilação de fontes carbonadas por provas auxanográficas seriam capazes de diferenciar as espécies crípticas que compõem o complexo.

Oliveira, M. M. E. et al (2011) relataram, no entanto, discrepância entre as identificações obtidas pela metodologia fenotípica e genotípica. Ao trabalharem com 246 isolados oriundos do estado do Rio de Janeiro, 25 destes não puderam ser identificados de acordo com suas características fenotípicas. Um isolado identificado previamente como *S. mexicana*, posteriormente verificou-se tratar de *S. schenckii*, através de sequenciamento. Tal dificuldade também foi verificada por outros autores (RODRIGUES et al., 2013a; YU et al., 2013; ALMEIDA-PAES et al., 2014; CAMACHO et al., 2015; SANCHOTENE et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016).

2.10.2 Métodos genotípicos de identificação

Embora características distintas sejam apontadas para diferenciação morfofisiológica de isolados pertencentes ao complexo *Sporothrix*, a proximidade destas espécies somada ao grande intervalo para leitura dos resultados torna a identificação fenotípica pouco prática na rotina diagnóstica. Verifica-se ainda discordância entre a identificação alcançada pela soma de características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas quando comparada às análises moleculares (OLIVEIRA, M. M. E. et al., 2011; CAMACHO et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016). Desta forma, o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares que visem a rápida identificação das espécies deste complexo tem grande relevância em laboratórios de micologia, quando se considera as diferenças na suscetibilidade e virulência destas espécies (OLIVEIRA et al., 2014).

A análise de DNA mitocondrial através de enzimas de restrição evidenciou a heterogeneidade entre isolados identificados até então como *S. schenckii* (TAKEDA et al., 1991). Estudos utilizando RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) realizados em exemplares obtidos no México, Colômbia e Guatemala, bem como a análise combinada das sequências obtidas a partir de genes que codificam quitina sintetase, β -tubulina e calmodulina de 60 isolados oriundos de diferentes regiões geográficas demonstraram considerável variabilidade genética correlacionada à origem das cepas (MESA-ARANGO et al., 2002; MARIMON et al., 2006). Diferentes estudos taxonômicos reportaram a perfis heterogêneos de *S. schenckii*, sugerindo que estes não pertenciam a uma mesma espécie. Esta suspeita foi confirmada em estudos posteriores (MARIMON et al., 2007; 2008a). Após a descrição do complexo *Sporothrix*, fez-se necessária a busca por rápidos métodos de identificação em nível de espécie. É preciso cautela para a avaliação de técnicas moleculares específicas para *S. schenckii* descritas antes da atual caracterização do atual complexo de espécies, uma vez que as espécies crípticas eram relacionadas a um grupo homogêneo (ROMEO et al., 2011).

A aplicação de RAPD utilizando três iniciadores distintos foi capaz de diferenciar isolados fúngicos obtidos na epidemia instalada no RJ e um exemplar clínico oriundo dos EUA, sendo ainda capaz de correlacionar as cepas de humanos e felinos contactantes (REIS et al., 2009). A utilização do *primer* universal T3B para execução de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) *fingerprinting* produziu padrões de banda distintos que possibilitaram a identificação de 35 isolados clínicos, incluindo exemplares que foram erroneamente identificados através das técnicas fenotípicas (OLIVEIRA et al., 2012).

Zhou et al. (2014) objetivaram a validação da região ITS (ITS1 + 5.8S + ITS2) do rDNA como marcador de diagnóstico do grupo de relevância clínica de *Sporothrix* spp. Tendo sido recomendado como *barcoding* para identificação fúngica, o mesmo demonstrou que as diferenças polimórficas são suficientes para a diferenciação das quatro espécies de maior relevância clínica do complexo, fato comprovado por outros autores (LIU et al., 2014). Para os estudos taxonômicos envolvendo exemplares de origem ambiental de *Sporothrix*, sugere-se o sequenciamento do gene responsável pela síntese de β -tubulina (DE MEYER et al., 2008).

Ainda assim, a utilização do sequenciamento parcial do gene calmodulina vem sendo amplamente utilizado para diferenciação das espécies pertencentes ao complexo, sendo um *locus* bastante informativo para a realização de estudos filogenéticos (MARIMON et al., 2007; MARIMON et al., 2008a; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; OLIVEIRA, M. M. E. et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013a; RODRIGUES et al., 2013b).

A genotipagem de isolados clínicos a partir da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) deste gene, utilizando a enzima de restrição *HhaI* possibilitou a identificação de 19 isolados clínicos de diferentes regiões geográficas, através da comparação do padrão de bandas obtido. Verificou-se a produção de padrões idênticos para as espécies *S. mexicana* e *S. pallida*, sendo necessária a realização de testes complementares para a diferenciação destes componentes do complexo (RODRIGUES et al., 2014a). Sua aplicabilidade foi também comprovada através de estudos epidemiológicos (SANCHOTENE et al., 2015; BRILHANTE et al., 2016). A utilização de técnicas independentes de sequenciamento possibilita a análise de maior número de amostras em estudos epidemiológicos e fornece dados de forma mais rápida e menos onerosa.

Ainda tendo como base o gene que codifica a proteína calmodulina, Rodrigues et al. (2015) desenvolveram pares de *primer* espécie-específicos capazes de diferenciar, a partir de uma única reação de PCR convencional, as principais espécies de relevância clínica do

complexo: *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida* (Quadro 1). Apresentando elevada sensibilidade, especificidade e robustez, este método alternativo demonstrou-se capaz de identificar as espécies supracitadas a partir de colônias isoladas e modelos de infecção experimental.

Quadro 1 – Primers espécie-específicos desenvolvidos para identificação de exemplares do complexo *Sporothrix schenckii* de relevância clínica

| Espécie-alvo | Primer | Sequência (5´– 3´) | Amplicon |
|--------------------------------|--------|-------------------------------------|----------|
| <i>Sporothrix brasiliensis</i> | Sbra-F | CCC-CCG-TTT-GAC-GCT-TGG-CCC | 469 pb |
| | Sbra-R | CCC-GGA-TAA-CCG-TGT-GTC-ATA-AT | |
| <i>Sporothrix schenckii</i> | Ssch-F | TTT-CGA-ATG-CGT-TCG-GCT-GG | 331 pb |
| | Ssch-R | CTC-CAG-ATC-ACC-GTG-TCA | |
| <i>Sporothrix globosa</i> | Sglo-F | CGC-CTA-GGC-CAG-ATC-ACC-ACT-AAG-CCA | 243 pb |
| | Sglo-R | CCA-ATG-TCT-ACC-CGT-GCT | |
| <i>Sporothrix mexicana</i> | Smex-F | TCT-CTG-CCG-ACA-ATT-CTT-TCT-C | 183 pb |
| | Smex-R | GGA-AAG-CGG-TGG-CTA-GAT-GC | |
| <i>Sporothrix pallida</i> | Spa-F | CGC-TGC-TTT-CCG-CCA-TTT-TCG-C | 363 pb |
| | Spa-R | GCC-ATT-GTT-GTC-GCG-GTC-GAA-G | |

Informações baseadas no trabalho de Rodrigues et al. (2015)

2.11 Diagnóstico

Dados obtidos no decorrer da resenha e obtenção do histórico, referentes ao animal, ao ambiente e tipo de manejo realizado e características lesionais podem, por vezes, auxiliar na formação da linha de raciocínio diagnóstico. Considerando o caráter antropozoonótico desta micose, deve-se questionar acerca de lesões semelhantes em contactantes humanos e animais (LARSSON, 2011). Os sinais clínicos apresentados por cães e gatos são inespecíficos e, de modo geral, a utilização de exames complementares para confirmar a suspeita é fundamental (SCHUBACH et al., 2012).

Faz-se necessário realizar o diagnóstico diferencial de outras enfermidades, tais como pioderma bacteriano, feohifomicose, micobacteriose, nocardiose, actinomicose, criptococose, dermatoses eosinofílicas, histoplasmose cutânea, corpo estranho, neoplasias, doenças imunomediadas, quadros alérgicos severos e leishmaniose (MALIK et al., 2004; LARSON, 2011).

2.11.1 Coleta de amostras

As amostras devem ser coletadas de acordo com as condições clínicas e características lesionais. *Swabs* podem ser utilizados para a coleta de amostras oriundas da cavidade nasal, lesões exudativas e material purulento ou seropurulento obtido a partir da aspiração de abscessos não ulcerados. Tais amostras devem ser acondicionadas em meio de transporte, quando possível, e armazenadas sob refrigeração para processamento posterior. Fragmentos teciduais obtidos a partir de biópsia também devem ser coletados e armazenados em formol a 10% ou solução salina estéril, de acordo com a avaliação a ser solicitada (SCHUBACH et al., 2012). Em casos disseminados outras amostras podem ser coletadas, tais como urina, sangue, líquido cefalorraquidiano e sinovial, dependendo do órgão acometido (BARROS et al., 2011).

2.11.2 Exame direto

Considerando a característica dimórfica do agente, devemos buscar no exame direto a fase unicelular do *Sporothrix* spp. Tal avaliação microscópica pode ser realizada em esfregaços submetidos a colorações usualmente utilizadas na rotina laboratorial, como Gram, Giemsa, Panótico e Fucsina simples (CRUZ, 2013). Citologias sugestivas permitirão a visualização de leveduras pequenas com morfologia oval a alongada (5 µm x 5 µm a 5 µm x 9 µm). Podem ser observadas no interior de macrófagos e neutrófilos ou extracelularmente (BARROS et al., 2011). Em decorrência de sua parede celular, pode ocorrer retração do citoplasma, gerando a falsa impressão de cápsula ao redor da célula. Sendo assim, é preciso cuidado para não confundi-lo com *Histoplasma capsulatum* ou *Cryptococcus neoformans* (SILVA et al., 2015).

Ressalta-se a escassez de estruturas leveduriformes em amostras oriundas de cães e equinos, bem como em humanos (LARSSON, 2011). Em felinos verifica-se maior carga de leveduras nas amostras encaminhadas (Figura 8). Estudos prévios demonstraram a elevada sensibilidade do exame direto para felinos acometidos, chegando a 84,9% (PEREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2015).

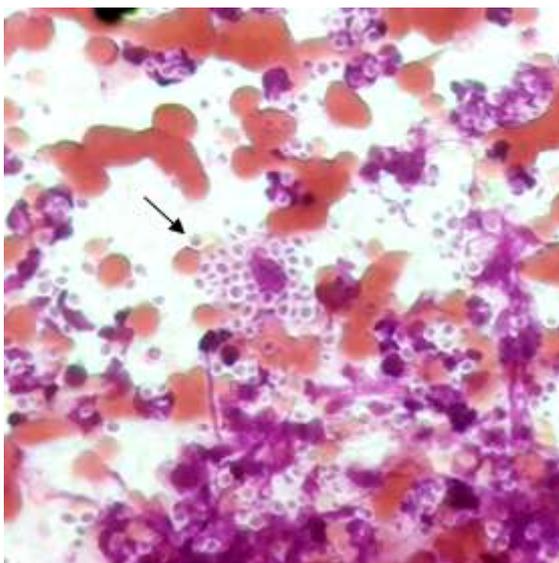


Figura 8 – Avaliação citológica de paciente felino evidenciando grande quantidade de estruturas leveduriformes fusiformes a ovaladas com halo mais claro ao redor da célula (seta) no interior de macrófagos e em meio extracelular (Panótico – 1000x)

Embora a observação de estruturas fúngicas compatíveis possa sugerir um diagnóstico de esporotricose, o isolamento e a identificação do agente é indispensável (CRUZ, 2013).

2.11.3 Isolamento fúngico

Considera-se como método definitivo de diagnóstico para esporotricose o isolamento e identificação do agente em cultura (OLIVEIRA et al., 2014). A obtenção de isolado em sua forma filamentosa ocorre após semeadura do espécime clínico em Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e/ou Ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida. Verifica-se crescimento fúngico após 5 a 7 dias de incubação, em temperatura entre 25 °C e 30 °C. A confirmação da identificação dependerá das características macromorfológicas e

micromorfológicas, bem como a verificação do termodimorfismo. Para tal, deve-se realizar a semeadura do isolado em Ágar Sangue de Carneiro 5% ou BHIA, incubados a 37 °C. Em certos casos, faz-se necessária a realização de diversas subculturas até a verificação da forma unicelular (CRUZ, 2013).

2.11.4 Histopatologia

A avaliação de fragmentos teciduais para pesquisa de estruturas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix* spp. pode ser realizada utilizando colorações de rotina, como hematoxilina e eosina (H&E). Esta coloração, no entanto, é inespecífica e pode evidenciar outros agentes fúngicos e protozoários (MIRANDA et al., 2009). Outras colorações especiais como a Prata-Metenamina de Grocott-Gomori (GMS) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), podem ser utilizadas para aprimorar a detecção de estruturas fúngicas (MIRANDA et al., 2013; BAZZI et al., 2016).

As células compatíveis com membros do complexo *S. schenckii* apresentam morfologia oval a alongada, com mensuração variável entre 4 µm a 6 µm, podendo apresentar brotamentos únicos (SCHUBACH et al., 2012). Assim como observado em exames diretos, a presença de leveduras de *Sporothrix* é de difícil visualização em humanos e em outras espécies animais, como o cão (BARROS et al., 2011). Em 86 casos de esporotricose canina foi demonstrado a presença de leveduras por histopatologia em apenas 36 deles, indicando a necessidade de encaminhamento para cultivo de todo material suspeito, independentemente do resultado da histopatologia (MIRANDA et al., 2009). Em felinos o número de micro-organismos é usualmente elevado, tendo sido detectadas em 62% das avaliações histológicas (SCHUBACH et al., 2004). Entretanto, ao utilizar colorações mais específicas, como GMS, este valor pode chegar a 94% (MIRANDA et al., 2013).

Histologicamente a lesão cutânea na esporotricose canina e felina é caracterizada como ulcerativa, normalmente apresentando intensa reação inflamatória piogranulomatosa na derme, podendo acometer o pânículo adiposo e a musculatura esquelética subjacente. Estruturas leveduriformes podem ser vistas no interior de macrófagos e neutrófilos e extracelularmente em exsudatos purulentos ou regiões inflamadas (SCHUBACH et al., 2012). O caráter sistêmico da micose em felinos é evidenciado pela visualização de infiltrado inflamatório e estruturas leveduriformes em avaliações histológicas de pulmão, fígado, baço, olhos, rins, glândulas adrenais e linfonodos (SCHUBACH et al., 2003).

2.11.5 Detecção molecular

Nos últimos anos, técnicas moleculares vêm sendo aprimoradas para aplicação na rotina diagnóstica. A utilização de PCR é baseada na amplificação e sequenciamento de genes fúngicos, sendo uma ferramenta rápida e eficaz para o diagnóstico de diferentes micoses. Apresenta destaque para culturas falso-negativas de esporotricose que ocorrem em virtude de elevada contaminação ou baixa carga fúngica na amostra encaminhada (RODRIGUES et al., 2015).

Sandhu et al. (1995) desenvolveram *primers* universais e espécie específicos tendo como alvo o gene 28S rRNA, a partir do sequenciamento de espécies de interesse clínico e de origem ambiental, demonstrando elevado grau de especificidade. Dentre as espécies listadas, encontra-se *S. schenckii*, anterior a descrição do atual complexo.

O desenvolvimento de *primers* baseados no gene quitina-sintetase 1 (CHS1) de *S. schenckii* foi aplicado para o diagnóstico de esporotricose humana a partir de amostras

cutâneas. Verificou-se que a aplicação destes iniciadores posteriormente à extração de DNA apresentou resultados positivos, com fragmentos de aproximadamente 320 pb nos seis casos testados. Destaca-se a elevada especificidade da técnica e a possibilidade de se alcançar o diagnóstico em 24 horas (KANO et al., 2003). Posteriormente a aplicação destes *primers* também foi comprovada para o diagnóstico da esporotricose felina (KANO et al., 2005). Outra metodologia tendo como alvo o gene 18S do rRNA em uma reação de *nested* PCR demonstrou sensibilidade e especificidade satisfatórios, sendo capazes de detectar até mesmo 1 UFC em amostras teciduais (HU et al., 2003). Contudo, não se considerava, naquele momento, a existência de um complexo de espécies estreitamente relacionadas.

A aplicação de técnicas moleculares ainda é pouco utilizada na rotina clínica, sendo mais aplicada para pesquisas (SCHUBACH et al., 2012). Avaliação citológica, histopatológica e isolamento fúngico são ainda os métodos diagnósticos mais disponíveis em laboratórios de auxílio diagnóstico. Destaca-se, ainda, que a cultura fúngica continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico da esporotricose. A associação com informações fisiológicas e moleculares possibilitam a diferenciação das espécies crípticas e fornecem maiores informações acerca dos exemplares fúngicos obtidos (OLIVEIRA, et al., 2014). O recente desenvolvimento de pares de *primer* espécie-específicos (Quadro 1) teve sua aplicabilidade comprovada para rotina diagnóstica, sendo capaz de caracterizar corretamente componentes do complexo *Sporothrix* a partir de culturas fúngicas e espécimes clínicos. Baseada em apenas uma reação de PCR e independente de cultivo esta alternativa rápida, barata e confiável de diagnóstico possivelmente proporcionará a popularização dos métodos moleculares de diagnóstico para esporotricose, em um futuro próximo (RODRIGUES et al., 2015).

2.12 Tratamento

2.12.1 Iodeto de potássio

Tradicionalmente, a utilização de iodeto de potássio para o tratamento da esporotricose humana e animal vem sendo realizada desde o princípio do século XX (STERLING & HEYMANN, 2000). Contudo, a literatura fornece dados controversos em relação ao tratamento de esporotricose felina. Não há consenso em relação ao resultado desta terapêutica, sendo recomendada por alguns autores e fortemente rejeitada por outros (LARSSON, 2011; CRUZ, 2013). Todavia, o perfil socioeconômico dos tutores responsáveis pelo tratamento dos pacientes felinos, somado ao longo período de tratamento faz com que a busca por fármacos menos onerosos seja especialmente interessante nestes casos (SILVA et al., 2012; CHAVES et al., 2013). Comprovou-se ainda, ao implementar doses reduzidas do medicamento na rotina clínica humana, que não houve diminuição na eficácia do tratamento (MACEDO et al., 2014). Tal redução na dosagem na medicina felina poderia resultar também na diminuição de efeitos adversos. Reis et al. (2012) evidenciaram que a administração de cápsulas de iodeto de potássio em concentração média inferior a recomendada na literatura, passando de 20 para 15 mg/kg, alcançou taxas de cura similares as obtidas em estudos prévios. Demonstra-se, assim, a capacidade de manejo da dose implementada a fim de reduzir os efeitos adversos comumente observados.

O exato mecanismo de ação deste sal é ainda hoje desconhecido. Alguns acreditam que a remissão das lesões está relacionada ao aumento da proteólise e consequente resolução dos granulomas. Outros, no entanto, acreditam que o estímulo à atividade fagocítica de células do sistema imune resulte na melhora clínica do paciente (BARROS et al., 2011). Atualmente a associação de itraconazol e iodeto de potássio vem despontando como uma

alternativa promissora para o tratamento da esporotricose felina. Ao avaliar a efetividade desta associação em 30 felinos acometidos pela enfermidade no estado do RJ, Reis et al. (2016) verificaram taxa de cura de 96,15% com duração média de tratamento de 14 semanas.

2.12.2 Anfotericina B

Apresentando amplo espectro de atividade, este fármaco é considerado por muitos a primeira escolha para o tratamento empírico de infecções fúngicas sistêmicas. Entretanto, a frequente ocorrência de efeitos adversos devido à administração intravenosa, somada a nefrotoxicidade deste fármaco, pode limitar sua utilização na rotina clínica. Formulações lipídicas alternativas (dispersão coloidal, complexo lipídico, preparação lipossomal unilamelar) têm sido introduzidas com o objetivo de reduzir fatores indesejáveis das formulações convencionais em desoxicolato como excipiente (HAMILL, 2013).

A anfotericina B é um macrolídeo poliênico que atua ligando-se ao ergosterol, principal componente da membrana fúngica, resultando na formação de poros, os quais promovem rápido efluxo de K^+ , inibição da glicólise e subsequente efluxo de Mg^{2+} . Estas perdas somadas ao influxo de prótons na célula fúngica, causa acidificação intracelular e precipitação citoplasmática, exercendo sua ação fungicida (HAMMIL, 2013). Os poliênicos apresentam ainda a capacidade de se ligar em menor quantidade a outros esteróis, como o colesterol. Fator relacionado a grande parte dos seus efeitos adversos (GROLL & KOLVE et al., 2004).

Resistência a anfotericina B parece estar diretamente ligada a alterações qualitativas e quantitativas no ergosterol presente na membrana fúngica (GROLL & KOLVE et al., 2004). Entretanto, cepas resistentes já foram detectadas sem apresentarem alterações na quantidade de ergosterol presente na membrana, sugerindo que outros mecanismos podem estar associados à resistência aos antifúngicos poliênicos (VANDEN BOSSCHE et al., 2003).

Sendo o tratamento de escolha para pacientes humanos nos casos graves e prognósticos reservados de esporotricose, este antifúngico é indicado, na medicina humana, onde há envolvimento osteoarticular, pulmonar, do sistema nervoso central e quando disseminada (KAUFFMAN et al., 2007). Na medicina veterinária, demonstrou-se boa resposta a aplicação intra-lesional de anfotericina B associada à administração oral de itraconazol em paciente felino com lesão nodular remanescente em plano nasal após 9 meses de monoterapia com itraconazol (GREMIÃO et al., 2009).

2.12.3 Cetoconazol

Agentes antifúngicos azólicos atuam na inibição da síntese de ergosterol, principal componente da membrana plasmática de fungos, inibindo a ação da enzima P450DM. Quando o fungo é exposto à concentração adequada desta classe de fármacos, sofre alterações estruturais e funcionais em virtude da inibição enzimática (SHEENAN et al., 1999).

Antifúngicos azólicos tornaram-se os mais recomendados para o tratamento da esporotricose, sendo o cetoconazol o primeiro agente desta classe farmacológica a ser usado no tratamento desta micose de implantação. Entretanto, sua efetividade não satisfatória, somada a diversos fatores adversos associados, fez com que ele não seja mais recomendado para o tratamento da enfermidade em humanos (KAUFFMAN et al., 2007). Pereira et al. (2010) avaliaram a segurança e efetividade do cetoconazol no tratamento de esporotricose felina em 773 animais, com a administração de cetoconazol e itraconazol. A administração de

cetoconazol (13,5 a 27 mg/kg) apresentou menor efetividade e maior quantidade de efeitos colaterais quando comparado ao itraconazol (8,3 a 27,7 mg/kg).

Considerando as particularidades da esporotricose canina, a implementação de cetoconazol apresenta maior efetividade, quando comparada ao tratamento de pacientes felinos. Desta forma, este é ainda considerando uma importante alternativa terapêutica para estes casos (SCHUBACH et al., 2006; CROTHERS et al., 2009).

2.12.4 Itraconazol

No decorrer das décadas de 1980 e 1990, com o considerável aumento de indivíduos imunossuprimidos em decorrência da disseminação do vírus da imunodeficiência humana (HIV), bem como o acréscimo de indivíduos transplantados, tratamentos quimioterápicos e outras condições imunossupressoras, as infecções fúngicas ganharam maior relevância, devido ao seu caráter oportunista. Tornou-se necessário, então, o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas, resultando no advento de novos medicamentos como fluconazol e itraconazol (BARTROLI, et al. 1995; SHEEHAN, et al., 1999).

Itraconazol é um triazólico de primeira geração com atividade antifúngica. Seu mecanismo de ação é similar ao descrito para os imidazólicos como o cetoconazol (WILLEMS et al., 2001; PEYTON et al., 2015). Indicado para o tratamento de diversas infecções fúngicas sistêmicas como a histoplasmose, blastomicose e meningite criptocócica, este fármaco é, atualmente, a primeira escolha no tratamento da esporotricose em suas mais diferentes manifestações clínicas (KAUFFMAN et al., 2007; LASS-FLORL, 2011). Devido a suas características lipofílicas, verifica-se maior concentração em órgãos como rins, pulmão, e sistema osteoarticular, bem como na pele, chegando a concentrações duas a três vezes superior à presente no plasma sanguíneo (WILLEMS et al., 2001).

Verifica-se maior disponibilidade do medicamento em apresentações orais, na forma de cápsulas. A absorção desta substância após a sua administração oral apresenta variabilidade, dependendo do pH gástrico. Assim sendo, a administração pós-prandial torna-se especialmente interessante (PEYTON et al., 2015). A meia-vida deste antifúngico dura de 20-24 h, com eliminação de metabólitos através da urina e bile (WILLEMS et al., 2001).

Os principais efeitos adversos observados com a administração de itraconazol estão relacionados à sua toxicidade gastrointestinal e hepática. Entretanto, devido à sua maior afinidade e seletividade às enzimas citocromo P450 a ocorrência destes efeitos indesejáveis é menos observada (PEREIRA et al., 2010).

2.12.5 Terbinafina

Terbinafina é uma alilamina com conhecido potencial para o tratamento de micoses superficiais, como dermatofitoses e onicomicoses. Contudo as aplicações terapêuticas podem ser mais abrangentes do que sua atual utilização (CHAPMAN et al., 2004). Com apresentações orais e tópicas, este antifúngico atua inibindo a biossíntese de ergosterol através da enzima squaleno-epoxidase. Como resultado, efeito fungicida e fungistático são esperados na célula fúngica (DARKER et al., 2003).

Sendo utilizado no tratamento de pacientes humanos que, em virtude da impossibilidade de utilização de itraconazol, foram submetidos a outras alternativas terapêuticas, a terbinafina apresentou elevada efetividade na concentração de 250 mg/dia (FRANCESCONI et al., 2009). Estudo comparativo da resposta terapêutica a esporotricose

cutânea, utilizando itraconazol e terbinafina, evidenciaram à similaridade de resultados com a implementação destes dois fármacos (FRANCESCONI et al., 2011). Na medicina veterinária ainda não foram realizados estudos clínicos que avaliar a eficácia e segurança da terbinafina no tratamento da esporotricose felina ainda não foram realizados (REIS et al., 2016).

Diversos estudos de suscetibilidade *in vitro* demonstraram a baixa concentração necessária para inibir o desenvolvimento de isolados clínicos do complexo *S. schenckii* (MEINERZ et al., 2007, MARIMON et al., 2008a; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; BORBA-SANTOS et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016). Entretanto, deve-se ressaltar que outros aspectos farmacocinéticos e farmacodinâmicos interferem diretamente na eficácia da terapêutica implementada (ANDES et al., 2006).

2.12.6 Voriconazol

Aprovado para utilização desde 2002, o voriconazol é um triazol de segunda geração recomendado para o tratamento de diversas enfermidades sistêmicas ocasionadas por agentes como *Aspergillus* spp., *Scedosporium apiospermum*, *Candida* spp. e *Fusarium* spp. Como outros azólicos, este fármaco promove anormalidades na parede celular como resultado da diminuição da síntese de ergosterol (GREER, 2003).

Apresenta meia-vida mais curta, de aproximadamente 6 horas, o que torna necessário a administração de múltiplas doses diariamente (GREER, 2003). Estas devem ser realizadas preferencialmente em jejum, uma vez que a presença de alimentos reduz consideravelmente a biodisponibilidade do agente antifúngico. Encontra-se disponível no mercado em apresentações orais e injetáveis. Efeitos adversos são pouco observados na medicina humana e geralmente bem tolerados, podendo afetar principalmente a visão e o sistema cutâneo (PEYTON et al., 2015). Estudos prévios indicaram sua baixa eficácia *in vitro* frente a exemplares pertencentes ao complexo *S. schenckii* (OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; MAHMOUDI et al., 2016). Assim sendo, até o presente momento não existem recomendações quanto ao uso de voriconazol para o tratamento de qualquer manifestação clínica da esporotricose (KAUFFMAN et al., 2007).

2.12.7 Demais modalidades de tratamento

Em alguns casos verifica-se irresponsividade à administração de agentes antifúngicos. Nestes casos, outras modalidades terapêuticas devem ser aplicadas (PEREIRA et al., 2009).

O tratamento cirúrgico combinado a fármacos antifúngicos pode apresentar função curativa, considerando locais fisiologicamente e anatomicamente operáveis. Gremião et al. (2006) demonstraram a resolução clínica de esporotricose em felino macho com a exérese da bolsa escrotal após recidiva e irresponsividade ao tratamento exclusivo de itraconazol. Tal ocorrência também foi relatada no tratamento de esporotricose em felino, no Japão, com a administração de itraconazol posterior ao procedimento cirúrgico (HIRANO et al., 2006).

Em pacientes humanos que apresentem intolerância aos fármacos usualmente utilizados ou encontram-se em período gestacional, a termoterapia local é uma alternativa. A impossibilidade de desenvolvimento de fungos do complexo *Sporothrix* em temperaturas acima de 40 °C justifica a ação terapêutica do calor sobre as lesões (MARIMON et al., 2007). Entretanto, algumas restrições para aplicabilidade na rotina veterinária felina são verificadas, uma vez que esta modalidade terapêutica é indicada apenas para quadros cutâneos localizados e a colaboração do paciente torna-se indispensável (HONSE et al., 2010; PEREIRA et al., 2009).

A utilização associada de criocirurgia e terapêutica antifúngica consiste em outra alternativa de tratamento para esporotricose felina. A técnica baseia-se no congelamento de tecidos biológicos, resultando em sua inviabilidade. Apresenta indicação em quadros neoplásicos, inflamatórios e degenerativos. A avaliação desta associação em 13 felinos acometidos com esporotricose cutânea, sem sinais sistêmicos, evidenciou a cura clínica em 11 dos animais, reduzindo a duração de tratamento, quando comparado a protocolos convencionais (SOUZA et al., 2015).

2.12.8 Suscetibilidade a agentes antifúngicos

O estabelecimento de métodos *in vitro* para determinação da suscetibilidade do agente infeccioso a fármacos antifúngicos é de extrema importância para a detecção de microorganismos resistentes e a otimização de protocolos antimicrobianos (GROLL & KOLVE, 2004). Desta forma, métodos laboratoriais vêm sendo padronizados, com o objetivo de facilitar a interpretação dos resultados alcançados e permitir a comparação de resultados interlaboratoriais. Adaptações diretas de protocolos direcionados para fungos unicelulares foram desenvolvidas para análise de fungos filamentosos e, após diversos ajustes, foi disponibilizado o documento M38-A2 que descreve a metodologia para determinação da suscetibilidade através da microdiluição (CLSI, 2008). Diversos fungos de interesse clínico são englobados neste manual, como por exemplo *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus oryzae*, fungos dermatófitos e *S. schenckii sensu lato*.

Um dos fatores que ressaltou a possibilidade de múltiplas espécies estarem relacionadas aos quadros de esporotricose verificados, foi a ampla variedade de perfis de suscetibilidade obtidos (MCGINNIS et al., 2001; TRILLES et al., 2005). Com a descrição do atual complexo *S. schenckii*, a necessidade de identificação dos isolados, sua origem geográfica e a determinação dos seus respectivos perfis de suscetibilidade tornam-se ainda mais relevantes (MARIMON et al., 2007; MAHMOUDI et al., 2016).

Oliveira, D. C. et al. (2011) avaliaram o perfil de suscetibilidade antifúngica de 40 isolados previamente identificados como *S. schenckii* obtidos de pacientes humanos (n = 31) e animais (n = 9) oriundos do Rio Grande do Sul. Destacam-se em seus resultados a identificação de *S. luriei* e *S. pallida*, oriundos de animais, resistentes aos azóis. Em outro estudo utilizando 12 isolados, onde foi avaliada a sensibilidade à terbinafina e ao itraconazol, verificou-se que isolados oriundos de animais apresentaram Concentração Inibitória Mínima (CIM) de itraconazol superior ao verificado em isolados humanos (MEINERZ et al., 2007). Desta forma, a determinação da CIM em isolados clínicos oriundos de animais torna-se especialmente interessante para estudos epidemiológicos envolvendo o complexo *S. schenckii*.

A avaliação associada de diversidade genética e perfis de suscetibilidade antifúngica de 68 isolados das espécies *S. schenckii* (n = 39), *S. brasiliensis* (n = 22), *S. globosa* (n = 4), *S. mexicana* (n = 3) demonstrou amplo espectro de atividade dos triazólicos (itraconazol, voriconazol e posaconazol). Destacou-se ainda a ausência de inibição *in vitro* frente a 5-fluorocitocina, caspofungina, voriconazol e fluconazol. Novamente, detectou-se a presença de isolados multirresistentes pertencentes ao complexo *Sporothrix*, destacando a importância de continua avaliação *in vitro*, para melhor seleção de fármacos na rotina clínica (RODRIGUES et al., 2014b). A verificação de perfis de suscetibilidade similares ocorre também ao considerarmos 48 exemplares veterinários de *Sporothrix brasiliensis* avaliados por Brilhante et al. (2015). Em tal levantamento destacou-se a efetividade de inibição *in vitro* de itraconazol, anfotericina B e cetoconazol.

Entretanto, a sensibilidade *in vitro* pode não prever o sucesso terapêutico, assim como a resistência *in vitro* não está sempre correlacionada a falha terapêutica. Diversos fatores ligados ao hospedeiro, bem como o sítio infeccioso e o agente etiológico, podem interferir diretamente na resposta clínica verificada (REX et al., 2003; VANDEN BOSSCHE et al., 2003). Verifica-se, por exemplo, maior complexidade no tratamento da esporotricose felina em pacientes que apresentem lesões em plano nasal. Através de avaliações histopatológicas, comprovou-se a presença de leveduras em locais como a medula óssea, o que poderia dificultar a ação de fármacos antifúngicos (GREMIÃO et al., 2015). Outro estudo, utilizando cepas obtidas de pacientes com esporotricose refratária ao tratamento também demonstrou baixa compatibilidade entre os perfis de suscetibilidade determinados pelo protocolo M38-A2 e as respostas terapêuticas observadas (ALMEIDA-PAES et al., 2016). Ressalta-se ainda que diferentes metodologias de determinação do perfil de suscetibilidade podem gerar resultados distintos. Han et al. (2017, em estudo comparativo avaliando a correlação de resultados obtidos entre o protocolo M38-A2 e E-test, demonstraram baixa correlação entre os resultados obtidos, destacando a necessidade de cautela ao selecionar a metodologia de análise (HAN et al., 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Comissão de Ética

O presente estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRRJ) em reunião ordinária sob o número de protocolo 135/2014 (ANEXO A).

3.2 Origem dos Exemplos Fúngicos

As amostras utilizadas nesta pesquisa foram obtidas a partir da rotina do Diagnóstico Microbiológico Veterinário da UFRRJ, no intervalo entre janeiro de 2012 e maio de 2015, englobando predominantemente espécimes clínicos oriundos da rotina do Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVA) da UFRRJ, mas também de encaminhamentos externos.

O recebimento da amostra e análise quanto à adequação do acondicionamento, bem como o preenchimento dos dados relacionados no livro de registro de amostras micológicas foi de responsabilidade do médico veterinário residente. Após esta fase pré-analítica, amostras suspeitas de esporotricose foram semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose (*Sabouraud Dextrose Agar* – SDA) (Merck, Darmstadt, HE, Alemanha) acrescido de cloranfenicol e Ágar Mycosel (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, EUA), com incubação a 30 °C durante 30 dias e acompanhamento diário do desenvolvimento fúngico. Colônias com macromorfologia compatível eram submetidas à análise microscópica através da confecção de lâminas com lactofenol azul de algodão em aumento de 400x e posterior confirmação do termodimorfismo com incubação em BHIA acrescido de cloranfenicol (HIMEDIA, Mumbai, MH, Índia) a 37 °C durante 7 dias (BARROS et al., 2011), onde a visualização de estruturas leveduriformes era feita em microscópio óptico após coloração de esfregaços com fucsina sob o aumento de 1000x.

3.3 Purificação dos Isolados

Com a confirmação do envolvimento de membros do complexo *Sporothrix schenckii*, estes foram submetidos a procedimentos de purificação, objetivando a eliminação de possíveis interferentes nos testes a serem realizados posteriormente.

Os isolados em sua forma filamentosa eram transferidos para Caldo Infuso de Cérebro e Coração (*Brain and Heart Infusion* - BHI) (Prodimol Biotecnologia S/A, MG, Brasil) acrescido de cloranfenicol, com incubação a 37 °C por 7 dias e homogeneização diária. Posteriormente, 10 µL deste caldo eram recuperados com auxílio de alça descartável e semeados por esgotamento em BHIA acrescido de cloranfenicol e sangue de carneiro 5%, sendo novamente mantidos a 37 °C por 5 dias. A transferência de colônias isoladas do fungo em sua forma unicelular para novo tubo contendo SDA foi realizado em duplicata. Um exemplar foi mantido sob refrigeração, para utilização nos testes posteriores, e outro foi acrescido de óleo mineral estéril, com manutenção em temperatura ambiente para composição de coleção e recuperação, caso necessário.

3.4 Identificação Fenotípica

A identificação fenotípica foi alcançada através da análise de características fisiológicas, bioquímicas e morfológicas destacadas por Marimon et al. (2007). Conforme preconizado por estes autores, tais atributos demonstraram utilidade na diferenciação entre espécies do complexo (Quadro 2).

Quadro 2 – Características fenotípicas selecionadas para diferenciação de exemplares clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* em nível de espécie

| Espécie | Conídios sésseis pigmentados | Colônia >50 mm a 30 °C por 21 dias | Crescimento a 37 °C | Prova de Assimilação | |
|------------------------|------------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------|----------|
| | | | | Sacarose | Rafinose |
| <i>S. brasiliensis</i> | + | - | + | - | - |
| <i>S. globosa</i> | + | - | - | + | - |
| <i>S. luriei</i> | - | - | + | - | - |
| <i>S. mexicana</i> | + | + | + | + | + |
| <i>S. pallida</i> | - | + | + | + | - |
| <i>S. schenckii</i> | + | - | + | + | + |

Informações baseadas nos trabalhos: Marimon et al. (2007, 2008a)

Utilizou-se como controle de qualidade dos testes de identificação fenotípica exemplares de *S. brasiliensis* (INCQS 40360), *S. globosa* (CBS 120340), *S. luriei* (CBS 937.72), *S. mexicana* (CBS 120341), *S. pallida* (CBS 302.73) e *S. schenckii* (INCQS 40255).

As identificações fenotípicas foram realizadas no Laboratório de Leveduras Patogênicas e Ambientais (LLPA) – UFRRJ.

3.4.1 Diâmetros de colônias

A capacidade de desenvolvimento do micro-organismo em diferentes temperaturas é uma das características fisiológicas determinadas para o alcance da identificação fenotípica de membros do complexo *Sporothrix schenckii*. Para estas avaliações, isolados recentemente reativados foram semeados em PDA (HIMEDIA, Mumbai, MH, India) com incubação a 30 °C e 37 °C. Considerando a importância de padronização das colônias a serem mensuradas, o fragmento semeado foi de aproximadamente 1 mm de diâmetro e a verificação do diâmetro resultante foi mensurado após 14 e 21 dias de incubação com auxílio de régua (MARIMON et al., 2007). Os dados obtidos foram tabulados em planilhas para posterior análise.

3.4.2 Produção de conídios sésseis pigmentados

O desenvolvimento de melanina em conídios sésseis foi verificado com a confecção de cultivos em lâmina. Tais conídios são caracterizados por seu desenvolvimento ao longo da hifa vegetativa, de forma individual ou pareada, sem a presença de conidióforos (MARIMON et al., 2007).

Os kits contendo placa de Petri estéril, suporte, lâmina de vidro e algodão umedecido com água destilada foram antecipadamente esterilizados por autoclavagem. Em seguida, fragmentos de *Corn Meal Agar* (CMA) (Anexo B) foram posicionados sobre a lâmina de vidro e repiques dos isolados a serem avaliados foram realizados na superfície do meio de cultura. Finalizou-se a preparação com o acréscimo de lamínula de vidro previamente flambada sobre o local de semeadura. Após 10 dias de incubação a 30 °C, lâminas para visualização em microscopia óptica em aumento de 400x foram confeccionadas, utilizando ácido láctico (MARIMON et al., 2007).

3.4.3 Provas de assimilação de fontes carbonadas

A determinação da capacidade assimilativa dos exemplares trabalhados frente à sacarose e rafinose foi realizada em meio líquido isento de fontes carbonadas. Utilizando placas de 96 poços estéreis, acrescentou-se 150 µL de *Yeast Nitrogen Base* (YNB) (HIMEDIA, Mumbai, MH, Índia) contendo 0,5% do açúcar a ser avaliado em cada poço. Além da sacarose e rafinose, utilizou-se glicose como controle positivo e meio isento de qualquer fonte de carbono como controle negativo (KURTZMAN et al., 2011).

Para a preparação do inóculo, realizou-se repique do isolado em SDA em tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85%). Com auxílio de alças descartáveis, promoveu-se o desprendimento de conídios com posterior recuperação da suspensão resultante e acondicionamento em novo tubo de ensaio. Nesta etapa, extremo cuidado foi tomado para que não houvesse fragmentação do SDA utilizado para o desenvolvimento da colônia inicial. Ajustou-se a concentração da suspensão de acordo com a escala 1 de McFarland. A seguir, objetivando a remoção de qualquer traço de fonte carbonada da suspensão, realizou-se a centrifugação de 1,5 mL em microcentrifuga (Centrifuge 5418 – Eppendorf) a 8.500 rcf por 2 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão em 1,5 mL de solução salina estéril. Adicionou-se então 50 µL da suspensão resultante em cada poço. A placa foi então incubada a 30 °C com leitura após 5 e 7 dias de desenvolvimento. Resultados positivos foram destacados pela evidenciação de crescimento fúngico na presença da fonte de carbono testada.

3.5 Identificação Genotípica

A implementação de técnicas moleculares torna-se especialmente interessante para diagnóstica ao permitir a rápida diferenciação de espécies crípticas. No caso do complexo *Sporothrix schenckii* será particularmente valiosa por haver grande intervalo para leitura dos resultados de testes fenotípicos

As identificações moleculares foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, pertencente ao Departamento de Parasitologia Animal do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

3.5.1 Extração de ácidos nucléicos

A extração de ácidos nucléicos foi realizada a partir de uma colônia do fungo em sua fase micelial com cinco dias de desenvolvimento a 30 °C. Com auxílio de palitos de madeira previamente esterilizados, realizou-se a transferência de um fragmento da colônia para microtubos com capacidade de 1,5 mL, contendo 600 µL de EDTA (etilenodiaminotetracético) 50 mM e, após centrifugação a 8.500g durante 15 min, descartou-

se o sobrenadante objetivando a lavagem do fragmento fúngico. Realizou-se então sua ressuspensão em 200 µL de EDTA 50 mM acrescido de 30 µL de Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* 60 mg/mL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) com posterior incubação a 37 °C durante 2 h, com homogeneizações em Vortex (Vortex Basic – KASVI) a cada 20 min. Através da ação das enzimas protease e quitinase, promoveu-se desta forma a fragilização da parede celular, facilitando a lise celular e extração de ácidos nucléicos em etapas posteriores.

Findada a fase de fragilização da parede celular, realizou-se centrifugação a 8.500g por 10 min descartando-se o sobrenadante. Acrescentou-se a seguir, 200 µL de PBS Buffer (Tampão fosfato-salino) e o fragmento de colônia fúngica foi submetido a lise mecânica durante 1 min, com auxílio de homogeneizador (Mini-BeadBeater-16 – BioSpec) e posterior adição de 250 µL da solução de extração (200 mM TrisHCl pH 8,0; 25 mM EDTA pH 8,0; SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) 1%; 25 mM NaCl; Proteinase K 55 mg/mL) com nova incubação a 56 °C durante 1 h.

Após a lise, o DNA foi extraído por sucessivas etapas com fenol (pH 7,4-7,8) e fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1). Houve ainda precipitação com auxílio de isopropanol e lavagem com etanol 70%, sendo ressuspenso em 100 µL de tampão TE.

A quantificação do DNA extraído foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (KASVI, Malásia) com estimativa da concentração de DNA feita pela comparação de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega, Madison, WI, EUA) nas concentrações de 25 e 50 ng.

3.5.2 Amplificação do gene da calmodulina (CAL)

Para amplificação por PCR do gene CAL foram utilizados os *primers* degenerados CL1 e CL2A (Quadro 3) que geram *amplicons* com aproximadamente 850 pb correspondendo a região do *exon* 3 ao *exon* 5 (O'DONNELL et al., 2000).

Quadro 3 – *Primers* empregados para amplificação do gene que codifica calmodulina

| Gene alvo | Primer | Sequência (5' – 3') |
|-------------------|--------|-----------------------------|
| Calmodulina (CAL) | CL1 | GAR-TWC-AAG-GAG-GCC-TTC-TC |
| | CL2A | TTT-TTG-CAT-CAT-GAG-TTG-GAC |

Informações baseadas no trabalho de O'Donnell et al. (2000)

Para as reações de PCR foram utilizados 0,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen™ Platinum™ *Taq* DNA Polymerase – 5 U/µL), 1X tampão de reação (10X PCR Rxn Buffer – MgCl₂), 3,0 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dNTP Set – Thermo Fisher Scientific), 0,5 µM de cada *primer* (Invitrogen), 1% de soro albumina bovina (bovine serum albumin 55mg/mL – Invitrogen) e 1 µL do DNA previamente extraído, em um volume final de 18,5 µL.

As ampliações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial (94 °C / 5 min), 40 ciclos de desnaturação (94 °C/20 seg), anelamento (57 °C/15 seg) e extensão (72 °C/25 seg) e extensão final (72 °C/5 min). As reações foram executadas em termociclador (T100 - Thermal Cycler – BIO-RAD) e reveladas em brometo de etídio com visualização em transiluminador (Transiluminador UV Para Gel LTB STi – Loccus). A captura de imagens foi realizada através do software L-Pix Image.

3.5.3 Digestão enzimática

Para diferenciação de espécies dentro do complexo *Sporothrix schenckii* os produtos de PCR foram clivados com a enzima *HhaI*. Avaliações *in silico* e *in vitro* confirmaram o potencial discriminatório da técnica de PCR-RFLP do gene CAL e clivagem com a enzima *HhaI* em isolados de *Sporothrix* spp. de interesse médico e veterinário, sendo uma alternativa para o sequenciamento (RODRIGUES et al., 2014a).

A digestão enzimática ocorreu em volume final de 12 µL, contendo 1X Buffer M, 2,5U de enzima *HhaI* (*HhaI* 10 U/µL - Thermo Scientific) e 6 µL de produto de PCR obtido na reação descrita anteriormente. Realizou-se a incubação a 37 °C durante 3 h com posterior separação das bandas por eletroforese em gel de agarose 2,5% por 90 min a 75 V e posterior revelação, como descrito previamente. A identificação dos isolados foi alcançada através da comparação do padrão de bandas obtido após a digestão enzimática com cepas padrão (Figura 9).

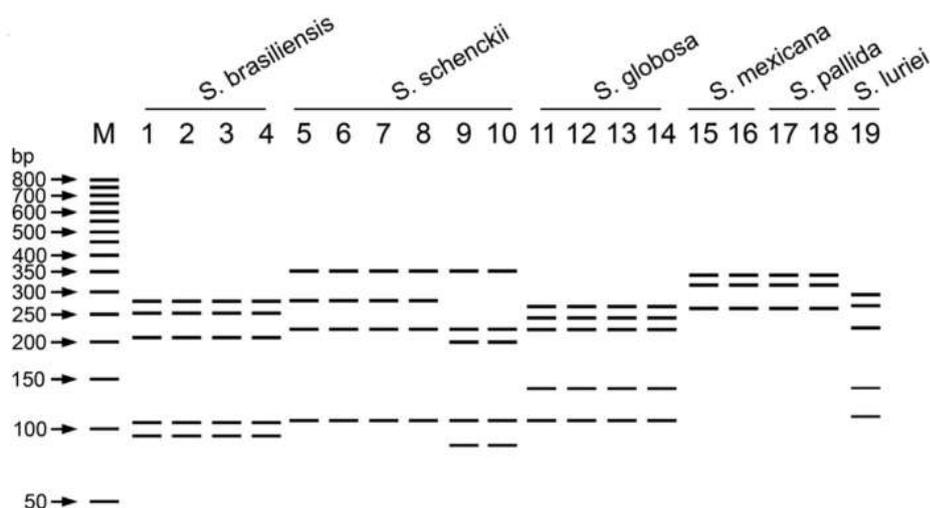


Figura 9 – Interpretação esquemática dos perfis gerados após eletroforese dos produtos de PCR-RFLP do gene CAL com a enzima *HhaI* (Fonte: Rodrigues et al., 2014a)

3.6 Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

O perfil de suscetibilidade antifúngica das cepas trabalhadas frente à anfotericina B (AMB) (Sigma, St. Louis, EUA), terbinafina (TRB) (Eurofarma, Brasil) e aos azólicos itraconazol (ITC) (Eurofarma, Brasil), cetoconazol (KTC) (Eurofarma, Brasil) e voriconazol (VRC) (Sigma, St. Louis, EUA) foram determinados de acordo com o protocolo M38-A2, padronizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2008). Tal avaliação foi realizada no Núcleo de Micologia do Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

3.6.1 Preparação de antifúngicos

Utilizou-se o meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium*) 1640 (Sigma, St. Louis, EUA) sem adição de bicarbonato de sódio e acrescido de L-glutamina. Os antifúngicos supracitados foram utilizados em sua forma p. a. As soluções-mãe de AMB, TRB, ITC, KTZ e VRC foram preparadas em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração de 1.600 mg/l. Soluções de uso a serem adicionadas em placas de microtitulação onde os testes seriam posteriormente realizados foram preparadas de modo que a concentração final obtida, após a adição do inóculo, abrangessem o intervalo entre 16 mg/l a 0,03 mg/l. Alíquotas de 100 µl foram adicionadas das colunas 2 a 11 contendo concentrações de antifúngico pré-determinadas. Colunas 1 e 12 continham respectivamente o controle negativo, sem o acréscimo de inóculo, e positivo, sem a adição de antifúngico. (CLSI, 2008).

Em cada placa foi possível avaliar seis amostras e duas cepas-padrão.

3.6.2 Preparação do inóculo

Objetivando induzir a formação de conídios realizou-se a semeadura em PDA sem o acréscimo de cloranfenicol acondicionado em tubo, com posterior incubação a 30 °C durante 7 dias. O recolhimento de conídios foi feito a partir da adição de 1 mL de solução salina (NaCl 0,85%), seguido de desprendimento das estruturas de reprodução com auxílio de alça descartável e adição de 1 gota de Tween 20. Realizou-se então a transferência da suspensão resultante para novo tubo de ensaio previamente esterilizado, permitindo a posterior precipitação de estruturas mais pesadas, como fragmentos de hifas, durante 5 min, promovendo nova transferência do sobrenadante para outro tubo estéril. Após homogeneização em vortex por aproximadamente 15 seg, ajustou-se a densidade óptica entre 0,09 e 0,13 com leitura a 530 nm (Titertek Multiscan, Suécia), seguido de diluição das amostras na concentração 1:50 (CLSI, 2008).

Inoculou-se 0,1 mL da suspensão de conídios resultante em cada poço contendo o meio RPMI-1640 (Cultilab, Brasil) nas diferentes concentrações do antifúngico a ser testado. Os poços de controle foram preparados com a adição de 0,1 mL da suspensão do inóculo e 0,1 mL do diluente do antifúngico, sem o acréscimo do fármaco a ser testado.

Para controle de qualidade do teste de suscetibilidade a antifúngicos empregou-se *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *C. krusei* ATCC 6258.

3.6.3 Incubação e leitura

Todas as placas contendo os testes para microdiluição foram mantidas a 35 °C com leitura após 46 a 50 h. A determinação da CIM foi feita por análise visual ao comparar-se o crescimento verificado no poço ausente de substância antifúngica com os outros, contendo concentrações decrescentes dos fármacos.

A CIM para AMB, ITC e VRC foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o desenvolvimento fúngico (100%). Ao avaliarmos TRB a interpretação foi feita a partir da menor concentração a apresentar ao menos 80% de redução no desenvolvimento fúngico. Para KTC a CIM foi determinada a partir da menor concentração a apresentar redução de 50% no desenvolvimento fúngico.

4 RESULTADOS

4.1 Exemplos fúngicos

Foram incluídos no estudo 168 isolados de *Sporothrix* spp oriundos de cães e gatos no intervalo entre janeiro de 2012 e maio de 2015 (Quadro 4). Destes, 126 foram originários da rotina do HVPA, representando 75% dos exemplares. Verificou-se ainda a prevalência de amostras provenientes da espécie felina, totalizando 141 amostras (83,93%), enquanto 27 corresponderam a cães (16,07%). Não foram obtidas amostras a partir de outras espécies animais. Foi possível detectar, ainda, a predominância de felinos do sexo masculino, representando 51,19% das amostras trabalhadas. Demais informações podem ser verificadas no Quadro 4. A listagem completa encontra-se disponível em anexo (ANEXO C).

Quadro 4 – Características da população amostrada para identificação de espécie e suscetibilidade de isolados do complexo *Sporothrix schenckii* (2012-2015, Seropédica – RJ)

| <u>Distribuição anual</u> | <u>Espécie animal</u> | <u>Distribuição racial (felinos)</u> |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| 2012 – 28 (16,67%) | Felinos – 141 (83,93%) | SRD – 117 (69,64%) |
| 2013 – 51 (30,35%) | ♂ – 86 (51,19%) | Siamês – 7 (4,17%) |
| 2014 – 68 (40,48%) | ♀ – 41 (27,98%) | Não informado – 17 (10,12%) |
| 2015 – 21 (12,5%) | Não informado – 8 (4,76%) | |
| | Canino – 27 (16,07%) | <u>Distribuição racial (caninos)</u> |
| | ♂ – 13 (7,74%) | SRD – 6 (3,57%) |
| | ♀ – 14 (8,33%) | Labrador – 4 (2,38%) |
| | | Poodle – 4 (2,38%) |
| <u>Origem do exemplar</u> | <u>Faixa etária</u> | Pinscher – 3 (1,78%) |
| HVPA – 126 (75%) | ≤ 1 ano – 36 (21,43%) | Yorkshire Terrier – 3 (1,78%) |
| Externos – 42 (25%) | >1 ano ≤ 7 anos – 72 (42,86%) | Beagle – 1 (0,6%) |
| | > 7 anos – 21 (12,5%) | Chow Chow – 1 (0,6%) |
| | Não informado – 39 (23,21%) | Dachshund – 1 (0,6%) |
| | | Dogue Alemão – 1 (0,6%) |
| | | Fox Paulistinha – 1 (0,6%) |
| | | Pastor Canadense – 1 (0,6%) |
| | | Não informado – 1 (0,6%) |

HVPA: Hospital Veterinário de Pequenos Animais - UFRRJ, SRD: Sem Raça Definida

4.2 Purificação dos Isolados

Foi possível a obtenção de colônias morfológicamente compatíveis com membros do complexo *Sporothrix* em sua forma unicelular a partir dos 168 exemplares trabalhados (Figura 10). Desta forma, garantiu-se a purificação das amostras oriundas do Diagnóstico Microbiológico Veterinário para execução dos testes posteriores, bem como para armazenamento e utilização futura.



Figura 10 – Colônias leveduriformes de exemplar pertencente ao complexo *Sporothrix schenckii* em Ágar Infuso de Cérebro e Coração acrescido de sangue de carneiro 5% e cloranfenicol

4.3 Identificação Fenotípica

De acordo com a chave de identificação fenotípica proposta por Marimon et al. (2007, 2008) (Quadro 2), 159 (94,64%) exemplares foram identificados como *S. brasiliensis* e 9 (5,36%) apresentaram características fenotípicas compatíveis com *S. luriei*.

4.3.1 Diâmetros de colônias

As características macromorfológicas dos espécimes trabalhados foram similares. Os diâmetros de colônia foram mensurados com 14 e 21 dias de desenvolvimento, tendo sido utilizadas duas temperaturas de incubação: 30 °C e 37 °C (Figuras 11 e 12). Após 21 dias de crescimento não foi possível a detecção de colônias com diâmetro superior a 50 mm a 30 °C. Entretanto, todos os exemplares trabalhados apresentaram capacidade de desenvolvimento a 37 °C (Tabela 2).

Tabela 2 - Diâmetros de colônia obtidos em Ágar Batata Dextrose após 14 e 21 dias de desenvolvimento com incubação a 30 °C e 37 °C

| Exemplares do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> | Diâmetro de Colônia (mm) | | | |
|---|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 30 °C (14 dias) | 30 °C (21 dias) | 37 °C (14 dias) | 37 °C (21 dias) |
| n = 168 | 10 – 32 (\bar{x} = 21,7) | 15 – 46 (\bar{x} = 32,1) | 2 – 16 (\bar{x} = 6,5) | 2 – 19 (\bar{x} = 8,7) |

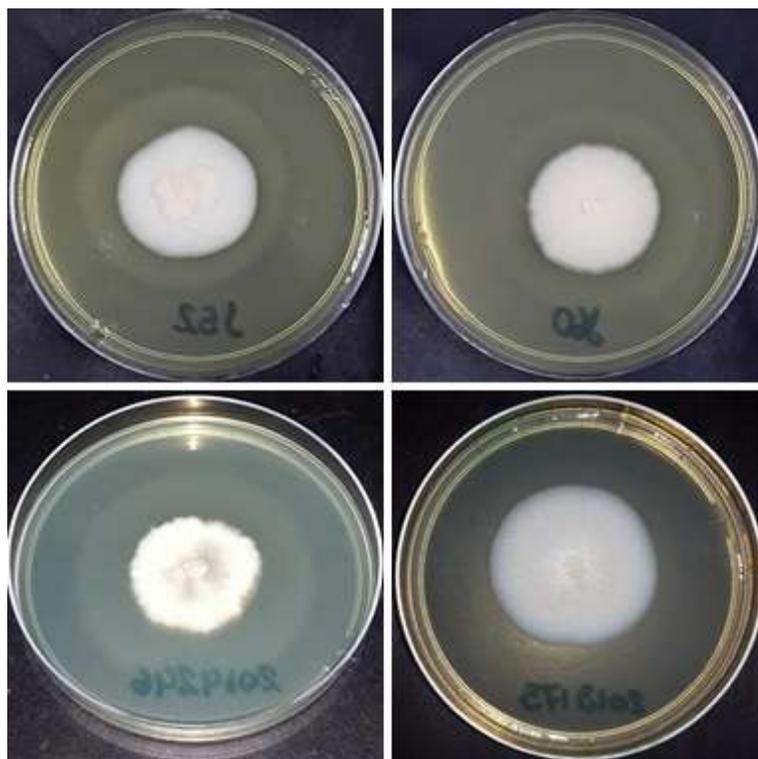


Figura 11 – Diâmetros de colônia obtidos após 21 dias de desenvolvimento a 30 °C em Ágar Batata Dextrose



Figura 12 – Diâmetros de colônia obtidos após 21 dias de desenvolvimento a 37 °C em Ágar Batata Dextrose

4.3.2 Produção de conídios sésseis pigmentados

A pesquisa por conídios sésseis pigmentados foi realizada sob aumento de 400x, após a confecção de lâminas com ácido láctico. Observou-se que a quantidade de estruturas pigmentadas apresentou grande variabilidade de acordo com a cepa avaliada. Das 168 amostras estudadas, 159 (94,64%) foram positivas (Figura 13). Um total de 9 (5,36%) amostras não apresentou pigmentação em suas estruturas após os 10 dias de desenvolvimento.

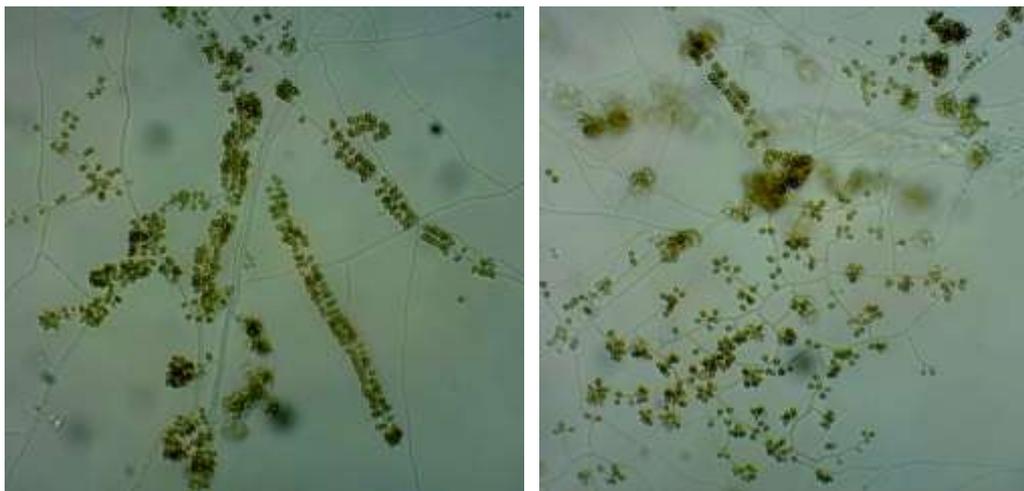


Figura 13 – Verificação de conídios sésseis pigmentados após 10 dias de desenvolvimento em *Corn Meal Agar* (Ácido Láctico – 400x)

4.3.3 Provas de assimilação de fontes carbonadas

A determinação do perfil de assimilação de fontes carbonadas foi realizada a partir de análise visual, observando o desenvolvimento fúngico após 5 a 7 dias de incubação na presença da fonte testada. Todas as 168 cepas avaliadas apresentaram capacidade de assimilar a glicose (controle positivo) e não desenvolveram em YNB isento de qualquer fonte carbonada (controle negativo). Constatou-se ainda a incapacidade de desenvolvimento de todos os 168 exemplares trabalhados tendo rafinose ou sacarose como fonte exclusiva de carbono (Figura 14).

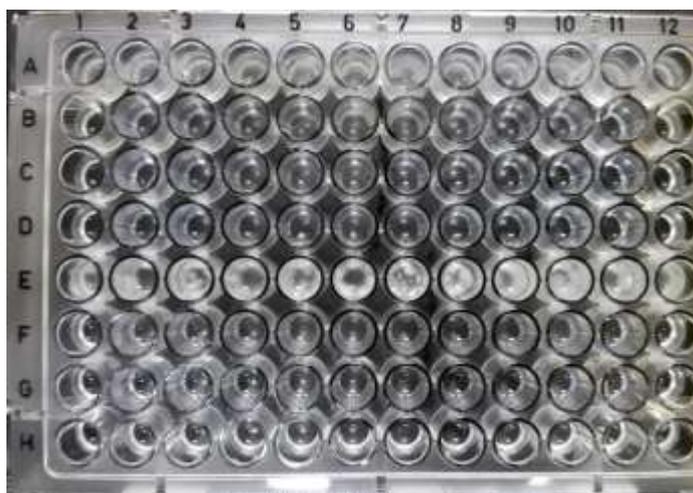


Figura 14 – Determinação do perfil de assimilação de fontes carbonadas de isolados do complexo *Sporothrix schenckii*. A/E: glicose, B/F: rafinose, C/G: sacarose, D/H: YNB isento de fontes carbonadas

4.4 Identificação Genotípica

A amplificação do gene CAL utilizando o par de *primers* CL1 e CL2A possibilitou a obtenção de um único *amplicon* com aproximadamente 850 pb a partir do DNA extraído das cepas padrão de cada espécie do complexo *Sporothrix schenckii*, bem como dos 168 exemplares utilizados em nossos estudo.

A ação da enzima *HhaI* possibilitou a identificação dos isolados fúngicos através da determinação do padrão de bandas observadas em gel de agarose 2,5%. O tamanho dos fragmentos esperados para cada espécie encontram-se listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Fragmentos obtidos a partir da ação enzimática de *HhaI* sobre gene CAL para diferenciação de componentes do complexo *Sporothrix schenckii*

| Espécie | Número de fragmentos | Comprimento dos fragmentos |
|--------------------------------|----------------------|----------------------------|
| <i>Sporothrix brasiliensis</i> | 5 | 251, 232, 198, 96 e 85 pb |
| <i>Sporothrix globosa</i> | 5 | 233, 215, 196, 122 e 96 pb |
| <i>Sporothrix luriei</i> | 5 | 257, 223, 215, 121 e 96 pb |
| <i>Sporothrix mexicana</i> | 3 | 292, 251 e 232 pb |
| <i>Sporothrix pallida</i> | 3 | 292, 251 e 232 pb |
| <i>Sporothrix schenckii</i> | 4 | 313, 249, 197 e 96 pb |
| | 5 | 313, 197, 179, 96 e 70 pb |

Informações baseadas no trabalho de Rodrigues et al. (2014a)

A partir dos padrões de banda observados concluiu-se que os 168 (100%) exemplares avaliados poderiam ser genotipicamente classificados como *Sporothrix brasiliensis*. As cepas padrão utilizadas apresentaram os mesmos tamanhos de fragmento descritos por Rodrigues et al. (2014a), como é possível verificar na Figura 15.

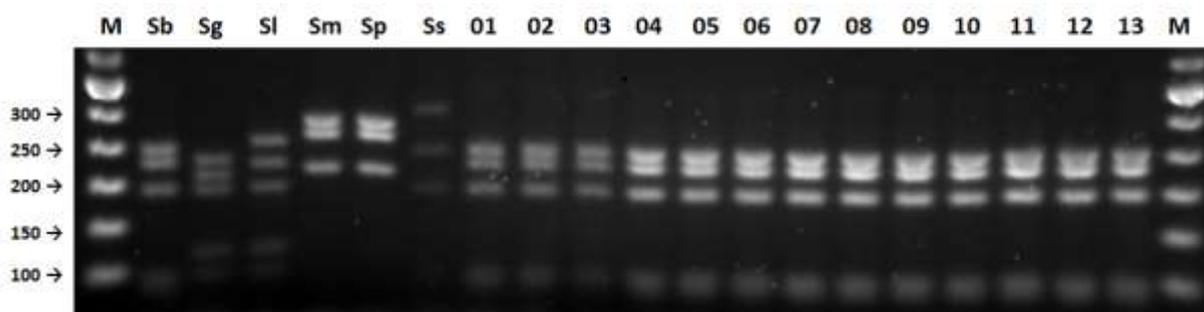


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose 3% dos produtos de PCR-RFLP do gene CAL utilizando a enzima de restrição *HhaI* em cepas padrão (Sb: *S. brasiliensis*, Sg: *S. globosa*, Sl: *S. luriei*, Sm: *S. mexicana*, Ss: *S. schenckii*) e 01-13: exemplares obtidos a partir do Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ. M = 50 bp DNA Ladder (Invitrogen™)

4.5 Teste de Sensibilidade a Antifúngicos

Os perfis de suscetibilidade dos 168 exemplares fúngicos trabalhados frente a AMB, TRB, ITC, KTC e VRC foram avaliados sob os parâmetros de intervalo, moda, MIC₅₀ e MIC₉₀ (Tabela 4) de acordo com as frequências obtidas para cada uma das concentrações testadas (Tabela 5). A listagem completa pode ser verificada em anexo (ANEXO D).

Tabela 4 – Perfis de suscetibilidade a antifúngicos de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* oriundos de animais frente a cetoconazol, itraconazol, voriconazol, terbinafina e anfotericina B

| Agente Antifúngico | CIM µg / mL (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|------|------|--------|-------------------|------|------|--------|------------------|------|------|--------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Média | Intervalo | 50% | 90% | Média | Intervalo | 50% | 90% | Média |
| KTC | 0,015–2 | 0,25 | 1 | 0,3 | 0,015–2 | 0,25 | 1 | 0,288 | 0,03–1 | 0,5 | 1 | 0,375 |
| ITC | 0,03–1 | 0,25 | 0,5 | 0,222 | 0,03–1 | 0,25 | 0,5 | 0,221 | 0,03–1 | 0,25 | 0,5 | 0,229 |
| VRC | 0,5–>8 | 4 | 8 | >3,702 | 0,5–>8 | 4 | 8 | >3,763 | 1–>8 | 4 | 8 | >3,387 |
| TRB | 0,015–0,25 | 0,06 | 0,12 | 0,053 | 0,015–0,25 | 0,06 | 0,06 | 0,054 | 0,015–0,12 | 0,06 | 0,12 | 0,049 |
| AMB | 0,25–4 | 0,5 | 2 | 0,716 | 0,25–4 | 0,5 | 2 | 0,692 | 0,25–4 | 1 | 2 | 0,857 |

CIM: concentração inibitória mínima, KTC: cetoconazol, ITC: itraconazol, VRC: voriconazol, TRB: terbinafina

Tabela 5 – Frequência de concentração inibitória mínima (CIM) verificada a partir das 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ

| ATF | Amostragem | CIM µg / mL | | | | | | | | | | |
|-----|------------------|-------------|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|
| | | 0,015 | 0,03 | 0,06 | 0,12 | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | >8 |
| KTC | Total (n=168) | 1 | 3 | 9 | 30 | 45 | 54 | 24 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | Felino (n = 141) | 1 | 2 | 8 | 29 | 37 | 44 | 18 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| | Canino (n = 27) | 0 | 1 | 1 | 1 | 8 | 10 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ITC | Total (n=168) | 0 | 7 | 17 | 35 | 59 | 35 | 15 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Felino (n = 141) | 0 | 5 | 17 | 29 | 47 | 30 | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Canino (n = 27) | 0 | 2 | 0 | 6 | 12 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VRC | Total (n=168) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 18 | 39 | 43 | 60 | 7 |
| | Felino (n = 141) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 | 32 | 38 | 51 | 5 |
| | Canino (n = 27) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 7 | 5 | 9 | 2 |
| TRB | Total (n=168) | 20 | 35 | 77 | 28 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Felino (n = 141) | 16 | 31 | 62 | 24 | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Canino (n = 27) | 4 | 4 | 15 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| AMB | Total (n=168) | 0 | 0 | 0 | 0 | 30 | 55 | 51 | 30 | 2 | 0 | 0 |
| | Felino (n = 141) | 0 | 0 | 0 | 0 | 28 | 44 | 45 | 23 | 1 | 0 | 0 |
| | Canino (n = 27) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 11 | 6 | 7 | 1 | 0 | 0 |

ATF: antifúngicos, KTC: cetoconazol, ITC: itraconazol, VRC: voriconazol, TRB: terbinafina

Os azólicos KTC e ITC apresentaram boa atividade antifúngica frente aos exemplares de *S. brasiliensis* testados, com CIM englobando intervalos entre 0,015 – 2 µg/mL e 0,03 – 1 µg/mL, respectivamente. A moda total e para amostras oriundas de felinos e caninos apresentou valores similares entre estes grupos, sendo 0,5 µg/mL para o imidazólico e 0,25 µg/mL para o triazólico. As médias geométricas obtidas foram de 0,3 µg/mL para KCT e 0,222 µg/mL para ITC, quando consideramos todos os exemplares testados. As tabelas 6 e 7 apresentam os resultados obtidos para KTC e ITC, respectivamente.

Tabela 6 – Suscetibilidade a cetoconazol verificada a partir de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015)

| Ano | KTC - CIM µg / mL (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|------|-----|----------|-------------------|------|-----|------|------------------|------|-----|------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda |
| 2012 (n = 28) | 0,015–2 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,015–2 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,25–1 | 0,5 | 1 | 0,5 |
| 2013 (n = 51) | 0,03–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,03–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,03–1 | 0,12 | 1 | NE* |
| 2014 (n = 68) | 0,03–2 | 0,25 | 1 | 0,25/0,5 | 0,03–2 | 0,25 | 0,5 | 0,5 | 0,25–1 | 0,5 | 1 | 0,25 |
| 2015 (n = 21) | 0,06–1 | 0,5 | 1 | 0,5 | 0,06–1 | 0,5 | 1 | 0,5 | - | - | - | - |

KTC: cetoconazol, CIM: concentração inibitória mínima

Tabela 7 – Suscetibilidade a itraconazol verificada a partir de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015)

| Ano | ITC - CIM µg / mL (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|------|-----|------|-------------------|------|-----|------|------------------|------|-----|-----------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda |
| 2012 (n = 28) | 0,06–0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,12 | 0,06–0,5 | 0,12 | 0,5 | 0,12 | 0,12–0,5 | 0,25 | 0,5 | 0,25 |
| 2013 (n = 51) | 0,03–1 | 0,12 | 0,5 | 0,25 | 0,03–1 | 0,12 | 0,5 | 0,25 | 0,03–0,5 | 0,12 | 0,5 | 0,03/0,25 |
| 2014 (n = 68) | 0,06–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,06–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,12–1 | 0,25 | 1 | 0,25 |
| 2015 (n = 21) | 0,12–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,12–1 | 0,25 | 1 | 0,25 | - | - | - | - |

ITC: itraconazol, CIM: concentração inibitória mínima

VRC não apresentou a mesma eficácia na inibição do desenvolvimento fúngico, com intervalo de CIM abrangendo entre 0,5 – >8 µg/mL. A maior parcela das amostras apresentou CIM igual ou superior a 8 µg/mL. Foi possível detectar redução da moda ao considerarmos exclusivamente os isolados obtidos no ano de 2015. A média geométrica alcançada, considerando todas as amostras fúngicas testadas, foi de >3,702 µg/mL. Verifica-se na tabela 8 os resultados obtidos para VRC de maneira mais detalhada.

Tabela 8 – Suscetibilidade a voriconazol verificada a partir de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015)

| Ano | VRC - CIM µg / mL (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|-----|-----|------|-------------------|-----|-----|------|------------------|-----|-----|------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda |
| 2012 (n = 28) | 2->8 | 8 | >8 | 8 | 2->8 | 8 | >8 | 8 | 2-8 | 4 | 8 | 8 |
| 2013 (n = 51) | 1-8 | 4 | 8 | 4 | 1-8 | 4 | 8 | 4 | 2-8 | 2 | 8 | 2 |
| 2014 (n = 68) | 1->8 | 4 | 8 | 8 | 1->8 | 4 | 8 | 8 | 1->8 | 4 | >8 | 8 |
| 2015 (n = 21) | 0,5-8 | 2 | 4 | 2 | 0,5-8 | 2 | 4 | 2 | - | - | - | - |

VRC: voriconazol, CIM: concentração inibitória mínima

A aliliamina TRB apresentou o melhor efeito inibitório *in vitro*, com todas as cepas testadas apresentando CIM igual ou inferior a 0,25 µg/mL e moda de 0,06 µg/mL para amostras oriundas de felinos e caninos. Verificou-se ainda a menor média geométrica dentre os fármacos antifúngicos testados, sendo igual a 0,053 µg/mL. A tabela 9 contém as CIM para TRB para todos os anos trabalhados.

Tabela 9 – Suscetibilidade a terbinafina verificada a partir de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015)

| Ano | TRB - CIM µg / mL (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------------|------|------|------|-------------------|------|------|------|------------------|-------|------|-------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda |
| 2012 (n = 28) | 0,015-0,12 | 0,03 | 0,12 | 0,06 | 0,015-0,12 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,015-0,12 | 0,015 | 0,12 | 0,015 |
| 2013 (n = 51) | 0,015-0,25 | 0,06 | 0,25 | 0,06 | 0,015-0,25 | 0,06 | 0,25 | 0,06 | 0,03-0,12 | 0,06 | 0,12 | 0,12 |
| 2014 (n = 68) | 0,015-0,25 | 0,06 | 0,12 | 0,06 | 0,015-0,25 | 0,06 | 0,12 | 0,06 | 0,03-0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| 2015 (n = 21) | 0,03-0,25 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,03-0,25 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | - | - | - | - |

TRB: terbinafina, CIM: concentração inibitória mínima

O antifúngico poliênico AMB demonstrou efeito variável, com intervalos de CIM variando de 0,25 – 4 µg / mL. A moda foi variável para espécie felina e canina, com 1 e 0,5 µg/mL respectivamente. A média geométrica, considerando todas as amostras testadas, foi de 0,716 µg/mL. A tabela 10 apresenta os dados relativos a este antifúngico.

Tabela 10 – Suscetibilidade a anfotericina B verificada a partir de 168 exemplares de *Sporothrix brasiliensis* obtidas a partir da rotina de Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ (2012-2015)

| Ano | AMB - CIM $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Intervalo) | | | | | | | | | | | |
|------------------|---|-----|-----|-------|-------------------|-----|-----|-------|------------------|-----|-----|-------|
| | Total (n = 168) | | | | Felinos (n = 141) | | | | Caninos (n = 27) | | | |
| | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda | Intervalo | 50% | 90% | Moda |
| 2012 (n = 28) | 0,25-4 | 1 | 2 | 0,5 | 0,05-2 | 0,5 | 2 | 0,5 | 0,25-4 | 1 | 4 | 0,5/2 |
| 2013 (n = 51) | 0,25-4 | 0,5 | 1 | 0,5/1 | 0,25-4 | 0,5 | 2 | 0,5/1 | 0,5-1 | 0,5 | 1 | 0,5/1 |
| 2014 (n = 68) | 0,25-2 | 0,5 | 2 | 0,5 | 0,25-2 | 0,5 | 2 | 1 | 0,25-2 | 0,5 | 2 | 0,5 |
| 2015 (n = 21) | 0,25-2 | 1 | 2 | 2 | 0,25-2 | 1 | 2 | 2 | - | - | - | - |

AMB: anfotericina B, CIM: concentração inibitória mínima

O controle de qualidade utilizando as cepas *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 apresentaram CIM dentro dos valores determinados pelo manual CLSI M38-A2 (CLSI, 2008).

5 DISCUSSÃO

Desde o final da década de 1990, a esporotricose apresenta-se como um desafio a ser vencido por representar um risco a saúde pública no estado do RJ (BARROS et al., 2001; BARROS et al., 2010; PEREIRA et al., 2014). A relevância da espécie felina na manutenção da elevada casuística atualmente observada, bem como na disseminação desta micose de implantação, foi previamente relatada em diversos estudos prévios (BARROS et al., 2010; RODRIGUES et al., 2016b). Na presente avaliação ratifica-se a importância desta espécie animal em todo o estado, considerando que a mesma representou um total de 83,93% (141/168) dos diagnósticos positivos de esporotricose pelo Diagnóstico Microbiológico Veterinário – UFRRJ no intervalo entre janeiro de 2012 e maio de 2015. Desta forma, abordagens quanto a prevenção, diagnóstico, tratamento e orientação de tutores de felinos domésticos continuam sendo fundamentais para o controle desta epidemia negligenciada (BARROS et al., 2010).

A já conhecida predisposição de felinos machos para a esporotricose, também pode ser ressaltada nos resultados expostos (PEREIRA et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015; SCHUBACH et al., 2004). Sabe-se que, em virtude de particularidades comportamentais, indivíduos da espécie felina do sexo masculino, não castrados, são mais suscetíveis a aquisição da esporotricose como resultado da mordedura ou arranhadura de gatos previamente infectados (CRUZ, 2013). Um total de 51,19% (86/168) das amostras utilizadas no presente estudo foi oriundo deste perfil de paciente. Este número pode ser ainda superior, uma vez que oito dos animais não tiveram o gênero informado. No presente levantamento não foi possível determinar o percentual de pacientes não castrados, uma vez que as informações coletadas partiram da requisição de exame micológico nem sempre preenchida de modo completo pelo médico veterinário responsável pelo caso.

A maior parcela dos pacientes diagnosticados com esporotricose através do isolamento fúngico eram animais sem raça definida (SRD), correspondendo a 73,21% (123/168). Novamente, estes valores podem ser ainda maiores, uma vez que 18 animais não tiveram suas raças informadas. Pacientes felinos SRD chegam a representar 89,3% da casuística em estudos retrospectivos no RJ (PEREIRA et al., 2014). Tal fator pode ser explicado pela predominância de animais com este perfil em localidades com baixo poder socioeconômico, fração mais acometida pela esporotricose (SILVA et al., 2012). Devemos considerar ainda que grande parcela dos animais atendidos no HVPA também não possui raça definida, o que interfere diretamente neste dado pontual.

A relevância do caráter antroponótico desta enfermidade para a atual epidemia instalada no Brasil é corroborada por diversos fatores. Inicialmente, o aumento no número de casos de esporotricose humana descrito pelo INI (FIOCRUZ) no final do século XX já demonstrava o paralelo crescimento na quantidade de relatos em pacientes felinos. Ressaltava-se ainda o histórico de contato prévio com felinos suspeitos ou diagnosticados com a micose em 78,8% dos pacientes (BARROS et al., 2001). A elevada carga microbiana em lesões ulceradas de felinos, bem como o antecedente relato de isolamento do agente a partir da unha e cavidade oral desta espécie comprovam o elevado potencial de transmissão através da via transcutânea (SOUZA et al., 2006; SILVA et al., 2015). Caracterizações moleculares sustentaram esta teoria. Através da técnica de DNA *fingerprinting* confirmou-se a similaridade entre amostras de origem humana e animal, sugerindo possível fonte de infecção comum para ambos na atual epidemia instalada no Rio de Janeiro (REIS et al.,

2009). Ressalta-se ainda que em outros estados do território nacional, como São Paulo (SP) e Rio Grande do Sul (RS), a espécie felina desponta como a principal causa da disseminação desta micose subcutânea (MONTENEGRO et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015). Desta forma, qualquer estudo realizado a partir de amostras de origem animal, destacando a espécie felina, reflete diretamente em melhor compreensão acerca da esporotricose humana no estado do Rio de Janeiro, bem como em outras localidades do Brasil.

Embora considerada rara em outras regiões, a esporotricose canina apresenta-se em maior frequência no estado do RJ como resultado da disseminação da enfermidade entre espécies domésticas. Em estudos retrospectivos foi possível detectar aumento expressivo no número de casos. Entre 1998 e 2000 apenas sete cães tiveram o diagnóstico de esporotricose alcançado por unidades de atendimento da FIOCRUZ (BARROS et al., 2001). Tal número chega a 44 casos ao ampliarmos o intervalo até 2003 e totaliza 244 casos se considerarmos o período até o ano de 2015 (SCHUBACH et al., 2006; GREMIÃO et al., 2017). No presente estudo, isolados oriundos de cães representam 16,07% (27/168) do total de exemplares utilizados. É possível constatar que mesmo em menor número quando comparada aos isolados provenientes de felinos, a enfermidade ocasionada por membros do complexo *S. schenckii* demonstra sua relevância na rotina clínica de caninos no estado do Rio de Janeiro.

Devido à baixa carga microbiana observada muitas vezes na superfície das lesões cutâneas caninas, o impacto desta espécie na cadeia de transmissão desta doença fúngica é praticamente nula (MIRANDA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2016b). No entanto, a detecção de achados incomuns partindo de amostras oriundas de cães, como a identificação de *S. luriei* resistente a ITC, tornam estes exemplares especialmente interessantes (OLIVEIRA, D. E. et al., 2011). O conhecimento de particularidades comportamentais entre as espécies felina e canina também poderiam resultar em fontes diferentes de infecção e consequente identificação de espécies distintas.

A utilização do termodimorfismo na purificação dos espécimes trabalhados demonstrou grande utilidade no presente estudo. Sabe-se que a fase micelial de componentes do complexo *S. schenckii* apresentam características macromorfológicas diversas de acordo com a cepa, tempo de desenvolvimento e meio de cultura utilizado (HOOG et al., 2001; BARROS et al., 2011). Amostras de origem clínica podem apresentar diferentes níveis de contaminação, o que interfere diretamente nas análises fenotípicas, moleculares e na determinação do perfil de suscetibilidade do agente (CLSI, 2008; KURTZMANN et al., 2011). Assim, a obtenção de colônias isoladas na fase unicelular amplia a segurança quanto à pureza das cepas. Entretanto, algumas espécies do complexo apresentam conversão morfológica parcial, o que poderia requerer avaliação detalhada de alguns exemplares específicos (MARIMON et al., 2007). Tal fato não foi constatado nas 168 amostras selecionadas.

O desenvolvimento e aplicação de técnicas moleculares possibilitou a descrição de espécies filogeneticamente distintas, onde anteriormente apenas *S. schenckii* era referida. A chave de identificação fenotípica sugerida por Marimon et al. (2007) foi apresentada como um método fácil e confiável, que suprime a necessidade de metodologias moleculares para alcançar este objetivo. Houve, por exemplo, 100% de concordância entre as identificações fenotípicas e moleculares realizadas em 40 exemplares clínicos de origem humana e animal no RS (OLIVEIRA, D. E. et al., 2011). Outra análise utilizando 33 exemplares oriundos de felinos e caninos de diferentes estados do Brasil também não verificou discordância entre os resultados fenotípicos e filogenéticos (RODRIGUES et al., 2013b). Entretanto, outros autores apontaram dificuldades e resultados controversos entre as análises moleculares e

morfofisiológicas. No RJ, ao determinar a identidade de 246 isolados, não foi possível a classificação de 25 exemplares utilizando somente ferramentas fenotípicas e erroneamente classificaram uma amostra como *S. mexicana* (OLIVEIRA, M. M. E., et al., 2011). Outro levantamento empregando exemplares clínicos e ambientais demonstrou discordância entre as técnicas implementadas em três das nove identificações alcançadas (MAHMOUDI et al., 2016). Um dos pontos determinantes para virulência do agente, bem como para identificação fenotípica, a capacidade de crescimento a 37 °C foi descrita como ausente em *S. globosa* (MARIMON et al., 2007). Contudo, Yu et al. (2013) verificaram que a maioria dos 74 exemplares de *S. globosa* por eles avaliados apresentavam termotolerância, questionando a utilidade deste teste para a diferenciação de espécies do complexo. Camacho et al. (2015) afirmaram, após a impossibilidade de identificação fenotípica de 70% dos exemplares por eles estudados, que a diferenciação das espécies do complexo por análises morfofisiológicas gera resultados incertos. Assim sendo, esta metodologia não deve ser aplicada dissociada de ferramentas moleculares.

A identificação fenotípica de nove exemplares como *S. luriei* deve ser vista com cautela. Considerado um agente raro da esporotricose, com poucos casos descritos na literatura, a representatividade de 5,36% das amostras trabalhadas seria um achado incomum. Embora esta espécie já tenha sido previamente identificada em amostras obtidas no RS através do sequenciamento de fragmento do gene CAL, a identificação baseada tão somente nas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas geraria resultados que fogem do esperado para a já conhecida epidemiologia do estado do RJ (MARIMON et al., 2008a; OLIVEIRA, D. E., 2011; RODRIGUES et al., 2013b).

A característica morfológica que possibilita a diferenciação de *S. brasiliensis* e *S. luriei* é a produção de conídios sésseis pigmentados, tendo resultados respectivamente positivo e negativo para estas espécies (MARIMON et al., 2007; 2008a). A produção de melanina, importante fator de virulência para diversos agentes infecciosos, já demonstrou variabilidade de acordo com o substrato utilizado pelo fungo. O acréscimo de glicose resultou em aumento na produção de pigmentação (ALMEIDA-PAES et al., 2009). A avaliação micromorfológica no presente estudo foi realizada em CMA de forma padronizada, não tendo oscilações quanto à composição do meio de cultura utilizado. Como observado nos resultados aqui apresentados, a caracterização morfológica dos conídios como um parâmetro de identificação deve ser avaliada com cautela e associada a outros parâmetros fenotípicos, uma vez que os espécimes fúngicos podem perder a capacidade de produzir algumas estruturas morfológicas devido a fatores externos ou após diversos repiques (MARIMON et al., 2008a; OLIVEIRA, M. M. E. et al., 2011). Zhao et al. (2015), ao avaliarem características morfofisiológicas de diferentes componentes do complexo *Sporothrix*, verificaram ausência de pigmentação nas colônias de *S. globosa*, diferente do que é inicialmente esperado para a espécie. Desta forma, estes autores sugerem a ocorrência de algum tipo de degeneração nos espécimes trabalhados, resultando na perda desta capacidade de síntese. Tal observação pode justificar também a ausência de conídios sésseis pigmentados nos nove exemplares fenotipicamente identificados como *S. luriei* no presente estudo.

Anterior a descrição do complexo *S. schenckii*, a literatura já alertava para a possibilidade de múltiplas espécies envolvidas nos quadros clínicos observados, sendo estas de difícil diferenciação morfológica (TRILLES et al., 2005). Entretanto, a confirmação desta suspeita foi possível somente após a implementação de estudos moleculares (MARIMON et al., 2007). A partir de então, a diferenciação das espécies tornou-se especialmente interessante para melhor compreensão da distribuição geográfica dos exemplares fúngicos, perfis de suscetibilidade e fatores de virulência associados (MAHMOUDI et al., 2016).

É sabido que as espécies *S. schenckii* e *S. globosa* são patógenos cosmopolitas que usualmente estão relacionados a fontes ambientais de infecção. Exemplos de *S. mexicana* e *S. pallida* apresentam maior caráter ambiental, sendo raramente relacionados a casos clínicos. Por outro lado, a espécie *S. brasiliensis* é diretamente relacionada à transmissão zoonótica da esporotricose, como resultado da mordedura e arranhadura de gatos infectados ou não (RODRIGUES et al., 2016b). Considerando apenas os aspectos epidemiológicos da enfermidade, já é possível perceber a relevância da correta identificação dos exemplares clínicos para determinar possíveis fontes de infecção e intervir de forma mais efetiva na prevenção da doença.

Assim sendo, metodologias moleculares são ferramentas extremamente eficientes para caracterização destes micro-organismos morfológicamente semelhantes (OLIVEIRA et al., 2014). Dentre as alternativas para identificação, o sequenciamento de regiões gênicas vem sendo amplamente implementado em pesquisas epidemiológicas. Genes que codificam proteínas como a calmodulina e β -tubulina e o gene ribossomal ITS já foram previamente recomendados como marcadores na identificação de *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007; DE MEYER et al., 2008; MARIMON et al., 2008a; RODRIGUES et al., 2013b; ZHOU et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016a). Embora classicamente o gene ITS seja o *locus* mais implementado na rotina de identificação fúngica, sendo considerado um *barcoding*, o gene CAL desponta como o alvo mais utilizado em estudos filogenéticos para cepas de *Sporothrix* de interesse clínico (MARIMON et al., 2007; MARIMON et al., 2008a; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; OLIVEIRA, M. M. E. et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013b; ZHOU et al., 2014; DE BEER et al., 2016). Contudo, ressalta-se que, até o presente momento, o sequenciamento de DNA não é considerada a técnica mais apropriada para laboratórios de rotina (ALMEIDA-PAES et al., 2014).

O desenvolvimento de metodologias independentes de sequenciamento para caracterização de amostras de interesse clínico possibilita a utilização de maior número de exemplares em estudos epidemiológicos, bem como promove a redução de custos na rotina diagnóstica, tornando a execução de técnicas moleculares mais acessível. O PCR-RFLP é uma técnica rápida, menos onerosa, de fácil execução e interpretação, dependendo da região gênica a ser submetida a ação de enzimas de restrição (RODRIGUES et al., 2014a). Embora este protocolo não seja totalmente isento da necessidade de sequenciamento, uma vez que *S. mexicana* e *S. pallida* apresentam o mesmo padrão de bandas, a prevalência de *S. brasiliensis* no estado do RJ somada a não detecção de *S. mexicana* em território nacional, até o presente momento, e a baixa patogenicidade de *S. pallida* fez com que a técnica selecionada atendesse às necessidades do presente estudo (RODRIGUES et al., 2013b; RODRIGUES et al., 2016a). Em outras localidades o PCR-RFLP utilizando o gene CAL e enzima de restrição *HhaI* pode não ser tão eficaz, como na Itália, onde há prevalência de *S. pallida* (ROMEIO et al., 2011).

A execução de PCR-RFLP para diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes também demonstrou aplicabilidade em isolados clínicos de *Paracoccidioides* spp.. Tendo como alvo uma região do gene responsável pela síntese de α -tubulina, foi possível diferenciar *P. brasiliensis* e *P. lutzii* (ROBERTO et al., 2015). Assim como na diferenciação das espécies *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* baseado no gene *URA5* e dupla digestão pelas enzimas *Sau96I* e *HhaI* (MEYER et al., 2003).

Oliveira et al. (2012) desenvolveram outra metodologia alternativa, independente de sequenciamento, para diferenciação de espécies do complexo *Sporothrix*. A realização de *fingerprinting* utilizando o *primer* T3B possibilita a diferenciação de espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix* a partir de uma única reação de PCR, sendo amplamente utilizada na

literatura (ALMEIDA-PAES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015). A variabilidade intraespecífica verificada dentro da espécie *S. brasiliensis* a partir dos *amplicons* resultantes torna-se singular quando deseja-se comprovar que cepas obtidas em diferentes momentos de quadros crônicos são exatamente as mesmas (FREITAS et al., 2015; ALMEIDA-PAES et al., 2016).

Mais recentemente, a descrição de pares de *primer* desenvolvidos a partir do gene CAL capazes de diferenciar exemplares de interesse clínico também possibilitam a diferenciação destas espécies sem a necessidade de sequenciamento. Sua utilização em amostras homogêneas, como a do presente estudo, torna dispensável a ação de enzimas endonucleases. Desta forma, a genotipagem pode ser alcançada em intervalo ainda menor. O desenvolvimento de reações *multiplex* também é possível, em regiões com maior variedade etiológica (RODRIGUES et al., 2015).

Ao descrever novas espécies pertencentes ao complexo *S. schenckii*, Marimon et al. (2007) demonstraram que todas as amostras utilizadas no estudo e oriundas da epidemia verificada no estado do RJ pertenciam à espécie *S. brasiliensis*. Análises posteriores demonstraram que, embora outros componentes do complexo estejam presentes em território nacional, a prevalência de *S. brasiliensis* é evidente (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; OLIVEIRA, M. M. E. et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013a; RODRIGUES et al., 2013b; ALMEIDA-PAES et al., 2014; ARAUJO et al., 2015; BRILHANTE et al., 2016; GOMPERTZ et al., 2016). A identificação de 100% dos nossos exemplares fúngicos como pertencentes à espécie *S. brasiliensis* através da técnica de PCR-RFLP demonstra que esta prevalência e, conseqüentemente o potencial zoonótico da enfermidade, encontra-se amplamente distribuído em diferentes regiões do estado do RJ.

A fonte de infecção parece ser um dos fatores mais correlacionados ao agente etiológico adquirido (RODRIGUES et al., 2016b). A maior parcela dos pacientes humanos atendida no estado do RJ e diagnosticada com esporotricose por *S. brasiliensis* relata o prévio contato com felinos, acometidos ou não pela enfermidade. Entretanto, verifica-se a ocorrência de habitantes de zona rural infectados com *S. schenckii* que não incluem este dado em seu histórico. Sugere-se, então, que fontes ambientais foram responsáveis pela inoculação de propágulos fúngicos nestes pacientes (BARROS et al., 2001; ALMEIDA-PAES et al., 2014). Tal fator é ainda observado em outros estados do país. No RS e SP verifica-se a predominância de *S. brasiliensis* dentre os felinos infectados, sendo correlacionada com a transmissão entre animais (MONTENEGRO et al., 2014; SANCHOTENE et al., 2015). Em contrapartida, no Espírito Santo (ES), a esporotricose ocorre predominantemente em zona rural, tendo o fungo *S. schenckii* como agente causador da doença após a ocorrência de traumas com matéria vegetal (ARAUJO et al., 2015). A já reportada transmissão de *S. globosa* através da arranhadura de felino comprova, ainda, que esta relação não é exclusiva, havendo a possibilidade de disseminação de outros agentes em localidades distintas (WATANABE et al., 2016). Assim sendo, a identificação de todos os exemplares como *S. brasiliensis* fortalece a suspeita de felinos como fonte de infecção para os cães e gatos considerados no presente estudo.

Os fatores de virulência intrinsecamente relacionados a *S. brasiliensis* também merecem destaque, podendo justificar em parte a epidemia que vivenciamos atualmente. Estudo comparativo da patogenicidade de cinco espécies que compõem o complexo *Sporothrix*, em modelo murino, destacou a maior virulência da espécie em questão, sendo a única a apresentar taxas de mortalidade com baixa carga de inoculo infectante (2×10^4 conídios/animal). Salientou-se ainda que esta espécie, dentre as patogênicas do gênero,

provoca maior dano tecidual e apresenta a maior carga microbiana nas lesões, fato diretamente relacionado à possibilidade de transmissão (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al., 2009). Este potencial de virulência foi ainda comprovado em modelo experimental invertebrado de infecção *in vivo*, *Galleria mellonella* (CLAVIJO-GIRALDO et al., 2016). Na rotina clínica humana, levantamentos apontam que cepas de *S. brasiliensis* estão mais relacionadas à ocorrência de formas atípicas da enfermidade, como quadros de hipersensibilidade e disseminação sem a simultânea ocorrência de condição imunossupressora (ALMEIDA-PAES et al., 2014).

Sendo uma das principais características intrínsecas de agentes patogênicos, a termotolerância é uma condição necessária para a ocorrência de quadros infecciosos em mamíferos (HOGAN et al., 1996). Conforme comprovado previamente, a espécie *S. brasiliensis* apresenta maior tolerância dentro o grupo patogênico do gênero, sendo este dado, inclusive, apontado como um dos responsáveis por sua maior agressividade em pacientes felinos, uma vez que estes possuem temperatura corporal entre 38 e 39 °C (Rodrigues et al., 2013b). Contudo, sabe-se que a temperatura corporal média de cães também encontra-se dentro deste intervalo, sugerindo que a maior suscetibilidade dos felinos a esporotricose trata-se de um fator multifatorial (GOIC et al., 2014). Nossos resultados demonstraram a capacidade de desenvolvimento do agente a 37 °C em todos os exemplares avaliados, durante os testes de identificação fenotípica, confirmando a presença deste importante fator de virulência

A descrição da elevada prevalência de *S. brasiliensis* nas regiões epidêmicas do Brasil, através de análises filogenéticas, permitiu ainda a verificação de baixa variabilidade genética dentre estes exemplares fúngicos. Foi proposto, a partir de então, que estaríamos lidando com uma população clonal (RODRIGUES et al., 2013). Tal suspeita foi posteriormente confirmada no ano seguinte, demonstrando que *S. brasiliensis* e *S. schenckii* passam por processos evolutivos distintos. A reprodução sexual fúngica promove impactos diretos na distribuição populacional, tendo ainda papel central na diversificação e evolução de espécies patogênicas. Evidências de recombinação foram encontradas para exemplares de *S. schenckii*, mas não em *S. brasiliensis* (RODRIGUES et al., 2014). A partir destes dados, sugeriu-se que houve uma modificação de habitat de *S. brasiliensis*, possivelmente na região sudeste do Brasil, entre material vegetal e a espécie felina (RODRIGUES et al., 2014). A metodologia molecular implementada no presente estudo é incapaz de realizar inferências acerca da evolução do agente, uma vez que estamos lidando com um único gene que apresenta pouca variabilidade. Contudo, a verificação de dois padrões de banda distintos que caracterizam a espécie *S. schenckii*, demonstra variabilidade nos pontos de clivagem da enzima *HhaI* dentro desta espécie, mesmo considerando um único fragmento de gene constitutivo (Figura 9).

Sendo determinada a estreita correlação entre *S. brasiliensis* e o caráter antroponótico da esporotricose, informações acerca dos perfis de suscetibilidade a partir de isolados clínicos veterinários, em especial de felinos, refletem diretamente em melhor conhecimento do agente etiológico da enfermidade em regiões epidêmicas do Brasil. Consequentemente, a realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos em levantamentos epidemiológicos possibilita a detecção de estirpes resistentes, bem como o desenvolvimento de protocolos terapêuticos mais eficazes (MARIMON et al., 2008b; RODRIGUES et al., 2013b).

Deve-se destacar, ainda, que a descrição do atual complexo de espécies crípticas é relativamente recente (MARIMON et al., 2007). Assim, estudos anteriores a esta importante descoberta devem ser analisados com cautela (BORBA-SANTOS et al., 2015). Verifica-se na

literatura, número limitado de estudos que consideram a espécie *S. brasiliensis* e seus respectivos perfis de suscetibilidade de pacientes humanos (MARIMON et al., 2008b; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; STOPIGLIA et al., 2012; RODRIGUES et al., 2014b; STOPIGLIA et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2015; ALMEIDA-PAES et al., 2016). A avaliação de exemplares de origem animal é ainda mais escassa (BRILHANTE et al., 2016). Na tabela 11 encontram-se dispostos os principais resultados alcançados por estes autores para os exemplares de *S. brasiliensis*.

A similaridade gênica observada entre isolados de *S. brasiliensis*, resulta em menor variabilidade dentre os perfis de suscetibilidade a antifúngicos. Assim sendo, menor amplitude foi verificada entre os resultados mínimos e máximos em testes de sensibilidade para diversos fármacos, quando comparados a outras espécies que compõem o complexo (MARIMON et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014; STOPIGLIA et al., 2014). Embora o número de amostras fúngicas utilizadas no presente levantamento tenha sido consideravelmente superior aos demais estudos disponíveis na literatura, verifica-se que não houveram grandes intervalos de interpretação para fármacos como KTC, ITC e TRB, fator condizente com a baixa variabilidade genética desta espécie patogênica.

Adicionalmente, *S. brasiliensis* apresenta maior sensibilidade *in vitro* a fármacos como ITC, quando comparada a outros componentes do complexo, como *S. mexicana* e *S. globosa* (MARIMON et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014b). Tal fator comprovado *in vitro* pode ser confrontado com estudos clínicos. Almeida-Paes et al. (2014) verificaram menor duração média de tratamento para esporotricose humana envolvendo *S. brasiliensis* quando comparada aos quadros resultantes da infecção por *S. schenckii*, sendo respectivamente 16 e 24 semanas.

Embora não tenham sido estabelecidos *breakpoints* interpretativos para *Sporothrix* spp., o documento CLSI M38-A2 (2008) recomenda que fungos filamentosos com CIM para ITC ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ devem ser considerados resistentes. Baseado nesta informação, é possível concluir que, dentre os 168 exemplares trabalhados, nenhum destes foi considerado resistente a ITC. Em levantamentos prévios, tal achado parece ser pouco frequente (Tabela 11). Contudo, falhas terapêuticas envolvendo este triazólico são constantemente verificadas na medicina humana e veterinária, indicando que múltiplas questões podem interferir diretamente no sucesso terapêutico (ALMEIDA-PAES et al., 2016; REIS et al., 2016). Embora este não tenha sido o foco principal do presente estudo, verificou-se dentre as requisições de exames micológicos encaminhados, o histórico de pacientes que já haviam sido submetidos a tratamento com ITC, sem sucesso.

Apresentando CIM ligeiramente superior ao verificado para ITC, o imidazólico KTC também apresentou boa eficácia *in vitro* frente a forma filamentosa de *S. brasiliensis*. Utilizado no passado para o tratamento de esporotricose, este fármaco não é mais recomendado no tratamento humano e felino, devido a sua baixa eficácia *in vivo* e associação com efeitos adversos mais frequentes (KAUFFMAN et al., 2007). Na medicina veterinária, a utilização de KCT para o tratamento de 598 felinos acompanhados no estado do RJ resultou na cura clínica de apenas 28,6% destes, sendo que 42,1% apresentaram alterações gastrointestinais relacionadas ao protocolo implementado (PEREIRA et al., 2010).

Tabela 11 – Concentração inibitória mínima (CIM) de exemplares de *Sporothrix brasiliensis* frente a cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), terbinafina (TRB) e anfotericina B (AMB) em estudos prévios

| Ref. | Parâmetro | CIM µg / mL | | | | |
|--|-----------|-------------|-----------|----------|-------------|-----------|
| | | KTC | ITC | VRC | TRB | AMB |
| Brilhante et al. (2016) n = 48 | Intervalo | 0,03 – 2 | 0,125 – 2 | 2 – 64 | NT | 0,125 – 4 |
| | 50% | 0,25 | 1 | 16 | NT | 1 |
| | 90% | 1 | 2 | 64 | NT | 2 |
| | GM | 0,27 | 0,77 | 20,16 | NT | 0,90 |
| Borba-Santos et al. (2015) n = 32 | Intervalo | NT | NI | NI | NI | NI |
| | 50% | NT | NI | NI | NI | NI |
| | 90% | NT | NI | NI | NI | NI |
| | GM | NT | 2,55 | 6,15 | 0,1 | 1,3 |
| Stopiglia et al. (2014) n = 23 | Intervalo | 0,03 – 1 | 0,06 – 2 | 1 – 16 | 0,01 – 0,5 | 0,2 – 4 |
| | 50% | 0,12 | 0,5 | 8 | 0,06 | 1 |
| | 90% | 0,5 | 0,5 | 16 | 0,12 | 2 |
| | GM | 0,16 | 0,36 | 6,1 | 0,06 | 1,03 |
| Rodrigues et al. (2014b) n = 22 | Intervalo | NT | 0,25 – 4 | 2 - >16 | NT | 1 – 8 |
| | 50% | NT | 1 | 16 | NT | 4 |
| | 90% | NT | 2 | >16 | NT | 4 |
| | GM | NT | NI | NI | NT | NI |
| Stopiglia et al. (2012) n = 13 | Intervalo | 0,12 – 0,5 | 0,06 – 2 | NT | 0,01 – 0,25 | 0,5 – 2 |
| | 50% | NI | NI | NT | NI | NI |
| | 90% | NI | NI | NT | NI | NI |
| | GM | 0,22 | 0,33 | NT | 0,07 | 1 |
| Oliveira, D. C. et al. (2011) n = 1 | Intervalo | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,25 | 0,5 |
| | 50% | NC | NC | NC | NC | NC |
| | 90% | NC | NC | NC | NC | NC |
| | GM | NC | NC | NC | NC | NC |
| Marimon et al. (2008b) n = 28 | Intervalo | 0,06 – 0,5 | 0,5 – 2 | 0,5 – 16 | 0,06 – 0,25 | 1 – 4 |
| | 50% | 0,125 | 0,5 | 4 | 0,06 | 2 |
| | 90% | 0,25 | 1 | 8 | 0,25 | 4 |
| | GM | 0,15 | 0,7 | 3,88 | 0,09 | 1,67 |

Ref.: referência bibliográfica, GM: média geométrica, NI: não informado, NT: não testado, NC: não calculado

Dentre os azólicos testados, VRC apresentou a menor eficácia *in vitro*, chegando a apresentar CIM igual ou superior a última concentração testada (8 µg/mL) para 67 amostras (39,88%). Tal resultado é compatível com levantamentos anteriores, onde este triazólico de segunda geração encontra-se sempre listado entre os fármacos menos eficazes para inibição do desenvolvimento de diversos membros do complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2008; OLIVEIRA, D. C., 2011; STOPIGLIA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; BORBA-SANTOS et al., 2015; BRILHANTE et al., 2016; MAHMOUDI et al., 2016). Com estrutura molecular similar ao fluconazol, ambos apresentaram baixa eficácia *in vitro* em análises prévias, sugerindo a ocorrência de resistência intrínseca em isolados deste complexo. Entretanto, a implementação terapêutica de fluconazol para tratamento da esporotricose já foi previamente relatada em paciente humano, alcançando 71% de cura para pacientes com

esporotricose linfocutânea (KAUFFMAN et al., 1996). Não existem estudos clínicos na medicina humana ou veterinária descrevendo a aplicação de VRC para o tratamento de esporotricose. Entretanto, com os resultados de CIM alcançados, sua utilização para o tratamento desta micose de implantação não é recomendada.

Inibindo enzimas do citocromo P450, os azólicos impedem a síntese de ergosterol, afetando diretamente a estrutura celular, bem como a atividade de diversas vias metabólicas do fungo (VANDEN BOSSCHE et al., 2003). Desta forma, mecanismos de resistência que impeçam a adequada atuação destes antifúngicos podem afetar diretamente a resposta terapêutica a outros fármacos da mesma classe. Embora não tenha sido verificada no presente relato, a ocorrência de resistência cruzada a azólicos, já foi previamente descrita em exemplares de *S. schenckii*, *S. pallida* e *S. luriei*, sendo motivo de preocupação e ampliando a necessidade de contínuas avaliações epidemiológicas (OLIVEIRA, D. C. et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014b).

Apresentando amplo intervalo entre os resultados mínimos e máximos de CIM, o poliênico AMB, é recomendado para o tratamento de quadros de esporotricose humana mais graves e associados a quadros de imunossupressão (KAUFFMAN et al., 2007). Contudo, poucos relatos descrevem a utilização deste antifúngico para o tratamento da esporotricose felina (GREMIÃO et al., 2015). Sendo pouco absorvido pelo trato gastrointestinal, sua administração é usualmente realizada pela via intravenosa (VANDEN BOSSCHE et al., 2003). A administração por esta via em pacientes felinos, está correlacionada a efeitos adversos. Contudo, sua aplicação pela via intralesional resultou na remissão clínica de 84,6% dos 26 felinos com lesão cutânea residual, após tratamento implementado com ITC (GREMIÃO et al., 2011). Sua aplicabilidade também foi comprovada em paciente felino, com lesão remanescente em plano nasal, após 9 meses de monoterapia com ITC. Três semanas de aplicação intralesional semanal foram suficientes para resolução do quadro (GREMIÃO et al., 2009). Conclui-se, a partir de dados *in vitro* e *in vivo*, que o desenvolvimento de protocolos terapêuticos envolvendo AMB são uma alternativa para quadros mais graves da esporotricose felina, bem como casos refratários a protocolo monoterápico de ITC ou associado a iodeto de potássio.

Com excelente capacidade de inibição do desenvolvimento fúngico, com CIM90 de 0,12 µg/mL e moda de 0,06 µg/mL, TRB apresentou a maior eficácia *in vitro*, dentre os cinco fármacos testados. Estudos que determinaram o perfil de suscetibilidade de isolados de *S. brasiliensis* frente a maior número de antifúngicos também destacaram os resultados superiores, obtidos por esta alilamina. Tal resultado não encontra-se restrito à espécie *S. brasiliensis*, sendo reportado também para outros componentes do complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2008; OLIVEIRA, D. C. et al., 2011). Entretanto, deve-se ressaltar que as características farmacodinâmicas e farmacocinéticas intrínsecas de cada fármaco fazem com que a comparação de eficácia baseada tão somente no CIM seja, muitas vezes, equivocada.

Estudos clínicos prévios em medicina humana comprovaram a eficácia da terbinafina para o tratamento da esporotricose cutânea ou linfocutânea, de acordo com a dose implementada (CHAPMAN et al., 2004; FRANCESCONI et al., 2009; FRANCESCONI et al., 2011). Contudo, sua resposta terapêutica em quadros sistêmicos da enfermidade, em modelos murinos, foram similares ao grupo de controle negativo (KAN et al., 1988). Em felinos experimentalmente infectados por *Microsporum canis* foi possível alcançar a cura clínica em doses mais elevadas deste fármaco (30-40 mg/kg/dia). Mesmo resultado não foi obtido em pacientes submetidos a dose inferior do fármaco (10-20 mg/kg/dia), demonstrando

novamente o efeito dose-dependente da terbinafina (KOTNIK, 2002). Para esporotricose felina, a eficácia desta medicação em protocolos terapêuticos ainda não é totalmente determinada. Recomenda-se a realização de estudos farmacodinâmicos e farmacocinéticos, bem como a execução de estudos clínicos controlados para confirmação dos dados verificados *in vitro*.

Sendo um ponto de constante preocupação na saúde pública, de modo geral, a pressão seletiva resultante da implementação prolongada de fármacos antimicrobianos pode resultar no surgimento e posterior disseminação de estirpes resistentes. A longo prazo, tal processo poderia acarretar na diminuição de opções terapêuticas na rotina clínica. O longo tratamento da esporotricose, somado a interrupção dos mesmos de forma inadequada por parte dos tutores, foram destacados como possíveis influenciadores neste processo seletivo (CHAVES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014b). Borba-Santos et al. (2015), ao compararem o perfil de suscetibilidade de isolados de *S. brasiliensis* anteriores a 2004, com exemplares de 2011-2012, demonstraram menor eficácia para ITC e posaconazol nas amostras mais recentes. Contudo, a determinação da suscetibilidade de exemplares de *S. brasiliensis* recuperados de pacientes humanos com esporotricose crônica, obtidos em diferentes momentos da evolução clínica, não evidenciaram modificações significativas nas CIMs. Tal achado questiona a relevância do tratamento implementado para o surgimento de estirpes resistentes e, até mesmo, a correlação entre os resultados *in vitro* e a resposta clínica verificada (ALMEIDA-PAES et al., 2016). Nossos achados não evidenciaram alterações relevantes na suscetibilidade das cepas, ao avaliarmos cada ano de forma individual (Tabelas 6-10). Ao considerarmos ainda a ocorrência de população fúngica com baixa variabilidade genética, a ausência de cepas resistentes a ITC dentre as 168 amostras testadas corrobora a suspeita levantada por Almeida-Paes et al. (2016), uma vez que este fármaco vem sendo amplamente utilizado na rotina clínica veterinária e humana.

De modo geral, verificou-se que baixas concentrações dos fármacos usualmente utilizados são suficientes para promover a inibição no desenvolvimento de *S. brasiliensis*. Contudo, sabe-se que irresponsividade a terapêutica implementada e recidivas são constantes na rotina clínica veterinária (GREMIÃO et al., 2015). Um dos pontos que poderiam justificar tal discrepância entre as respostas *in vitro* e *in vivo* é o termodimorfismo característico deste grupo de fungos patogênicos (CRUZ, 2013). Mudanças estruturais ocorrem na composição da parede celular, bem como em outros pontos da célula fúngica, entre as fases unicelular e filamentosa de fungos dimórficos (HOGAN & KLEIN, 1994). Assim sendo, a utilização da fase filamentosa deste micro-organismo para realização do teste de sensibilidade poderia justificar a ineficiência do teste para prever a resposta *in vivo*. Os presentes resultados foram alcançados a partir do documento M38-A2 (CLSI, 2008), que preconiza a utilização desta morfologia na realização de testes de suscetibilidade a antifúngicos para *S. schenckii*. Contudo, estudos comparativos realizados por outros autores evidenciaram que, de modo geral, as CIMs necessárias para a inibição da fase leveduriforme do agente são ainda inferiores as obtidas para fase micelial (TRILLES et al., 2005; BORBA-SANTOS et al., 2015; MAHMOUDI et al., 2016).

Outro fator que poderia interferir diretamente na resposta terapêutica inadequada ao tratamento da esporotricose felina, mesmo em exemplares fúngicos apresentando baixo CIM, consiste na ação fungistática de grande parte dos fármacos antifúngicos frente a isolados de *Sporothrix* spp (TRILLES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2014b; BORBA-SANTOS et al., 2015). Este tipo de ação faz com que o sistema imunológico do hospedeiro tenha maior relevância na eliminação do agente infeccioso, diferente do que é usualmente requerido para fármacos fungicidas (GRAYBILL, J. R., et al., 1997). Todavia, os quadros clínicos mais

graves desta enfermidade em felinos, somados a grande quantidade de estruturas fúngicas visualizadas em análises citológicas e histopatológicas, indicam limitações do sistema imunológico desta espécie animal (MIRANDA et al., 2013; GREMIÃO et al., 2015; SILVA et al., 2015; MIRANDA et al., 2016).

A partir deste levantamento epidemiológico, utilizando 168 exemplares fúngicos de *S. brasiliensis*, oriundos da atual epidemia instalada no estado do RJ, podemos sugerir que as falhas terapêuticas verificadas na rotina clínica veterinária nesta região estão desassociadas da ocorrência de estirpes resistentes. Assim, faz-se necessária a realização de estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos de antifúngicos como ITC, TRB e AMB, bem como melhor compreensão acerca das limitações imunológicas da espécie felina. O desenvolvimento de novos protocolos e medidas interventivas mais eficazes na medicina veterinária refletirão diretamente na saúde-pública, auxiliando no controle desta importante zoonose.

6 CONCLUSÕES

- A espécie *Sporothrix brasiliensis* apresenta predomínio dentre os casos de esporotricose felina e canina oriundos de diversas regiões do estado do Rio de Janeiro;
- A caracterização fenotípica de componentes do complexo *Sporothrix schenckii* podem resultar em identificações incorretas, não devendo ser realizada dissociada de metodologias genotípicas;
- A técnica de PCR-RFLP, a partir do gene responsável pela síntese de calmodulina, apresenta excelente aplicabilidade para estudos epidemiológicos envolvendo membros do complexo *Sporothrix schenckii*;
- Terbinafina foi o antifúngico mais eficaz para inibição do desenvolvimento *in vitro* de *Sporothrix brasiliensis*, apresentando potencial para utilização em casos clínicos;
- Dentre os azólicos, itraconazol e cetoconazol demonstraram elevada capacidade de inibição de exemplares de *Sporothrix brasiliensis*, diferente do que foi observado com voriconazol;
- Anfotericina B demonstrou amplo intervalo entre as concentrações inibitórias mínimas e máximas obtidas, podendo, desta forma, apresentar respostas terapêuticas variáveis de acordo com a cepa fúngica envolvida.
- Resistência ao antifúngico itraconazol não parece ser a principal razão para falhas terapêuticas e recidivas de esporotricose em animais, estando estas ocorrências possivelmente relacionadas a múltiplos fatores.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHEARN, D. G.; KAPLAN, W. Occurrence of *Sporothrix schenckii* on a cold-stored meat product. **American Journal of Epidemiology**, v. 89, p. 116-124, 1969.
- ALMEIDA-PAES, R.; FIGUEIREDO-CARVALHO, M. H. G.; BRITO-SANTOS, F.; ALMEIDA-SILVA, F.; OLIVEIRA, M. M. E.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. **PLOS One**, v. 11, n. 3, e0152796, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 554-62, 2009.
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 9, e3094, 2014
- ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; FREITAS, D. F. S.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to *in vivo* resistance. **Medical Mycology**, 2016. No prelo
- ANDES, D. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antifungals. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, p. 679-697, 2006.
- ARRILLAGA-MONCRIEF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; KANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- BARBEE, M. L.; TAYLOR, J. W. 18S Ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 87, 91, 1992.
- BARONI, F. A.; CAMPOS, S. G.; DIREITO, G. M. Esporotricose em gatos (Descrição de um caso). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 25-27, 1998.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a serie of cases. **Clinical Infectious Disease**, v. 38, p. 529-535, 2004.
- BARROS, M. B. L.; 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.; SCHUBACH, T. M. P.; GALHARDO, M. C. G.; SCHBACH, A. O.; MONTEIRO, P. C. F.; REIS, R. S.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; LAZÉRA, M. S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T. C. M.; MARZOCHI, K. B. F.; WANKE, B.; VALLE, A. C. F. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.

- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, T. P.; COLL, J. O.; GREMIÃO, I. D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 455-460, 2010.
- BARTROLI, J.; TURMO, E.; ALGUÉRO, M.; BONCOMPTE, E.; VERICAT, M. L.; GARCÍA-RAFANELL, J.; FORN, J. Synthesis and antifungal activity of new azole derivatives containing an *N*-acylmorpholine ring. **Journal of Medical Chemistry**, v. 38, p. 3918-3932, 1995.
- BAZZI, T.; MELO, S. M. P.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 303-311, 2016.
- BORBA-SANTOS, L. P.; RODRIGUES, A. M.; GAGINI, T. B.; FERNANDES, G. F.; CASTRO, R.; CAMARGO, Z. P.; NUCCI, M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; ISHIDA, K.; ROZENTAL, S. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles and terbinafine. **Medical Mycology**, v. 53, p. 178-188, 2015.
- BOYCE, K. J.; ANDRIANOPOULOS, A. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized adaptation allowing colonization of a host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 6, p. 797-811, 2015.
- BRILHANTE, R. S. N.; RODRIGUES, A. M.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; CAMARGO, Z. P. *In vitro* susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 275-279, 2016.
- BUNCE, P. E.; YANG, L.; CHUN, S.; ZHANG, S. X.; TRINKAUS, M. A.; MATUKAS, L. M. Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. **Medical Mycology**, v. 50, p. 197-201, 2012.
- CAMACHO, E.; LEÓN-NAVARRO, I.; RODRÍGUEZ-BRITO, S.; MENDOZA, M.; NIÑO-VEJA, G. A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 94, p. 1-10, 2015.
- CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virolume for humans. **Microbe**, v. 1, n. 8, p. 359-364, 2006.
- CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; MOCHIZUKI, T.; LI, S. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 3-14, 2015.
- CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P.; KAUFFMANN, C.; SMITH, E. B.; DIETZE, R.; TIRABOSCHI-FOSS, N.; RESTREPTO, A.; BUSTAMANTE, A. B.; OPPER, C.; EMADY-AZAR, S.; BAKSHI, R. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, v. 47, p. 62-68, 2004.
- CHARMICHAEAL, J. W. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, p. 1137-1173, 1962.
- CHAVES, A. R.; CAMPOS, M. P.; BARROS, M. B. L.; CARMO, C. N.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Treatment abandonment in feline sporotrichosis – Study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**, v. 60, p. 149-153, 2013

- CHOWDHARY, G.; WEINSTEIN, A.; KLEIN, R.; MASCARENHAS, B. R. Sporotrichal arthritis. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 50, p. 112-114, 1991.
- CHUA, S. S.; MOMANY, M.; MENDOZA, L.; SZANISZLO, P. J. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen *Sporothrix schenckii*. **Current Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 151-156, 1994.
- CLAVIJO-GIRALDO, D. M.; MATÍNEZ-ALVAREZ, J. A.; LOPES-BEZERRA, L. M.; PONCE-NOYOLA, P.; FRANCO, B.; ALMEIDA, R. S.; MORA-MONTES, H. M. Analysis of *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* virulence in *Galleria mellonella*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 122, p. 73-77, 2016.
- 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.
- CONIAS, S.; WILSON, P. Epidemic cutaneous sporotrichosis: report of 16 cases in Queensland due to mouldy hay. **Australasian Journal of Dermatology**, v. 39, n. 1, p. 34-37, 1998.
- COOPER, C. R.; DIXON, D. M.; SALKIN, I. F. Laboratory-acquired sporotrichosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, p. 169-171, 1992.
- COSTA, E. O.; DINIZ, L. S.; NETTO, C. F.; ARRUDA, C.; DAGLI, M. L. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin America wild mammals, São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 125, n. 1, p. 19-22, 1994.
- CROTHERS, S. L.; WHITE, S. D.; IHRKE, P. J.; AFFOLTER, V. K. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 249-259, 2009.
- CROUT, J. E.; BREWER, N. S.; TOMPKINS, R. B. Sporotrichosis arthritis: clinical features in seven patients. **Annals of Internal Medicine**, v. 86, p. 294-297, 1977.
- CRUZ, L. C. H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão da parte de literatura e considerações sobre o diagnóstico e epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, p. 8-28, 2013.
- CRUZ, L. C. H.; ROSA, C. A. R.; BAFFA, M. C.; CAMPOS, S. G. Isolamento do *Sporothrix schenckii* em gatos com lesões ulcerativas. In: 12º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA E 9º CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA, 1983, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Latino-Americana de Microbiologia; Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983. p. 124.
- 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 ARAUJO, T. A.; MARQUES, A. C.; KERDEL, F. Sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 737-742, 2001.

- 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 BEER, Z. W.; HARRINGTON, T. C.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD, M. J. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 434-441, 2003.
- DE MEYER, E. M.; BEER, Z. W.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood-and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, n. 4, p. 647-661, 2008.
- DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, p. 113-116, 1989.
- ENGLE, J.; DESIR, J.; BERNSTEIN, J. M. A rose bt any other name. **Skinmed**, v. 6, n. 3, p. 139-141, 2007.
- FERNANDES, K. S.; MATHEWS, H. L.; BEZERRA, L. M. L. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, p. 195-203, 1999.
- FINDLAY, G. H. The epidemiology of sporotrichosis in the Transvaal. **Medical Mycology**, v. 7, n. 3, 1969.
- FRANCESCONI, G.; VALLE, A. C. F.; PASSOS, S. L.; BARROS, M. B. L.; PAES, R. A.; CURI, A. L. L.; LIPORAGE J.; PORTO, C. F.; GALHARDO, M. C. G. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, p. 349-354, 2011.
- FRANCESCONI, G.; VALLE, A. C.; PASSOS, S.; REIS, R.; GALHARDO, M. C. Terbinafine (250 mg/day): na effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, 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.; SANTOS, S. S.; ALMEIDA-PAES, R.; OLIVEIRA, M. M. E.; VALLE, A. C. F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; NOSANCHUK, J. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2015.
- FUKUSHIRO, R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. **Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene**, v. 254, p. 228-233, 1984.
- GEWEHR, P.; JUNG, B.; AQUINO, V.; MANFRO, R. C.; SPULDARO, F.; ROSA, R. G.; GOLDANI, R. Z. Sporotrichosis in renal transplant patients. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, v. 24, n. 2, p. e47-e49, 2013.

- GHOSH, A.; MAITY, P. K.; HEMASHETTAR, B. M.; SHARMA, V. K.; CHAKRABARTI, A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 449, n. 45, p. 449-454, 2002.
- GOIC, J. B.; REINEKE, E. L.; DROBATZ, K. J. Comparison of rectal and axillary temperatures in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 10, p. 1170-1175, 2014.
- GOMPERTZ, O. F.; RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; BENTUBO, H. D. L.; CAMARGO, Z. P.; PÉTRI, V. Case report: Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globose* resistant to itraconazole. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1218-1222, 2016.
- GOTTLIEB, G. S.; LESSER, C. F.; HOLMES, K. K.; WALD, A. Disseminated sporotrichosis associated with treatment with immunosuppressants and tumor necrosis factor- α antagonists. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p. 838-840, 2003.
- GRAYBILL, J. R.; BURGESS, D. S.; HARDIN, T. C. Key issues concerning fungistatic versus fungicidal drugs. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 16, n. 1, p. 42-50, 1997.
- GREER, N. D. Voriconazole: the newest triazole antifungal agent. **Pharmacology Notes**, v. 16, p. 241-248, 2003.
- GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C.; SCHUBACH, T. M. P.; FIGUEIREDO, A. B. F.; CAVALCANTI, M. C. H.; PEREIRA, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2014.
- GREMIÃO, I. D. F.; MIRANDA, L. H. M.; REIS, E. G.; RODRIGUES, A. M.; PEREIRA, S. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, e1006077, 2017.
- GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; FIGUEIREDO, F. B.; JUNIOR, A. N.; SANTOS, I. B.; SCHUBACH, T. M. P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 2, p. 221-223, 2006.
- GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; HONSE, C. O.; BARROS, M. B. L. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, p. 346-351, 2011.
- GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; RODRIGUES, A. M.; CHAVES, A. R.; BARROS, M. B. L. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localized sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, p. 720-723, 2009.
- GROLL, A.; KOLVE, H. Antifungal agents: In vitro susceptibility testing, pharmacodynamics, and prospects for combination therapy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 256-270, 2004.
- GROTTE, M.; YOUNGER, B. Sporotrichosis associated with sphagnum moss exposure. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 105, p. 50-51, 1981.

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

GULLBERG, R. M.; QUINTANILLA, A.; LEVIN, M. L.; WILLIAMS, J.; PHAIR, J. P. Sporotrichosis: recurrent cutaneous, articular and central nervous system infection in a renal transplant recipient. **Reviews of Infectious Disease**, v. 9, p. 369-375, 1987.

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, p. 919-934, 2013.

HAN, H. S.; KANO, R.; CHEN, C.; NOLI, C. Comparison of two *in vitro* antifungal sensitivity tests and monitoring during therapy of *Sporothrix schenckii sensu stricto* in Malaysian cats. **Veterinary Dermatology**, v. 28, p. 156-160, 2017.

HEKTOEN, L.; PERKINS, M. D. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 5, p. 77-91, 1899.

HIRANO, M.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; KANO, R.; YANAI, T.; YAMAZOE, K.; FUKATA, T.; KUDO, T. A case of feline sporotrichosis. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 283-284, 2006.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S. Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 3543-3546, 1994.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence Factors of Medically Important Fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.

HONSE, C. O.; RODRIGUES, A. M.; GREMIÃO, I. D. F.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Record**, v. 166, n. 7, p. 208-209, 2010.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of Clinical Fungi**. 2ed. The Netherlands and Spain: Centraalbureau voor Schimmelcultures / Universitat Rovira i Virgili, 2001. 1126 p.

HU, S.; CHUNG, W. H.; HUNG, S. I.; HO, H. C.; WANG, Z. W.; CHIEN, C. H.; LU, S. C.; KUO, T. T.; HONG, H. S. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1414-1418, 2003.

JOHNSON, E. M.; SZEKELY, A.; WARNOCK, D. W. In-vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin B against filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, p. 741-745, 1998.

KAN, V. L.; BENNETT, J. E. Efficacies of four antifungal agents in experimental murine sporotrichosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n.11, p. 1619-1623, 1988.

KANO, R.; MATSUOKA, A.; KASHIMI, M.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; MIZOGUCHI, M.; HASEGAWA, A. Detection of *Sporothrix schenckii* chitin synthase 1 (*CHS1*) gene in biopsy specimens from human patients with sporotrichosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, p. 73,74, 2003.

KANO, R.; WATANABE, K.; MURAKAMI, M.; YANAI, T.; HASEGAWA, A. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 156, p. 484-485, 2005.

KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, p. 231-237, 1999.

KAUFFMAN, C. A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S. W.; PAPPAS, P. G. Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis: 2007 Update by Infectious Disease Society of America. **Clinical Infectious Disease**, v. 45, p. 1255-1265, 2007.

KAUFFMAN, C. A.; PAPPAS, P. G.; MCKINSEY, D. S.; GREENFIELD, R. A.; PERFECT, J. R.; CLOUD, G. A.; THOMAS, C. J.; DISMUKES, W. E. Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, p. 46-50, 1996.

KAZANAS, N. Foodborne *Sporothrix schenckii*: Infectivity for mice by intraperitoneal and intragastric inoculation with conidia. **Mycopathologia**, v. 95, p. 3-16, 1986.

KLEIN, B. S.; TEBBETS, B. Dimorphism and virulence in fungi. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 314-319, 2007.

KOTNIK, T. Drug efficacy of terbinafine hydrochloride (Lamisil®) during oral treatment of cats, experimentally infected with *Microsporium canis*. **Zoonoses and Public Health**, v. 49, n. 3, p. 120-122, 2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts: A taxonomic study**. 5ed. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 87-110.

KWON-CHUNG, K. J.; POLACHECK, I.; POPKIN, T. J. Melanin-lacking mutants of *Cryptococcus neoformans* and their virulence for mice. **Journal of Bacteriology**, v. 150, p. 1414-1421, 1982.

KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. **The Journal of Infectious Disease**, v. 139, p. 424-431, 1979.

LARSSON, C. E. Esorotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LASS-FLORL, C. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. **Drugs**, v. 71, n. 18, p. 2405-2419, 2011.

LIMA, O. C.; BOUCHARA, J. P.; RENIER, G.; MAROT-LEBLOND, A.; CHABASSE, D.; LOPES-BEZERRA, L. M. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, p. 131-140, 2004.

LIU, G. Y.; NIZET, V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 406-413, 2009.

LIU, T.; ZHANG, K.; ZHOU, X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)**, v. 15, n. 1, p. 100-108, 2014.

- LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 433-450, 1907.
- MACEDO, P. M.; LOPES-BEZERRA, L. M.; BERNARDES-ENGEMANN, A. R.; OROFINO-COSTA, R. New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 4, p. 719-724, 2015.
- MACKINNON, J. E.; CONTI DÍAZ, I. A. The effect of temperature on sporotrichosis. **Sabouraudia**, v. 2, p. 1956-1959, 1962.
- MACKINNON, J. E.; CONTÍ-DIAS, I. A.; GEZUELE, E.; CILIVA, E.; LUZ, S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature considerations on its pathogenicity and ecology. **Sabouraudia**, v. 7, p. 38-45, 1969.
- MAGAND, F.; PERROT, J. L.; CAMBAZARD, F.; RABERIN, M. H.; LABELLE, B. Sporotrichose cutanée autochtone française. **Annales de dermatologie et de vénéréologie**, v. 136, p. 273-275, 2009.
- MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P.; SAFARA, M.; HEIDARI, M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, v. 54, n. 6, p. 593-599, 2016.
- MALIK, R.; VOGELNEST, L.; O'BRIEN, C. R.; WHITE, J.; HAWKE, C.; WIGNEY, D. I.; MARTIN, P.; NORRIS, J. M. Infections and some other conditions affecting the skin and subcutis of the naso-ocular region of cats – Clinical experience 1987-2003. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 6, n. 6, p. 383-390, 2004.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D. A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *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.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.
- MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, p. 621-625, 2008a.
- MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, 2008b.
- MAUDY, T. H.; VAN DER VEGTE, W. H. Ultrastructure of septa in *Blastobotrys* and *Sporothrix*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 51, p. 121-128, 1985.
- MCGINNIS, M. R.; NORDOFF, N.; LI, R. K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D. W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Medical Mycology**, v. 39, p. 369-371, 2001.
- MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G. S.; PAINTER, A.; TRAVIS, S. Morphogenesis and pathogenicity of *Histoplasma capsulatum*. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 6, p. 1355-1358, 1987.

- MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; SANTIN, R.; BRUM, C. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. 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.
- MESA-ARANGO, A. C.; REYES-MONTES, M. R.; PÉREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 3004-3011, 2002.
- MEYER, E. M.; SUMMERBELL, R. C.; MOHARRAM, A. M.; HOOG, G. S.; VISMER, H. F.; WINGFIELD, M. J. Taxonomy and phylogeny of new wood and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 100, n. 4, p. 647-661, 2008.
- MEYER, W.; CASTAÑEDA, A.; JACKSON, S.; HUYNH, M.; CASTAÑEDA, E. Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emergent Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189-195, 2003.
- MILLER, S. D.; KEELING, J. H.; Ant sting sporotrichosis. **Cutis**, v. 69, p. 439-442, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria 1.271 de 06 de junho de 2014. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2014/prt1271_06_06_2014.html. Acesso em 28 fev. 2017.
- MIRANDA, L. H. M.; SANTIAGO, M. A.; SCHUBACH, T. M. P.; MORGADO, F. N.; PEREIRA, S. A.; OLIVEIRA, R. V. C.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4⁺ cells. **Medical Mycology**, v. 54, n. 1, p. 29-39, 2016.
- MIRANDA, L. H.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; QUINTELLA, L. P.; KURAIEM, B. P.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. 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.; QUINTELLA, L. P.; SANTOS, I. B.; MENEZES, R. C.; FIGUEIREDO, F. B.; GREMIÃO, I. D. F.; OKAMOTO, T.; OLIVEIRA, R. V. C.; PEREIRA, S. A.; TORTELLY, R.; SCHUBACH, T. M. P. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). **Mycopathologia**, v. 168, n. 2, p. 79-87, 2009.
- MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A. M.; DIAS, M. A. G.; SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 10, 269, 2014.
- MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMES, B. L.; AISEN, P.; HAY, R. J.; NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A. J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.71, n. 7, p. 4026-4033, 2003.

NORIEGA, C. T. R. R.; GUARAY, R. R.; SABANERO, G.; BASURTO, R. T.; LÓPEZ, M. S. *Sporothrix schenckii*: culturas em diferentes suelos. **Revista Latinoamericana de Micología**, v. 35, p. 191-194, 1993.

O'DONNELL, K.; NIRENBERG, H. I.; AOKI, T.; CIGELNIK, E. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. **Mycoscience**, v. 41, p. 61-78, 2000.

O'REILLY, L. C.; ALTMAN, S. A. Macrorestriction analysis of clinical and environmental isolates of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 7, p. 2547-2552, 2006.

OLIVEIRA, D. C.; LORETO, E. S.; MARIO, D. A. N.; LOPES, P. G. M.; NEVES, L. V.; ROCHA, M. P.; SANTÚRIO, J. M.; ALVES, S. H. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 3047-3049, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, p. 257-267, 2011.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n.1, p. 2-6, 2014.

OLIVEIRA, M. M. E.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; BARROS, M. B. L.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: Case report. **Mycopathologia**, v. 169, p. 359-363, 2010.

OLIVEIRA, M. M. E.; FRANCO-DUARTE, R.; ROMEO, O.; PAIS, C.; CRISEO, G.; SAMPAIO, P.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M.; POEGGELER, S. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 6, p. fnv027, 2015.

OLIVEIRA, M. M. E.; SAMPAIO, P.; ALMEIDA-PAES, R.; PAIS, C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R. M. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2159-2162, 2012.

PAPPAS, P. G.; TELEZ, I.; DEEP, A. E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; BOECHAT, J. S.; VIANA, P. G.; SCHUBACH, T. M. P. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 3, p. 292-293, 2014.

PEREIRA, S. A.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, J. N.; HONSE, C. O.; FIGUEIREDO, F. B.; SILVA, D. T.; KITADA, A. A. B.; REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M.

P. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 13, p. 220-223, 2011.

PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P.; GREMIÃO, I. D. F.; SILVA, D. T.; FIGUEIREDO, F. B.; ASSIS, N. V.; PASSOS, S. R. L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 4, p. 311-321, 2009.

PEREIRA, S. A.; PASSOS, S. R. L.; SILVA, J. N.; GREMIÃO, I. D. F.; FIGUEIREDO, F. B.; TEIXEIRA, J. L.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Records**, v. 166, n. 10, p. 290-294, 2010.

PETERSEN, R. H.; HUGHES, K. W. Species and speciation in mushrooms: development of a species concept poses difficulties. **Bioscience**, v. 49, p. 440-452, 1999.

PEYTON, L. R.; GALLAGHER, S.; HASHEMZADEH, M. Triazole antifungals: A review. **Drugs of Today**, v. 51, n. 12, p. 705-718, 2015.

PLUSS, J. L. D. O.; OPAL, S. M. M. D. Pulmonary sporotrichosis: review of treatment and outcome. **Medicine (Baltimore)**, v. 65, p. 143-153, 1986.

POWELL, K. E.; TAYLOR, A.; PHILLIPS, B. J.; BLAKEY, D. L.; CAMPBELL, G. D.; KAUFMAN, L.; KAPLAN, W. Cutaneous sporotrichosis in forestry workers. Epidemic due to contaminated Sphagnum moss. **Journal of American Medical Association**, v. 240, n. 3, p. 232-235, 1978.

QUEIROZ-TELLES, F.; NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; TOBÓN, A.; RESTREPO, A. Mycoses of implantation in Latin America: an overview of epidemiology, clinical manifestation, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 49, n. 3, p. 225-236, 2011.

RAPPLEYE, C. A.; ENGLE, J. T.; GOLDMAN, M. E. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. **Molecular Microbiology**, v. 53, p. 153-165, 2004.

READ, S. I.; SPERLING, L. C. Feline sporotrichosis. Transmission to man. **Archives of Dermatology** v., 118, p. 429-431, 1982.

REIS, E. G.; GREMIÃO, I. D. F.; KITADA, A. A. B.; ROCHA, R. F. D. B.; CASTRO, V. S. P.; BARROS, M. B. L.; MENEZES, R. C.; PEREIRA, S. A.; SCHUBACH, T. M. P. Potassium iodine capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, 399-404, 2012.

REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; SILVA, J. N.; CARVALHO, B. W.; QUINTANA, M. S. B.; GREMIÃO, I. D. F. 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.

REIS, R. S.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; TAVARES, P. M. S.; MONTEIRO, P. C. F.; SCHUBACH, T. M. P.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. Molecular characterization of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 5, p. 769-774, 2009.

RIO DE JANEIRO (Estado). Resolução nº 647, de 12 de junho de 2013. Redefine a relação de doenças e agravos de notificação compulsória no âmbito do Estado do Rio de Janeiro. **Diário Oficial**, RJ, 16 jul. 2013.

ROBERTO, T. N.; RODRIGUES, A. M.; HAHN, R. C.; CAMARGO, Z. P. Identifying *Paracoccidioides* phylogenetic species by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene. **Medical Mycology**, v. 54, n. 3, p. 240-247, 2015.

ROCHETTE, F.; ENGELN, 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.; CRUZ-CHOAPPA, R.; FERNANDES, G. F.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales) a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, p. 246-264, 2016a.

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

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 12, e0004190, 2015.

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, e1005638, 2016b.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; PIRES, D. C.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; GADELHA, M. F.; COLOMBO, A. L.; CAMARGO, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 14, 219, 2014b.

RODRIGUES, A. M.; HOOG, G. S.; ZHANG, Y.; CAMARGO, Z. P. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infection**, v. 3, e32, 2014c.

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

RODRIGUES, A. M.; TEIXEIRA, M. M.; HOOG, G. S.; SCHUBACH, T. M. P.; PEREIRA, S. A.; FERNANDES, G. F.; BEZERRA, L. M. L.; FELIPE, M. S.; CAMARGO, Z. P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, e2281, 2013b.

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, n. 3, p. 179-186, 2011.

- SANCHOTENE, K. O.; MADRID, I. M.; KLAFKE, G. B.; BERGAMASHI, M.; TERRA, P. P. D.; RODRIGUES, A. M.; CAMARGO, Z. P.; XAVIER, M. O. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, v. 58, p. 652-658, 2015.
- SANDHU, G. S.; KLINE, B. C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, 1995.
- SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to sporotrichia. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 9, p. 286-290, 1898.
- SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em gatos e cães – revisão. **Clínica Veterinária**, v. 29, p. 21-24, 2000.
- SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R. S.; MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Records**, v. 152, n. 6, p. 172-175, 2003.
- SCHUBACH, T. M.; MENEZES, R. C.; WANKE, B. Sporotrichosis. In: GREENE, C.E. (Ed.) **Infectious diseases of the dog and cat**. 4ed. Missouri: Elsevier, 2012. p. 645-650.
- SCHUBACH, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; REIS, R. S.; PEREZ, M. A.; WANKE, B. 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, T. M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M. B. L.; FIGUEIREDO, F. B.; CUZZI-MAYA, T.; PEREIRA, S. A.; SANTOS, I. B.; ALMEIDA-PAES, R.; PAES-LEME, L. R.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.
- SHEENAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.
- SILVA, J. N.; PASSOS, S. R. L.; MENEZES, R. C.; GREMIÃO, I. D. F.; SCHUBACH, T. M. P.; OLIVEIRA, J. C.; FIGUEIREDO, A. B. F.; PEREIRA, S. A. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, p. 1-5, 2015.
- SILVA, M. B. T.; COSTA, M. M. M.; TORRE, C. C. S.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; VALLE, A. C. F.; MAGALHÃES, M. A. F. M.; SABROZA, P. C.; OLIVEIRA, R. M. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.
- SINGER, J. I.; MUNCIE, J. E. Sporotrichosis: etiologic considerations and report of additional cases from New York. **New York State Journal of Medicine**, v. 52, p. 2147-2153, 1952.
- SONG, Y.; LI, S. S.; ZHONG, S. X.; LIU, Y. Y.; YAO, L.; HUO, S. S. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, p. 313-318, 2013.

SOUZA, C. P.; LUCAS, R.; RAMADINHA, R. H. R.; PIRES, T. B. C. P. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 2, p. 137-143, 2015

SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nail of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 372-374, 2006.

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.

STOPIGLIA, C. D. O.; MAGAGNIN, C. M.; CASTRILLÓN, M. R.; MENDES, S. D. C.; HEIDRICH, D.; VALENTE, P.; SCROFERNEKER, M. L. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v. 52, p. 56-64, 2014.

STOPIGLIA, C. D. O.; MARCHESE, D. P.; HEIDRICH, D.; SORRENTINO, J. M.; VIEIRA, F. J.; SCROFERNEKER, M. L. Comparison between two culture media for *in vitro* evaluation of antifungal susceptibility of the *Sporothrix schenckii* complex. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 87, n. 4, p. 561-565, 2012.

TAKEDA, Y.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. **Mycopathologia**, v. 116, n. 1, p. 9-14, 1991.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M. S.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. O.; ALMEIDA-PAES, R.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3952-3954, 2005.

VANDER BOSSCHE, H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 5-29, 2003.

WANG, Y.; AISEN, P.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* melanin and virulence mechanism of action. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3131-3136, 1995.

WATANABE, M.; HAYAMA, K.; FUJITA, H.; YAGOSHI, M.; YARITA, K.; KAMEI, K.; TERUI, T. A case of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Japan. **Annals of Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 251-252, 2016.

WILLEMS, L.; VAN DER GEEST, R.; DE BEULE, K. Itraconazole oral solution and intravenous formulations: a review of pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics**, v. 26, n. 3, p. 159-169, 2001.

YU, X.; WAN, Z.; ZHANG, Z.; LI, F.; LI, R.; LIU, X. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, p. 67-74, 2013.

ZHAO, M.; ZHOU, X.; LIU, T.; YANG, Z. Morphological and physiological comparison of taxa comprising the *Sporothrix schenckii* complex. **Journal of Zhejiang University - Science B**, v. 16, n. 11, p. 940-947, 2015.

ZHOU, X.; RODRIGUES, A. M.; FENG, P.; HOOG, G. S. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, v. 66, p. 153-165, 2014.

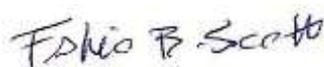
ANEXO A



Seropédica 18 de dezembro de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 135/2014 intitulado **“CARACTERIZAÇÃO FENOGENOTÍPICA E SENSIBILIDADE A ANTIFÚGICOS DE ISOLADOS CLÍNICOS VETERINÁRIOS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii*.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária, Francisco de Assis Baroni. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 18 de dezembro de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.



Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV



Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador CEUA-IV

ANEXO B

Receita para confecção de *Corn Meal Agar* (CMA)

| | |
|---------------------------|---------|
| - Milho fragmentado | 42 g |
| - H ₂ O q.s.p. | 1000 mL |
| - Agar-agar | 18 g |

- 1) Manter o milho fragmentado em H₂O a 60 °C durante 1 h;
- 2) Utilizando papel filtro, realizar a separação dos fragmentos de milho;
- 3) Acrescentar o agar-agar no filtrado, fundindo com auxílio de calor;
- 4) Completar o volume para 1000 mL e posteriormente autoclavar a 120 °C durante 15 min.

ANEXO C

Anexo C - Caracterização dos exemplares utilizados quanto ao registro geral (RG), espécie animal, raça, sexo e idade

| RG | CÓDIGO | ESPÉCIE | RAÇA | SEXO | IDADE |
|-----------|---------------|----------------|-------------------|-------------|--------------|
| 2012026 | 1 | FEL | SRD | M | 4a |
| 2012030 | 2 | CAN | Dogue Alemão | F | 6a |
| 2012035 | 3 | FEL | - | F | |
| 2012037 | 4 | CAN | Poodle | M | 11a |
| 2012052 | 5 | FEL | SRD | F | |
| 2012056 | 6 | CAN | SRD | F | 7a |
| 2012064 | 7 | FEL | SRD | - | 2a |
| 2012078 | 8 | FEL | - | M | |
| 2012086 | 9 | FEL | SRD | F | 6a |
| 2012087 | 10 | FEL | - | M | 1a |
| 2012109 | 11 | FEL | - | F | 3a |
| 2012110 | 12 | CAN | Dachshund | F | 7a |
| 2012135 | 13 | CAN | Labrador | M | |
| 2012140 | 14 | FEL | Siamês | M | 7a |
| 2012151 | 15 | FEL | - | M | |
| 2012156 | 16 | FEL | - | - | |
| 2012171 | 17 | CAN | Yorkshire Terrier | M | |
| 2012175 | 18 | FEL | SRD | F | 1a10m |
| 2012176 | 19 | CAN | SRD | M | |
| 2012190 | 20 | FEL | SRD | M | |
| 2012199 | 21 | FEL | SRD | F | 4a |
| 2012214 | 22 | FEL | SRD | - | |
| 2012230 | 23 | FEL | SRD | M | |
| 2012231 | 24 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2012234 | 25 | FEL | SRD | M | 10a |
| 2012240 | 26 | FEL | SRD | M | 9a |
| 2012242 | 27 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2012256 | 28 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2013001 | 29 | FEL | SRD | M | 7a |
| 2013002 | 30 | FEL | SRD | - | |
| 2013010 | 31 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2013016 | 32 | FEL | SRD | M | 1a2m |
| 2013020 | 33 | FEL | SRD | M | |
| 2013022 | 34 | FEL | SRD | F | 2m |
| 2013028 | 35 | FEL | - | M | 9a |
| 2013032 | 36 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2013033 | 37 | FEL | SRD | F | |
| 2013043 | 38 | FEL | - | M | 1a |
| 2013058 | 39 | FEL | Siamês | F | 2a |
| 2013061 | 40 | FEL | SRD | F | 2a |

Continua

Anexo C - Continuação

| | | | | | |
|---------|----|-----|-------------------|---|-----|
| 2013072 | 41 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2013075 | 42 | CAN | Pinscher | F | 4a |
| 2013080 | 43 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2013084 | 44 | FEL | SRD | - | |
| 2013089 | 45 | CAN | Pastor Canadense | M | 8a |
| 2013102 | 46 | FEL | - | - | |
| 2013107 | 47 | CAN | Poodle | F | 4a |
| 2013112 | 48 | CAN | - | M | |
| 2013113 | 49 | FEL | SRD | M | 4a |
| 2013116 | 50 | FEL | SRD | M | 9a |
| 2013122 | 51 | FEL | SRD | M | 5a |
| 2013138 | 52 | FEL | SRD | F | 1a |
| 2013143 | 53 | CAN | Yorkshire Terrier | M | 11a |
| 2013144 | 54 | FEL | SRD | F | 6m |
| 2013149 | 55 | FEL | SRD | F | |
| 2013150 | 56 | FEL | SRD | F | 6a |
| 2013175 | 57 | FEL | SRD | F | 11m |
| 2013179 | 58 | FEL | SRD | M | 8a |
| 2013180 | 59 | FEL | SRD | F | 1a |
| 2013181 | 60 | FEL | SRD | F | |
| 2013187 | 61 | FEL | - | M | |
| 2013188 | 62 | CAN | SRD | F | |
| 2013189 | 63 | FEL | SRD | M | 5a |
| 2013201 | 64 | FEL | SRD | F | 10m |
| 2013206 | 65 | FEL | SRD | F | 4m |
| 2013217 | 66 | FEL | SRD | F | 7m |
| 2013245 | 67 | FEL | SRD | M | |
| 2013260 | 68 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2013262 | 69 | FEL | SRD | M | 7a |
| 2013263 | 70 | FEL | SRD | F | 1a |
| 2013269 | 71 | FEL | SRD | M | |
| 2013277 | 72 | FEL | SRD | F | 18a |
| 2013291 | 73 | FEL | SRD | M | 14a |
| 2013294 | 74 | FEL | SRD | F | 4a |
| 2013295 | 75 | FEL | SRD | F | 11m |
| 2013308 | 76 | FEL | SRD | F | 3a |
| 2013318 | 77 | FEL | SRD | F | |
| 2013322 | 78 | FEL | SRD | M | 8m |
| 2013324 | 79 | FEL | SRD | M | |
| 2014006 | 80 | FEL | SRD | M | |
| 2014008 | 81 | FEL | SRD | F | 11a |
| 2014013 | 82 | FEL | SRD | M | 3m |
| 2014032 | 83 | FEL | SRD | F | 1a |
| 2014039 | 84 | FEL | SRD | M | 1a |

Continua

Anexo C - Continuação

| | | | | | |
|---------|-----|-----|-------------------|---|------|
| 2014057 | 85 | FEL | SRD | M | |
| 2014060 | 86 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2014066 | 87 | FEL | SRD | M | 1a4m |
| 2014068 | 88 | FEL | SRD | F | 4a |
| 2014077 | 89 | FEL | SRD | F | 4a |
| 2014090 | 90 | CAN | Beagle | F | 5a |
| 2014100 | 91 | FEL | SRD | F | 2a |
| 2014107 | 92 | FEL | SRD | M | 11m |
| 2014114 | 93 | CAN | Labrador | M | 10m |
| 2014117 | 94 | FEL | Siamês | M | 2a |
| 2014118 | 95 | CAN | Labrador | F | 1a |
| 2014132 | 96 | FEL | SRD | M | 4a |
| 2014135 | 97 | FEL | SRD | M | |
| 2014138 | 98 | FEL | SRD | M | |
| 2014146 | 99 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2014147 | 100 | FEL | SRD | M | 8a |
| 2014157 | 101 | FEL | SRD | M | 8a |
| 2014165 | 102 | FEL | SRD | F | 1,5a |
| 2014166 | 103 | FEL | SRD | F | 1,5a |
| 2014191 | 104 | FEL | - | - | |
| 2014193 | 105 | FEL | SRD | F | 3a |
| 2014206 | 106 | FEL | SRD | M | 1,5a |
| 2014215 | 107 | CAN | Labrador | M | 1a |
| 2014217 | 108 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2014221 | 109 | FEL | SRD | M | 9a |
| 2014242 | 110 | CAN | Pinscher | F | 10a |
| 2014246 | 111 | FEL | - | M | |
| 2014250 | 112 | FEL | SRD | M | 8a |
| 2014262 | 113 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2014289 | 114 | CAN | Yorkshire Terrier | F | 6a |
| 2014293 | 115 | FEL | SRD | M | 4a |
| 2014301 | 116 | FEL | SRD | F | 2m |
| 2014307 | 117 | FEL | SRD | F | 2a |
| 2014309 | 118 | FEL | - | F | 2a |
| 2014311 | 119 | CAN | Pinscher | F | 9a |
| 2014313 | 120 | FEL | SRD | F | 5m |
| 2014335 | 121 | FEL | SRD | - | 10m |
| 2014353 | 122 | FEL | - | M | |
| 2014356 | 123 | CAN | SRD | F | 12a |
| 2014357 | 124 | FEL | Siamês | M | |
| 2014360 | 125 | FEL | SRD | F | 3a |
| 2014378 | 126 | CAN | Fox Paulistinha | M | |
| 2014382 | 127 | FEL | - | M | |
| 2014385 | 128 | FEL | SRD | F | 1a |

Continua

Anexo C - Continuação

| | | | | | |
|---------|-----|-----|-----------|---|------|
| 2014389 | 129 | FEL | - | M | |
| 2014398 | 130 | FEL | SRD | M | 6a |
| 2014400 | 131 | CAN | Chow Chow | F | 3a |
| 2014407 | 132 | FEL | Siamês | M | 2a |
| 2014411 | 133 | CAN | SRD | M | 3a |
| 2014412 | 134 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2014425 | 135 | FEL | SRD | M | 9m |
| 2014429 | 136 | FEL | SRD | F | |
| 2014433 | 137 | FEL | SRD | M | 4a |
| 2014440 | 138 | CAN | SRD | M | |
| 2014461 | 139 | FEL | - | M | 3a |
| 2014473 | 140 | CAN | Poodle | M | 14a |
| 2014479 | 141 | FEL | SRD | M | 6a |
| 2014485 | 142 | FEL | SRD | F | 1a |
| 2014498 | 143 | CAN | Poodle | F | 5a |
| 2014511 | 144 | FEL | SRD | M | 5a |
| 2014526 | 145 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2014527 | 146 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2014528 | 147 | FEL | Siamês | M | 2a |
| 2015021 | 148 | FEL | SRD | M | 5a |
| 2015026 | 149 | FEL | SRD | M | 6a |
| 2015028 | 150 | FEL | SRD | M | 7a |
| 2015031 | 151 | FEL | Siamês | M | 2a |
| 2015035 | 152 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2015048 | 153 | FEL | SRD | F | |
| 2015049 | 154 | FEL | SRD | M | 8a |
| 2015073 | 155 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2015082 | 156 | FEL | SRD | F | 4a |
| 2015085 | 157 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2015097 | 158 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2015101 | 159 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2015112 | 160 | FEL | SRD | M | 1a |
| 2015120 | 161 | FEL | SRD | M | 1a8m |
| 2015127 | 162 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2015138 | 163 | FEL | SRD | M | 2a |
| 2015156 | 164 | FEL | SRD | F | 4m |
| 2015165 | 165 | FEL | SRD | M | 3a |
| 2015173 | 166 | FEL | SRD | M | 9a |
| 2015181 | 167 | FEL | SRD | F | 2a |
| 2015182 | 168 | FEL | SRD | F | 1a |

ANEXO D

Anexo D – Concentração inibitória mínima dos exemplares utilizados frente a cetoconazol (KTC), itraconazol (ITC), voriconazol (VRC), terbinafina (TRB) e anfotericina B (AMB)

| RG | CÓDIGO | CIM (µg/mL) | | | | |
|---------|--------|-------------|------|-----|-------|------|
| | | KTC | ITC | VRC | TRB | AMB |
| 2012026 | 1 | 1 | 0,12 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2012030 | 2 | 1 | 0,12 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2012035 | 3 | 1 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2012037 | 4 | 0,5 | 0,12 | 4 | 0,06 | 0,25 |
| 2012052 | 5 | 2 | 0,25 | 8 | 0,03 | 0,5 |
| 2012056 | 6 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,015 | 2 |
| 2012064 | 7 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2012078 | 8 | 0,25 | 0,12 | 8 | 0,015 | 1 |
| 2012086 | 9 | 0,25 | 0,06 | 4 | 0,06 | 0,5 |
| 2012087 | 10 | 0,5 | 0,12 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2012109 | 11 | 0,5 | 0,12 | 8 | 0,03 | 0,5 |
| 2012110 | 12 | 0,5 | 0,5 | 4 | 0,015 | 1 |
| 2012135 | 13 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,015 | 0,5 |
| 2012140 | 14 | 0,12 | 0,06 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2012151 | 15 | 0,5 | 0,25 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2012156 | 16 | 0,015 | 0,5 | 2 | 0,015 | 0,5 |
| 2012171 | 17 | 0,5 | 0,25 | 2 | 0,12 | 2 |
| 2012175 | 18 | 1 | 0,12 | 8 | 0,015 | 0,5 |
| 2012176 | 19 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,015 | 4 |
| 2012190 | 20 | 0,5 | 0,5 | >8 | 0,015 | 1 |
| 2012199 | 21 | 0,12 | 0,06 | 8 | 0,015 | 0,5 |
| 2012214 | 22 | 1 | 0,5 | >8 | 0,12 | 1 |
| 2012230 | 23 | 0,12 | 0,12 | 8 | 0,015 | 0,5 |
| 2012231 | 24 | 0,5 | 0,25 | 2 | 0,015 | 0,5 |
| 2012234 | 25 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 2 |
| 2012240 | 26 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,015 | 2 |
| 2012242 | 27 | 0,12 | 0,12 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2012256 | 28 | 0,12 | 0,12 | >8 | 0,12 | 0,5 |
| 2013001 | 29 | 0,12 | 0,12 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2013002 | 30 | 0,5 | 0,25 | 2 | 0,12 | 2 |
| 2013010 | 31 | 0,5 | 0,12 | 4 | 0,03 | 1 |
| 2013016 | 32 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,015 | 1 |
| 2013020 | 33 | 0,5 | 0,25 | 2 | 0,015 | 0,5 |
| 2013022 | 34 | 1 | 0,06 | 4 | 0,015 | 0,5 |
| 2013028 | 35 | 0,5 | 0,06 | 2 | 0,06 | 0,5 |
| 2013032 | 36 | 0,06 | 0,12 | 4 | 0,015 | 0,5 |
| 2013033 | 37 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,015 | 1 |
| 2013043 | 38 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2013058 | 39 | 1 | 0,06 | 8 | 0,015 | 0,5 |

Continua

Anexo D - Continuação

| | | | | | | |
|---------|----|------|------|---|-------|------|
| 2013061 | 40 | 0,25 | 0,12 | 2 | 0,06 | 1 |
| 2013072 | 41 | 0,5 | 0,03 | 4 | 0,12 | 0,5 |
| 2013075 | 42 | 0,12 | 0,03 | 4 | 0,12 | 0,5 |
| 2013080 | 43 | 0,12 | 0,06 | 4 | 0,06 | 0,5 |
| 2013084 | 44 | 1 | 0,03 | 2 | 0,12 | 1 |
| 2013089 | 45 | 1 | 0,03 | 2 | 0,06 | 1 |
| 2013102 | 46 | 1 | 0,12 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2013107 | 47 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,12 | 1 |
| 2013112 | 48 | 0,5 | 0,12 | 4 | 0,12 | 1 |
| 2013113 | 49 | 0,25 | 0,5 | 4 | 0,25 | 0,25 |
| 2013116 | 50 | 0,25 | 0,03 | 4 | 0,25 | 1 |
| 2013122 | 51 | 0,06 | 0,06 | 2 | 0,03 | 0,25 |
| 2013138 | 52 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2013143 | 53 | 0,03 | 0,5 | 2 | 0,03 | 0,5 |
| 2013144 | 54 | 0,12 | 0,25 | 8 | 0,25 | 1 |
| 2013149 | 55 | 0,06 | 0,06 | 4 | 0,25 | 0,5 |
| 2013150 | 56 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,12 | 1 |
| 2013175 | 57 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2013179 | 58 | 0,12 | 0,5 | 2 | 0,015 | 1 |
| 2013180 | 59 | 0,06 | 0,25 | 4 | 0,03 | 0,25 |
| 2013181 | 60 | 0,25 | 0,12 | 8 | 0,12 | 0,25 |
| 2013187 | 61 | 1 | 1 | 2 | 0,12 | 2 |
| 2013188 | 62 | 0,06 | 0,25 | 2 | 0,06 | 0,5 |
| 2013189 | 63 | 0,12 | 0,12 | 4 | 0,03 | 0,25 |
| 2013201 | 64 | 0,12 | 0,12 | 4 | 0,03 | 0,25 |
| 2013206 | 65 | 0,03 | 0,06 | 4 | 0,12 | 0,5 |
| 2013217 | 66 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2013245 | 67 | 0,25 | 0,12 | 4 | 0,06 | 0,5 |
| 2013260 | 68 | 0,25 | 0,03 | 4 | 0,25 | 1 |
| 2013262 | 69 | 0,06 | 0,06 | 1 | 0,25 | 0,25 |
| 2013263 | 70 | 0,12 | 0,03 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2013269 | 71 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2013277 | 72 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2013291 | 73 | 0,12 | 0,25 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2013294 | 74 | 1 | 1 | 1 | 0,06 | 4 |
| 2013295 | 75 | 0,5 | 0,06 | 2 | 0,06 | 0,25 |
| 2013308 | 76 | 0,5 | 1 | 4 | 0,03 | 0,25 |
| 2013318 | 77 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2013322 | 78 | 0,12 | 0,06 | 2 | 0,06 | 0,5 |
| 2013324 | 79 | 0,25 | 0,12 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2014006 | 80 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,12 | 0,5 |
| 2014008 | 81 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2014013 | 82 | 0,12 | 0,12 | 8 | 0,06 | 2 |
| 2014032 | 83 | 0,25 | 1 | 1 | 0,12 | 0,5 |

Continua

Anexo D - Continuação

| | | | | | | |
|---------|-----|------|------|----|-------|------|
| 2014039 | 84 | 0,5 | 1 | 1 | 0,03 | 2 |
| 2014057 | 85 | 0,12 | 0,25 | 8 | 0,12 | 0,25 |
| 2014060 | 86 | 0,12 | 0,25 | 1 | 0,06 | 0,25 |
| 2014066 | 87 | 0,25 | 0,25 | 1 | 0,06 | 0,5 |
| 2014068 | 88 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,06 | 0,5 |
| 2014077 | 89 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2014090 | 90 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,06 | 0,5 |
| 2014100 | 91 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,12 | 0,25 |
| 2014107 | 92 | 0,5 | 0,12 | 4 | 0,03 | 1 |
| 2014114 | 93 | 0,25 | 1 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2014117 | 94 | 1 | 0,5 | 1 | 0,03 | 1 |
| 2014118 | 95 | 1 | 0,12 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2014132 | 96 | 0,5 | 0,5 | 4 | 0,06 | 0,5 |
| 2014135 | 97 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,12 | 0,25 |
| 2014138 | 98 | 0,5 | 0,5 | >8 | 0,12 | 0,25 |
| 2014146 | 99 | 1 | 0,25 | 8 | 0,12 | 0,5 |
| 2014147 | 100 | 0,25 | 0,5 | >8 | 0,12 | 0,5 |
| 2014157 | 101 | 1 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2014165 | 102 | 2 | 0,25 | 8 | 0,03 | 0,5 |
| 2014166 | 103 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,03 | 0,5 |
| 2014191 | 104 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014193 | 105 | 0,12 | 0,25 | 8 | 0,12 | 0,25 |
| 2014206 | 106 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,12 | 0,5 |
| 2014215 | 107 | 1 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2014217 | 108 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,06 | 0,25 |
| 2014221 | 109 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014242 | 110 | 1 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2014246 | 111 | 0,12 | 0,5 | 8 | 0,03 | 1 |
| 2014250 | 112 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014262 | 113 | 0,03 | 0,06 | 2 | 0,03 | 2 |
| 2014289 | 114 | 0,25 | 0,5 | >8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014293 | 115 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,12 | 0,5 |
| 2014301 | 116 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2014307 | 117 | 0,06 | 0,25 | 8 | 0,015 | 1 |
| 2014309 | 118 | 1 | 0,12 | 8 | 0,12 | 1 |
| 2014311 | 119 | 0,5 | 0,5 | >8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014313 | 120 | 0,5 | 0,12 | 2 | 0,03 | 1 |
| 2014335 | 121 | 0,5 | 0,12 | 8 | 0,25 | 0,5 |
| 2014353 | 122 | 0,25 | 0,25 | 4 | 0,06 | 1 |
| 2014356 | 123 | 1 | 1 | 1 | 0,03 | 2 |
| 2014357 | 124 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2014360 | 125 | 0,25 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,25 |
| 2014378 | 126 | 0,25 | 0,12 | 1 | 0,03 | 0,5 |
| 2014382 | 127 | 0,5 | 0,5 | 8 | 0,06 | 0,5 |

Continua

Anexo D - Continuação

| | | | | | | |
|---------|-----|------|------|-----|------|------|
| 2014385 | 128 | 0,12 | 1 | 2 | 0,03 | 0,25 |
| 2014389 | 129 | 0,5 | 0,25 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2014398 | 130 | 0,5 | 1 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2014400 | 131 | 0,25 | 0,12 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2014407 | 132 | 0,12 | 0,12 | 1 | 0,03 | 0,25 |
| 2014411 | 133 | 0,5 | 0,25 | 1 | 0,06 | 2 |
| 2014412 | 134 | 0,25 | 0,06 | 1 | 0,12 | 1 |
| 2014425 | 135 | 0,12 | 0,25 | 2 | 0,06 | 1 |
| 2014429 | 136 | 0,5 | 0,5 | 1 | 0,06 | 1 |
| 2014433 | 137 | 0,06 | 0,25 | 2 | 0,03 | 1 |
| 2014440 | 138 | 0,25 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014461 | 139 | 0,12 | 0,06 | 4 | 0,03 | 0,25 |
| 2014473 | 140 | 0,5 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2014479 | 141 | 0,12 | 0,06 | 1 | 0,06 | 1 |
| 2014485 | 142 | 0,5 | 1 | 2 | 0,03 | 1 |
| 2014498 | 143 | 0,5 | 0,25 | 1 | 0,03 | 2 |
| 2014511 | 144 | 0,12 | 0,25 | 8 | 0,06 | 1 |
| 2014526 | 145 | 0,12 | 0,12 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2014527 | 146 | 0,25 | 0,12 | 4 | 0,12 | 0,25 |
| 2014528 | 147 | 0,5 | 1 | 1 | 0,03 | 1 |
| 2015021 | 148 | 0,12 | 0,25 | 8 | 0,06 | 0,5 |
| 2015026 | 149 | 0,12 | 0,25 | 2 | 0,06 | 0,5 |
| 2015028 | 150 | 0,25 | 0,5 | 2 | 0,12 | 2 |
| 2015031 | 151 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2015035 | 152 | 0,06 | 0,25 | 2 | 0,25 | 1 |
| 2015048 | 153 | 0,5 | 0,25 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2015049 | 154 | 0,5 | 0,12 | 2 | 0,03 | 2 |
| 2015073 | 155 | 0,25 | 0,25 | 2 | 0,06 | 2 |
| 2015082 | 156 | 0,25 | 0,12 | 4 | 0,03 | 1 |
| 2015085 | 157 | 0,25 | 0,25 | 0,5 | 0,03 | 0,25 |
| 2015097 | 158 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,03 | 1 |
| 2015101 | 159 | 1 | 1 | 2 | 0,03 | 1 |
| 2015112 | 160 | 1 | 0,5 | 8 | 0,03 | 2 |
| 2015120 | 161 | 0,12 | 0,12 | 2 | 0,06 | 0,25 |
| 2015127 | 162 | 1 | 1 | 4 | 0,06 | 2 |
| 2015138 | 163 | 0,25 | 0,25 | 1 | 0,06 | 2 |
| 2015156 | 164 | 0,5 | 1 | 4 | 0,03 | 2 |
| 2015165 | 165 | 0,5 | 0,25 | 4 | 0,03 | 1 |
| 2015173 | 166 | 0,5 | 1 | 1 | 0,03 | 1 |
| 2015181 | 167 | 0,5 | 0,5 | 2 | 0,06 | 1 |
| 2015182 | 168 | 1 | 0,25 | 4 | 0,06 | 2 |
