

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas



Instituto Nacional de Infectologia

Evandro Chagas

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO NACIONAL DE INFECTOLOGIA
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS INFECCIOSAS

JÉSSICA SEPULVEDA BOECHAT

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *SPOROTHRIX* SPP. PROVENIENTES DE GATOS DO
RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2015

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *SPOROTHRIX* SPP. PROVENIENTES DE GATOS DO
RIO DE JANEIRO**

JÉSSICA SEPULVEDA BOECHAT

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação
em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do
Instituto Nacional de Infectologia para obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Sandro Antonio Pereira e Dr^a.
Tânia Maria Valente Pacheco

Rio de Janeiro

2015

JÉSSICA SEPULVEDA BOECHAT

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *SPOROTHRIX* SPP. PROVENIENTES DE GATOS DO
RIO DE JANEIRO**

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Sandro Antonio Pereira
Dr^a Tânia Maria Valente Pacheco

Aprovada em 01/03/2015

BANCA EXAMINADORA

Rodrigo de Almeida Paes
Doutor em Biologia Celular e Molecular
Fundação Oswaldo Cruz

Jeferson Carvalhaes de Oliveira
Doutor em Biologia Parasitária
Universidade Federal Fluminense

Rodrigo Caldas Menezes
Doutor em Biologia Parasitária
Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTO

Aos meus orientadores, Dr. Sandro Antonio Pereira e Dr^a Tânia Maria Valente Pacheco por terem confiado a mim este trabalho. Agradeço por toda paciência, dedicação, confiança, amizade e aprendizado ao longo desses quatro anos de convívio. Muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Rodrigo de Almeida Paes, que me acompanhou durante todos os seminários científicos e pela revisão feita em nosso trabalho. Obrigada pela grande ajuda, contribuições e colaboração na execução desse.

Aos colegas do Laboratório de Micologia, pela grande parceria, ao Dr. Rodrigo Paes, Dr. Fábio Britto, Dra. Helena Figueiredo e aos estagiários que tiveram paciência e dedicação ao esclarecer dúvidas e ajudar no que fosse necessário.

Aos colegas do Laboratório de Micologia/Imunodiagnóstico, primeiramente a Dra. Rosely Zancopé por ter permitido a ocorrência dessa grande parceria. E a todos os colegas deste laboratório que tiveram muita paciência e me auxiliaram na execução das técnicas. Um agradecimento especial ao Dr. Manoel Marques, que teve muita dedicação ao me acompanhar ao longo de todo o trabalho e muita paciência ao me ensinar as técnicas, principalmente as moleculares. Obrigada por tudo.

À minha mãe, Maria Zelita Sepulveda e ao meu pai, Paulo Cesar Boechat, que são meu maior exemplo de luta e dedicação e a minha base de tudo. Obrigada por todo esforço e sacrifícios que sempre fizeram por mim. Sem vocês nunca chegaria onde cheguei.

Ao meu irmão Vítor Boechat, que é meu grande companheiro, meu melhor amigo e um dos meus maiores exemplos. Obrigada por me apoiar e incentivar sempre e estar ao meu lado em todos os momentos, sempre me divertindo, não importando a situação.

Ao meu namorado Raphael Lessa, que sempre me apoiou, me incentivou e esteve ao meu lado em todas as minhas decisões, erros e conquistas. Muito obrigada pelo amor, carinho, compreensão e pela paciência.

À minha família, em especial, meu avô, Manoel Sepulveda, minha avó, Zelita Sepulveda, minhas tias Goretti, Iva, Elisabeth, Sandra e minha prima Juliana. Obrigada por todo o carinho e sempre pelos momentos maravilhosos. Vocês são fundamentais na minha vida.

Aos meus amigos da família LAPCLIN-DERMZOO. A Dra. Isabella Dib, Ana, Dr. Rodrigo, Dr. Fabiano, Paula, Isabela Maria, Vanessa, Thaís Leal, Monique, Marina, Tuanne, Luisa, Viviane, Beatriz, Érica, Jéssica, Thaís Nascimento, Emília, Elaine, Sheila, Bruna, Dayane, Artur, Adilson, Renato, Carolina, Denise Torres e Denise Amaro. E um agradecimento especial as minhas amigas Karoline e Ana Caroline, agradeço por estarem sempre me apoiando e incentivando e pela grande colaboração que tiveram na execução deste trabalho.

A todos que fazem parte da equipe da pós-graduação, incluindo os funcionários da coordenação, que sempre tiveram paciência em esclarecer dúvidas e resolver problemas, e aos professores, por todos os ensinamentos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pela concessão da bolsa de mestrado, programa Bolsa Nota 10 (processo E-26/101.550/2014) no ano de 2014 e à Fiocruz pela bolsa concedida em 2013.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa conquista.

Boechat, J S. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2015. 59f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia.

RESUMO

Esporotricose é uma micose subcutânea, causada por espécies do complexo *Sporothrix*, que infectam o ser humano e diferentes espécies animais, principalmente os gatos. Desde 1998 ocorre uma epidemia desta micose no Rio de Janeiro que vem acometendo seres humanos, cães e gatos. No período de 1998 a 2012 foram diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fiocruz aproximadamente 4.000 casos felinos. É a primeira epidemia desta micose sob a forma de zoonose descrita na literatura, cuja transmissão ocorre através da arranhadura, mordedura e/ou contato com gatos doentes, sendo que cerca de 4.000 casos humanos foram diagnosticados no INI até o ano de 2012. Os gatos são muito susceptíveis a essa doença e os principais sinais clínicos observados são a presença de lesões cutâneas ulceradas, que em aproximadamente 40% dos casos são múltiplas e ocorrem em mais de três localizações anatômicas. Os isolados felinos têm sido classificados como *Sporothrix schenckii* ao longo da epidemia. Em estudos realizados em seres humanos com esporotricose, provenientes do Rio de Janeiro, foram identificadas espécies do complexo *Sporothrix*, por meio de caracterização fenotípica e molecular, onde foi possível observar um predomínio da espécie *S. brasiliensis*. Até o momento, apenas 15 isolados clínicos de gatos com esporotricose provenientes do Rio de Janeiro foram caracterizados, sendo todos *S. brasiliensis*. Entretanto, estudos que envolvam a caracterização dos isolados clínicos felinos e a associação desses com as características clínicas e epidemiológicas dos gatos ainda não haviam sido realizados. Os objetivos deste estudo foram caracterizar os isolados clínicos a nível de espécie dentro do complexo *Sporothrix* e correlacionar as espécies do complexo *Sporothrix* com as características clínicas e epidemiológicas dos gatos. Foram incluídos no estudo 47 isolados de *Sporothrix* spp armazenados no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fiocruz e provenientes de gatos participantes de um ensaio clínico realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) do INI/Fiocruz, no período de 2006 a 2010. Esses isolados foram identificados através de suas características morfofisiológicas, bem como através do perfil de assimilação de carboidratos (sacarose e rafinose). Também foram utilizadas metodologias aplicadas a ácidos nucleicos, como a PCR *fingerprinting*. Nos testes fenotípicos 35 isolados foram caracterizados como *S. brasiliensis* e 12 não apresentaram perfil compatível com nenhuma espécie do complexo, sendo então classificadas como *Sporothrix* spp. As cepas controle na PCR T3B *fingerprinting* demonstraram perfis de bandas bastante distintas, o que permitiu que 47 isolados fossem caracterizados como *S. brasiliensis*. Não houve associação entre as cepas que apresentaram genótipo diferenciado da caracterização molecular, com os sinais clínicos apresentados pelos animais. Concluímos que *S. brasiliensis* é o agente etiológico dos casos de esporotricose felina no Rio de Janeiro, uma vez que, até o momento foi a única espécie identificada e que é fundamental a utilização de técnicas fenotípicas em conjunto com as técnicas moleculares para caracterização das espécies do complexo *Sporothrix*.

Palavras-chave: 1. Complexo *Sporothrix* 2. Caracterização fenotípica 3. Caracterização molecular 4. Esporotricose 5. Felinos 6. PCR *fingerprinting*

Boechat, J S. **Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Sporothrix* spp. from cats of Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 2015. 59p. Thesis [Master Thesis in Clinical Research on Infectious Diseases] - National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the *Sporothrix* species complex, which infect human and several animal species, particularly cats. Since 1998 there is an epidemic of this mycosis in Rio de Janeiro that is affecting humans, dogs and cats. Between 1998-2012 more than 4.000 cases from cats were diagnosed at the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI)/Fiocruz. It is the first epidemic of this mycosis in the form of zoonosis described in the literature, where the transmission occurs through the scratch, bite and / or contact with sick cats, with more than 4,000 human cases were diagnosed at the INI until 2012. Cats are very susceptible to the infection and the main clinical signs are the presence of ulcerated skin lesions that in approximately 40% of cases are multiple and occur in more than three anatomical locations. Isolates from cats have been classified as *Sporothrix schenckii* along the epidemic. In studies with human beings, from Rio de Janeiro, *Sporothrix* complex species were identified by phenotypic and molecular characterization, being possible to observe a predominance of *S. brasiliensis* species. To date, only one study identified 15 clinical isolates from cats of Rio de Janeiro as *S. brasiliensis*. However, studies involving the characterization of clinical isolates from cats and the association with the clinical and epidemiological characteristics of the animals have not been realized. The objectives of this study were to characterize the clinical isolates to the species level within the complex *Sporothrix* and correlating the species of *Sporothrix* complex with the clinical and epidemiological characteristics of the cats. The study included 47 isolates of *Sporothrix* spp stored in the Mycology Laboratory of National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas (INI)/Fiocruz and from participating cats in a clinical trial conducted at the Clinical Research Laboratory dermatozoonoses in Domestic Animals INI / Fiocruz. These isolates were identified by their morphological and physiological characteristics as well as through the carbohydrate assimilation profile (sucrose and raffinose). Also, methodologies applied to nucleic acids were used, such as the PCR fingerprinting. In phenotypic testing, 35 isolates were characterized as *S. brasiliensis*, one as *S. schenckii* and 11 isolates showed no matching profile and then were classified as *Sporothrix* spp. Control strains in PCR T3B fingerprinting showed very distinct bands allowing that the 47 isolates were characterized as *S. brasiliensis*. There was no association between the strains with differentiated genotype with the clinical signs presented by the animals. We concluded that *S. brasiliensis* is the etiologic agent of feline sporotrichosis cases in Rio de Janeiro and that is fundamental the use of phenotyping techniques in conjunction with molecular techniques for the characterization of *Sporothrix* species complex.

Keywords: 1. *Sporothrix* complex 2. Phenotypic characterization 3. Molecular characterization 4. Sporotrichosis 5. Cats 6. PCR fingerprinting

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Gatos atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses/INI no período de 2006 a 2010, apresentando diferentes tipos de lesões causadas pela esporotricose. (A) Animal apresentando úlcera única em face. (B) Múltiplas úlceras na região da cabeça e pescoço. (C) Lesão em mucosa conjuntival. (D) Nódulo e aumento de plano nasal.....15
- Figura 2:** (A) Colônias (IPEC8695 e IPEC8509) cultivadas em PDA a 25°C após 7 dias de crescimento, que foram consideradas viáveis para o armazenamento em leite desnatado a 10%, apresentando colônias de textura lisa, branco acizentada, tornando-se escurecidas com o passar dos dias. (B) Micromorfologia da forma filamentosa da colônia IPEC8718 em lâmina corada com lactofenol, apresentando hifas finas, hialinas e septadas com conídios ovoides e soltos, podendo ser demáceo ou hialino (Aumento 400x).....24
- Figura 3:** Esquema demonstrando a disposição dos açúcares testados e controles positivo e negativo na placa utilizada para realização do teste de assimilação de carboidratos. (C) Controle: *Rhodotorula* sp. (1 ao 23) Amostras testadas. (Fonte: Oliveira, 2013).....26
- Figura 4:** Macromorfologia das colônias de *Sporothrix* spp., cepas IPEC9042/1 e IPEC8607/1, cultivadas em meio PDA por 21 dias, para a avaliação da taxa de crescimento fúngico e observação da macromorfologia, apresentando colônias com aspecto liso ou aveludado com coloração branca acizentada.....34
- Figura 5:** (A) Macromorfologia da colônia de um isolado de *Sporothrix* spp., cepa IPEC8723/1, cultivado em meio PDA, após 21 dias de incubação, apresentando coloração amarronzada, o que demonstra produção de pigmento. (B) Micromorfologia, do mesmo isolado, cultivado em CMA, apresentando apenas conídios hialinos, não justificando a presença de pigmento na macromorfologia (aumento de 400x).....35
- Figura 6:** Micromorfologia da forma filamentosa corado com lactofenol (aumento de 400X). (A) Seta contínua indica conídio hialino e seta tracejada indica conídio demáceo. (B) Conidióforo simpodial ao longo da hifa.....35
- Figura 7:** Placas de PDA cultivadas com um mesmo isolado (IPEC8440), por 21 dias. Ambas as colônias apresentam colônias de aspecto liso, de coloração esbranquiçada a amarronzada (A)

Placa incubada a 30°C. (B) Placa incubada a 37°C, onde apresentou diminuição do crescimento fúngico, quando comparado a placa da figura A.....36

Figura 8: Auxonograma após 10 dias de incubação a 25°C. Colunas 1, 5 e 9: Controles negativos. Colunas 2, 6 e 10: Controles positivos. Colunas 3, 7 e 11: Sacarose. Colunas 4, 8 e 12: Rafinose. (A1 a A4) *Rhodotorula* sp. (IPEC41978). (Cruzamento de colunas e linhas: B1 ao H12) Amostras testadas. Seta contínua indica resultado negativo, e seta tracejada indica resultado positivo para a assimilação dos açúcares testados, onde é possível visualizar o crescimento fúngico.....37

Figura 9: Dendograma demonstrando o grau de similaridade entre os perfis da PCR T3B *fingerprinting* dos 47 isolados felinos caracterizados como *S. brasiliensis*.....40

Figura 10: Gel da PCR T3B *fingerprinting* realizada com as 12 amostras que apresentaram resultados fenotípicos divergentes dos resultados moleculares. (18) Representa o controle negativo (1 e 19) Representam o marcador molecular DNA *ladder*, 100pb. (2) *S. brasiliensis* (IPEC16490). (3) *S. schenckii* (IPEC27722). (4) *S. mexicana* (MUM11.02). (5) *S. globosa* (IPEC27135). (6 ao 17) Representam isolados felinos caracterizados como *S. brasiliensis* de acordo com o perfil de bandas apresentadas.....42

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Chave de identificação para cada espécie do gênero <i>Sporothrix</i> (Oliveira, 2013-Adaptada de Marimon et al., 2007).....	27
Tabela 1: Correlação entre variáveis clínicas e epidemiológicas com o desfecho dos felinos assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ no período de 2006 a 2010.....	33
Tabela 2: Caracterização fenotípica de isolados clínicos de <i>Sporothrix</i> spp. provenientes de gatos com esporotricose assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos INI/Fiocruz no período de 2006 a 2010.....	38
Tabela 3: Correlação entre isolados de caracterizados como <i>Sporothrix brasiliensis</i> que apresentaram diferenças intraespecífica e os que não apresentaram, com variáveis clínicas e epidemiológicas dos gatos atendidos no Lapclin-dermzoo/INI/Fiocruz no período de 2006 a 2010.....	41
Tabela 4: Diferenças encontradas, em 12 isolados felinos, entre a caracterização fenotípica e a caracterização molecular.....	42
Tabela 5: Correlação entre isolados caracterizados como <i>S. brasiliensis</i> que apresentaram fenótipos concordantes e discordantes da caracterização molecular com variáveis clínicas e epidemiológicas dos isolados felinos com esporotricose assistidos no Lapclin-Dermzoo/INI no período de 2006 a 2010.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFLP – *Amplified fragment length polymorphism*
- AIDS – *Acquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)
- BHI – *Brain heart infusion* (Infusão de cérebro e coração)
- β -tub – *Beta tubulin* (Beta tubulina)
- CAL – *Calmodulin* (Calmodulina)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório
- CHS – *Chitin synthase* (Quitina sintase)
- CMA – *Corn Meal Agar* (Ágar farinha de milho)
- DHN – Dihidroxi naftaleno
- DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- dNTP – Dinucleotídeo trifosfato
- EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)
- EUA – Estados Unidos da América
- FeLV – *Feline leukemia virus* (Vírus da leucemia felina)
- Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
- FIV – *Feline immunodeficiency virus* (Vírus da Imunodeficiência felina)
- GLI – Glicose
- INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
- ITS – *Internal transcriber spacer* (Região de transcrição interna)
- LabMicol – Laboratório de Micologia
- Lapclin-Dermzoo – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos
- PCR – *Polimerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)
- PDA – *Potato Dextrose Agar* (Ágar batata dextrose)
- RAF – Rafinose
- RAPD – *Random amplified polymorphic DNA*
- RFLP – *Restriction fragment length polymorphism*

SAC – Sacarose

SC – Subcutânea

SAHN – *Sequential, agglomerative, hierarquic, monoverlapping clustering methods* (Métodos de agrupamento sequencial, aglomerativo, hierárquico, sem sobreposição)

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

YNB – *Yeast Nitrogen Base*

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Histórico da esporotricose	1
1.2. Complexo <i>Sporothrix</i>	2
1.2.1. Caracterização das espécies do complexo <i>Sporothrix</i>	3
1.2.1.1. <i>Sporothrix schenckii</i>	6
1.2.1.2. <i>Sporothrix globosa</i>	6
1.2.1.3. <i>Sporothrix mexicana</i>	7
1.2.1.4. <i>Sporothrix luriei</i>	7
1.2.1.5. <i>Sporothrix pallida</i>	8
1.2.1.6. <i>Sporothrix brasiliensis</i>	8
1.3. Esporotricose	10
1.3.1. Epidemiologia	10
1.3.2. Esporotricose felina	14
1.4. Diagnóstico laboratorial	19
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVO GERAL	22
3.1. Objetivos Específicos	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1. Desenho do Estudo	23
4.2. Casuística	23
4.3. Materiais, Procedimentos e Técnicas	23
4.3.1. Isolados de <i>Sporothrix</i> spp.	23
4.3.2. Estudo morfológico	24
4.3.3. Estudos fisiológicos	25
4.3.4. Identificação Molecular	27
4.3.4.1. Extração do DNA	27
4.3.4.2. PCR T3B <i>fingerprinting</i>	28
4.3.5. Análise dos dados dos animais	29
5. PLANO DE ANÁLISE	30
6. RESULTADOS	31
6.1. Dados clínicos e epidemiologia	31
6.2. Caracterização fenotípica	34
6.2.1. Estudos morfológicos	34
6.2.2. Estudos fisiológicos	36
6.3. Caracterização molecular	39
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO	49
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Histórico da esporotricose

Em 1898, Benjamin Schenck, no Johns Hopkins Hospital em Baltimore, Estados Unidos, realizou o primeiro isolamento de um fungo de um paciente do sexo masculino que apresentava lesões na mão direita e braço. A amostra do paciente foi enviada para ser estudada pelo micologista Erwin F. Smith, que identificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporothrichum* (Schenck, 1898).

O segundo caso da doença foi descrito em 1900, também nos Estados Unidos, na cidade de Chicago, por Hektoen e Perkins. Este caso era de um menino que apresentava um abscesso subcutâneo e posterior desenvolvimento de lesão ulcerada e nódulos, além de linfangite secundária, devido a um ferimento causado por uma martelada no dedo indicador. Após o isolamento do fungo, os autores denominaram o agente como *Sporothrix schenckii* (Hektoen e Perkins, 1900).

Em 1910, Matruchot descreveu novamente o microrganismo, nomeando-o de forma incorreta como *Sporotrichum schenckii* (Matruchot, 1910). Esta nomenclatura foi utilizada erroneamente até a década de 1960, quando um estudo propôs diferenças na conidiogênese entre os gêneros *Sporothrix* e *Sporotrichum*, sugerindo então que o nome correto do agente causador da esporotricose fosse *Sporothrix schenckii* (Charmichael, 1962).

Entre 1903 e 1912, De Beurmann e Gougerot (1912) descreveram as principais formas clínicas e a terapêutica da esporotricose, após reunir e revisar cerca de 200 casos humanos.

No Brasil, Lutz e Splendore (1907) descreveram inicialmente um caso humano no Brasil, no estado de São Paulo e posteriormente, descreveram a primeira infecção natural de esporotricose em ratos. A possibilidade de infecção humana por mordidas destes animais foi considerada (Pupo, 1917). Em 1912, Terra e Rabelo descreveram o primeiro caso humano no Rio de Janeiro. Entretanto, novos casos foram registrados em outros estados brasileiros, dentro de um período de quatro anos (Donadel et al., 1993). Também no Rio de Janeiro, o primeiro relato de esporotricose animal foi diagnosticado em uma mula (Leão et al., 1934).

A susceptibilidade de gatos para a infecção por *S. schenckii* foi demonstrada experimentalmente em 1909 (de Beurmann et al., 1909). No entanto, a primeira citação da doença naturalmente adquirida em gatos foi feita por Singer e Muncie (1952) em Nova York, nos Estados Unidos. No Brasil, o primeiro relato de esporotricose felina foi descrito no ano de 1956, em São Paulo (Freitas et al., 1956).

No Rio de Janeiro, o primeiro relato de um caso de esporotricose felina ocorreu em 1998 (Baroni et al., 1998). Desde então, o Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) vem acompanhando a evolução dessa micose na região metropolitana do Rio de Janeiro, sendo a primeira endemia de esporotricose associada à transmissão zoonótica (Schubach et al., 2002; Barros et al., 2010; Barros et al., 2011).

1.2. Complexo *Sporothrix*

Espécies do gênero *Sporothrix* são encontradas em plantas e matéria vegetal em decomposição, apresentando predileção por climas temperados e tropicais (Rippon, 1988). Depois de uma revisão na taxonomia dos fungos por Guarro e colaboradores (1999), este fungo foi caracterizado como pertencente à Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales, Família Ophiostomataceae.

Diversos estudos taxonômicos moleculares utilizando diferentes metodologias, como o *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) (Suzuki et al., 1988; Takeda et al., 1991; Lin et al., 1999; Ishizaki et al., 2000; Mora-Cabrera et al., 2001; Watanabe et al., 2004; Zhang et al., 2006; Arenas et al., 2007) de diferentes genes alvos, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD) (Mesa-Arango et al., 2002), sequenciamento do DNA da região de transcrição interna do RNA ribossomal (ITS) (Beer et al., 2003; Zhang et al., 2011), PCR com alvo no gene da topoisomerase II (Kanbe et al., 2005), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP) (Neyra et al., 2005), e M13 PCR *fingerprinting* (Gutierrez-Galhardo et al., 2008; Reis et al., 2009) demonstraram que isolados de *S. schenckii* apresentam polimorfismos, sugerindo que esta não poderia ser considerada como a única espécie causadora da esporotricose.

Baseado nos estudos moleculares citados acima, juntamente com a variação observada nos estudos fenotípicos que também foram realizados, foi demonstrado uma elevada variabilidade

intraespecífica entre os isolados morfológicamente identificados como *S. schenckii*, o que levou a proposição de um complexo de pelo menos seis espécies, discriminadas filogeneticamente como *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. luriei* (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008a).

1.2.1. Caracterização das espécies do complexo *Sporothrix*

As espécies do complexo *Sporothrix* são muito semelhantes macroscopicamente, independente do meio em que sejam cultivadas e microscopicamente apresentam diferenças bastante sutis (Marimon et al., 2007). Para a definição das espécies são utilizados dois tipos de caracterização, a fenotípica, sendo esta morfológica e fisiológica, e a caracterização baseada em técnicas moleculares (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2007).

Para a caracterização fenotípica das espécies do complexo *Sporothrix* são empregadas técnicas como o sub-cultivo em ágar batata dextrose (PDA), ágar farinha de milho (CMA) e em ágar aveia, a fim de confirmar as características macroscópicas e determinar as características microscópicas (Marimon et al., 2007). Apesar da esporotricose ser uma doença de distribuição mundial, poucos estudos foram realizados a fim de esclarecer a fisiologia do fungo (Barros et al., 2011). Para estudos fisiológicos são avaliadas taxas de crescimento em várias temperaturas (20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 37°C e 40°C) em meio de batata dextrose (PDA), além disso são aplicados testes como o de assimilação de carboidratos, onde os isolados podem ser testados com relação a diversos açúcares, como sacarose, rafinose, ribitol, dentre outros, utilizando meio de cultura *Yeast Nitrogen Base* – YNB (Marimon et al., 2007). A presença de urease, produção de ácido, liquefação de gelatina, tolerância ao NaCl, MgCl₂ e cicloheximida e a formação de polissacarídeo extracelular são outros testes fisiológicos que podem ser realizados. (Marimon et al., 2007). Todas as espécies apresentam como temperatura ótima para o crescimento entre 20°C a 30°C, não havendo crescimento *in vitro* a 40°C. Porém, a temperatura máxima varia de acordo com o local de origem dos isolados (Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008a).

Macromorfológicamente, as colônias filamentosas de *Sporothrix* spp. em cultura variam em sua morfologia. Entretanto, em ágar Sabouraud glicose a 25°C, após três a cinco dias de crescimento, geralmente apresentam textura lisa e coloração branca acinzentada. Porém, com o

passar do tempo, as colônias tornam-se mais escurecidas (Barros et al., 2011). Algumas cepas, entretanto, possuem a capacidade de produzirem colônias escurecidas desde o início do crescimento (Almeida-Paes et al., 2009). A 37°C, o fungo faz a conversão para a sua forma de levedura, na qual observam-se colônias lisas e úmidas, de consistência cremosa e coloração esbranquiçada (Barros et al., 2011). Cepas relacionadas à espécie *S. globosa* não crescem bem a 37°C, podendo necessitar de temperaturas mais baixas para a conversão à forma de levedura (Marimon et al., 2007). Esse processo de transição pode ocorrer após o paciente ter sido infectado pela forma filamentosa do fungo (Barros et al., 2011).

A micromorfologia da forma filamentosa revela várias hifas hialinas, finas e septadas, associadas a conídios ovóides e soltos, algumas vezes agrupados em conidióforos terminais, conferindo-lhes o aspecto de “margarida” e também a conídios demáceos que podem ser encontrados dispostos ao longo de toda a hifa. O tamanho e a forma dos conídios demáceos podem variar entre as espécies do complexo *Sporothrix* (Marimon et al., 2007). Microscopicamente, as células leveduriformes apresentam-se em vários tamanhos e formas. Observam-se estruturas redondas, ovais ou em forma de naveta, com brotamento em formato de charuto (Barros et al., 2011). A aeração, tensão de CO₂, fonte de carbono e pH também têm importância na conversão da forma filamentosa para a de levedura (Rippon, 1988).

Apesar das espécies do gênero *Sporothrix* apresentarem algumas diferenças em sua morfologia e fisiologia, não se pode considerar apenas a caracterização fenotípica, sendo necessário a correlação com estudos moleculares para a identificação das espécies (Oliveira et al., 2011).

Para a caracterização molecular de espécies utiliza-se a extração, amplificação e sequenciamento do DNA dos isolados (Marimon et al., 2007; Rodrigues et al., 2013a; Rodrigues et al., 2013b) através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Existe uma grande variedade de técnicas moleculares baseada na PCR, como *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), sequenciamento parcial do DNA da região de transcrição interna do RNA ribossomal (ITS), sequenciamento parcial do DNA da região da calmodulina (CAL), β -tubulina (β tub) e quitina sintase (CHS), *nested PCR*, *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), PCR M13 *fingerprinting* e PCR T3B *fingerprinting* (Oliveira et al., 2014a; Rodrigues et al., 2014b).

Apenas algumas dessas técnicas permitem a diferenciação entre as espécies, sendo elas, o sequenciamento parcial dos genes da CAL, β tub, CHS, ITS e a PCR T3B *fingerprinting* (Oliveira

et al., 2014a). Essas técnicas geram bandas distintas para as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. mexicana* e *S. globosa* permitindo assim a diferenciação, havendo 100% de correlação com o sequenciamento parcial do gene da calmodulina (Oliveira et al., 2012), que é considerado o padrão de referência para identificação molecular de espécies do gênero *Sporothrix*. Recentemente Zhou e colaboradores (2014) sugeriram que a análise da região do ITS poderia ser aplicada para a identificação de espécies do complexo *Sporothrix*. Em outro estudo recente, Rodrigues e colaboradores (2014b), demonstraram que análise da RFLP-PCR da sequência do gene da CAL foi utilizado para distinguir espécies de relevância clínica, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii* s. str., *S. globosa* e *S. luriei*. Tanto a técnica da PCR T3B fingerprinting, como a RFLP-PCR da sequência do gene da CAL, permitiram a identificação espécie-específica para isolados do complexo, além de serem mais rápidas, de baixo custo e por serem de menor complexidade (Oliveira et al., 2012; Rodrigues et al., 2014b).

Por meio do número de casos publicados em comparação com a estimativa da distribuição molecular das espécies, foi observado a predominância de determinadas espécies nas principais áreas endêmicas. A Ásia apresentou predominância de *S. globosa*, Austrália e África do Sul com *S. schenckii*, sudeste da América do Sul com *S. brasiliensis* e parte ocidental da América do Sul, América Central e América do Norte com predominância de *S. schenckii*. Os casos relacionados a *S. mexicana* e *S. luriei* são bastante raros dificultando essa análise (Zhang et al., 2015).

Até o momento, poucos estudos realizaram a caracterização de isolados felinos a nível de espécie do complexo *Sporothrix*. Rodrigues e colaboradores (2013a) realizaram a análise filogenética de isolados de diversas regiões do Brasil, dentre eles, 15 isolados clínicos eram provenientes de gatos da endemia do Rio de Janeiro e foram classificados como pertencentes à espécie *S. brasiliensis*. Outro estudo caracterizou através de técnicas fenotípicas e moleculares oito isolados felinos provenientes do Rio Grande do Sul, dos quais apenas um foi caracterizado como *S. brasiliensis*, um como *S. albicans*, hoje conhecida como *S. pallida* e seis como *S. schenckii* (Oliveira et al., 2011a). Entretanto, a associação com as características clínicas e epidemiológicas dos gatos não foi realizada em nenhum destes estudos.

As espécies do gênero *Sporothrix* apresentam diferentes comportamentos patológicos, susceptibilidade a antifúngicos e fenótipos, que sugerem que o tratamento antifúngico ideal possa depender da espécie causadora da esporotricose (Marimon et al., 2008b).

1.2.1.1. *Sporothrix schenckii*

Antes dos estudos realizados com o objetivo de caracterizar as espécies do complexo *Sporothrix* (Marimon et al., 2007), os isolados clínicos eram formalmente classificados como *S. schenckii*, pois este era o único agente etiológico conhecido, atualmente são classificados como *S. schenckii sensu stricto*.

Sporothrix schenckii apresenta uma distribuição mundial, tendo sido relatados casos em seres humanos e animais no continente americano como México, Guatemala, Colômbia, Brasil, Peru, Bolívia, Argentina, Venezuela, EUA, França, Itália, África do Sul e Ásia (Marimon et al., 2007; Madrid et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Romeo et al., 2011). Um estudo realizado no Rio de Janeiro isolou *S. schenckii sensu stricto* de cinco pacientes humanos, aos quais um pertencia à região metropolitana do Rio de Janeiro e os outros quatro a regiões rurais, sugerindo que *S. schenckii* possa circular em menor proporção pela área endêmica, quando comparado ao *S. brasiliensis* (Almeida-Paes et al., 2014). Poucos estudos sobre isolamento de *S. schenckii* em solo no Brasil foram descritos, porém Rodrigues e colaboradores (2014a) realizaram o isolamento desta espécie de tocas de tatus, nos municípios de Botucatu e Manduri, localizados no estado de São Paulo.

Sporothrix schenckii sensu stricto é considerada a segunda espécie mais patogênica do complexo (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Com relação aos estudos fisiológicos, no geral a temperatura ótima de crescimento é em torno de 30°C (Marimon et al., 2007). Vários carboidratos podem ser assimilados por *S. schenckii sensu stricto*, como glicose, frutose, manose e celobiose. No entanto, são observadas variações na assimilação de sacarose, arabinose, amido, rafinose e ribitol (Ghosh et al., 2002; Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011; Barros et al., 2011).

1.2.1.2. *Sporothrix globosa*

Sporothrix globosa é um fungo mundialmente distribuído, apresentando casos relatados do seu isolamento apenas em humanos no Reino Unido, Espanha, Itália, EUA, China, Japão e Índia (Marimon et al., 2007; Madrid et al., 2009; Yu et al., 2013; Liu et al., 2014), e mais recentemente no México, Guatemala e Colômbia (Madrid et al., 2009). Recentemente em

Portugal, foi relatado o primeiro caso autóctone no país (Oliveira et al., 2014b). No Brasil, quatro casos foram descritos, sendo um caso no estado do Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2010) e os outros três nos estados de Minas Gerais, Ceará e Goiás (Rodrigues et al., 2013b).

Cepas relacionadas com essa espécie não crescem bem a 37°C, podendo necessitar de temperaturas mais baixas para conversão a forma de levedura e não apresentam conídios pigmentados. (Marimon et al., 2007; Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Além disso um estudo realizado considerou as cepas de *S. globosa* como não virulentas em camundongos (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Foi demonstrado em estudos fisiológicos, que cepas classificadas como *S. globosa* não fazem assimilação da rafinose, porém fazem do ribitol, dextrose e principalmente da sacarose, sendo uma característica fisiológica típica de cepas desta espécie (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2010).

1.2.1.3. *Sporothrix mexicana*

Até o momento poucos casos de esporotricose humana foram relacionados à espécie *S. mexicana*, sendo esta considerada por alguns autores como a mais incomum das espécies do complexo *S. schenckii* (Rodrigues et al., 2013b). Acreditava-se ser uma espécie restrita à região do México, porém até o momento foi isolada de plantas no México, de um caso de infecção humana em Portugal e mais recentemente de três casos humanos descritos no Brasil (Marimon et al., 2007; Dias et al., 2011; Rodrigues et al., 2013b). Apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 35°C e tem a capacidade de assimilar sacarose, rafinose e ribitol (Marimon et al., 2007).

1.2.1.4. *Sporothrix luriei*

Sporothrix luriei era anteriormente chamado de *Sporothrix schenckii* var. *luriei*. Posteriormente, essa denominação foi alterada, uma vez que, por meio de análises filogenéticas, foi demonstrada uma clara separação genética entre *S. luriei* e as demais espécies do complexo (Marimon et al., 2008a). Sendo considerada uma espécie clínica rara, esta já foi isolada na África do Sul (Marimon et al., 2008a), Índia (Padhye et al., 1992) e em canino no Brasil (Oliveira et al., 2011a).

Apresenta temperatura ótima de crescimento a 30°C e inibição do crescimento a 40°C, com a velocidade do crescimento mais rápida a 35°C e 37°C. Quanto à assimilação de carboidratos, esta espécie é capaz de assimilar o ribitol, porém a sacarose e a rafinose não são assimiladas (Marimon et al., 2008a). O tamanho da levedura de *S. luriei* demonstrou ser maior do que a das demais espécies. Esses organismos “in vivo” formam células globosas com parede fina (1,6 até 4,8 x 1,6 até 6,9µm) que se reproduzem por brotamento e células globosas com parede fina (11,7 até 18,7 x 14 até 23,4 µm) que se reproduzem por septação ou por brotamento simples ou múltiplo (Rippon, 1988).

1.2.1.5. *Sporothrix pallida*

A análise filogenética entre *S. albicans*, *S. pallida* e *S. nivea* foi realizada e revelou grande similaridade genética entre eles, logo foi proposto que essas três espécies ambientais não patogênicas fossem chamadas de *S. pallida* (de Meyer et al., 2008). Apesar de ser considerada não patogênica, Morrison e colaboradores (2013) descreveram um caso de ceratite fúngica causada por essa espécie em uma paciente humana, proveniente de Atlanta, nos Estados Unidos. Dos poucos estudos realizados com animais com relação a caracterização de espécies, Oliveira e colaboradores (2011a) caracterizaram o isolado de um felino com esporotricose como *S. albicans*.

De suas características fisiológicas, essa espécie de *Sporothrix* apresenta temperatura ótima de crescimento entre 20°C e 35°C, não assimilam a rafinose, assimilando apenas a sacarose. Como características morfológicas, suas colônias normalmente são desprovidas de pigmentação, microscopicamente apresentam conídios hialinos, sendo uma característica típica das cepas de *S. pallida* (Marimon et al., 2007).

1.2.1.6. *Sporothrix brasiliensis*

Sporothrix brasiliensis tem sido descrita como uma espécie emergente, altamente patogênica para o ser humano e os animais, apresentando uma distribuição regional no Brasil (Marimon et al., 2007; Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Silva-Vergara et al., 2012; Rodrigues et al., 2013a). É responsável pela maioria dos casos humanos e está associada à

epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Um estudo revelou a alta virulência de *S. brasiliensis*, sendo a mais virulenta dentre as espécies e demonstrou a mortalidade, dano e carga fúngica tecidual em modelos laboratoriais, onde foi proposto que os mecanismos lesionais pudessem ser espécie-específicos (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009). Almeida-Paes e colaboradores (2014) demonstraram, em humanos, que algumas manifestações clínicas incomuns da esporotricose, como infecção disseminada em pacientes imunocompetentes e reação de hipersensibilidade, são associadas a *S. brasiliensis*.

Poucos estudos foram realizados para a caracterização de espécies em animais. Sete isolados felinos foram caracterizados como *S. brasiliensis* em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, Brasil (Oliveira et al., 2011a). Em um outro estudo, isolados provenientes de trinta gatos e dois cães foram caracterizados também como *S. brasiliensis*, com cepas originadas dos estados do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais (Rodrigues et al., 2013a). Um terceiro estudo, realizado no Espírito Santo, classificou um isolado felino como *S. brasiliensis* (Oliveira et al., 2013b).

Recentemente, um estudo realizado por Montenegro e colaboradores (2014), identificou 47 isolados felinos como *S. brasiliensis*, descrevendo esta como uma espécie emergente na região metropolitana de São Paulo. A identificação foi realizada por meio do sequenciamento parcial do gene da CAL e também pela técnica RFLP-PCR da sequência do gene da CAL. Neste mesmo estudo, também foi realizado o sequenciamento do *elongation fator-1 alpha* (EF1- α), para análise de haplótipos, com o objetivo de visualizar diferenças e diversidade entre as cepas de *S. brasiliensis* recuperados de diferentes focos zoonóticos, como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Os autores deste estudo descreveram que o haplótipo circulante em São Paulo é o mesmo do Rio de Janeiro, porém diferente do circulante no Rio Grande do Sul (Montenegro et al., 2014). Resultados semelhantes foram reportados por Rodrigues e colaboradores (2013a), que sequenciaram o EF1- α de isolados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul e os agruparam em dois grupos, demonstrando genótipos distintos.

Os isolados de *S. brasiliensis* apresentam temperatura ótima de crescimento entre 30°C e 35°C e não são capazes de assimilar tanto a sacarose como a rafinose, porém assimilam o ribitol (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011). De acordo com Oliveira e colaboradores (2011), em algumas colônias podem ser encontrados conídios em formato triangular, o que parecia ser uma característica apenas do *S. schenckii*.

1.3. Esporotricose

A esporotricose é uma infecção subaguda à crônica, com lesão usualmente limitada à pele, ao tecido celular subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes, embora eventualmente possa tornar-se disseminada (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Barros et al., 2011). Acomete os humanos e uma grande variedade de animais, como porcos, cavalos, ratos, mulas, raposas, tatus, golfinhos, camelos, aves (Londero e Ramos, 1980; Rippon, 1988; Costa et al., 1994; Pappas et al., 2000), cães (Schubach et al., 2006), mas o gato é a principal espécie acometida (Pereira et al., 2011).

Classicamente, a transmissão do agente etiológico ocorre através da pele por meio da implantação traumática do fungo presente em matéria vegetal ou orgânica de solo contaminado por conídios de *Sporothrix* (Rippon, 1988). Em raras ocasiões pode ser adquirida por inalação do esporo (López-Romero et al., 2011) e pela transmissão zoonótica que ocorre por meio de animais infectados (Barros et al., 2011).

Porém, na região metropolitana do Rio de Janeiro, a transmissão zoonótica é importante devido ao grande número de casos descritos nos últimos anos. Essa transmissão ocorre através de arranhadura, mordedura ou contato com exsudatos de lesões de gatos infectados (Barros et al., 2010; Silva et al., 2012).

No estado de saprofitismo, o fungo é geralmente encontrado em substratos vegetais nas condições favoráveis de temperatura e umidade (Rippon, 1988). *Sporothrix* foi isolado em espinhos, feno, palha, musgos do gênero *Sphagnum*, madeira e solo rico em matéria orgânica em decomposição (Kauffman, 1999).

1.3.1. Epidemiologia

A esporotricose apresenta distribuição mundial, apesar de apresentar altas prevalências em regiões de clima tropical e subtropical úmido. No início do último século era uma doença comum na França, porém nos últimos anos é descrita esporadicamente na Europa (Barros et al., 2011). Já foram relatados casos de esporotricose humana no sudoeste da Austrália, onde alguns casos esporádicos têm sido identificados (Feeney et al., 2007). Nos Estados Unidos, a incidência da doença é baixa (Barros et al., 2011). Devido a predileção do fungo por climas tropicais e

subtropicais, a maior incidência da doença apresenta-se no continente americano, países asiáticos e Austrália (López-Romero et al., 2011), sendo as principais áreas endêmicas Japão, China, Malásia, Índia, México, África do Sul e países da América do Sul como Uruguai, Peru (Civita et al., 2004; Macoleta-Ruiz et al., 2006; Mehta et al., 2007; Barros et al., 2008; Kovarik et al., 2008; Takenada et al., 2009; Barros et al., 2011; López-Romero et al., 2011; Song et al., 2013; Chakrabarti et al., 2015) e principalmente o Brasil (Schubach et al., 2008; Silva et al., 2012).

Em 1996, foram descritos 48 casos de esporotricose felina, atendidos nos Estado Unidos, durante um período de 40 anos (Davies e Troy, 1996). Alguns anos depois, Crothers e colaboradores (2009) realizaram um estudo retrospectivo para avaliação de 14 casos felinos observados no nordeste da Califórnia no período de 1987 a 2007.

Epidemias de esporotricose acometendo amplas áreas geográficas ou elevado número de casos são raras e geralmente estão relacionadas a uma fonte de infecção comum no ambiente (Bustamante e Campos, 2004). A primeira e mais famosa epidemia de esporotricose humana ocorreu na década de 1940 na África do Sul, quando mais de 3.000 trabalhadores, de uma mina de ouro, foram infectados pelo fungo, que foi isolado na madeira de sustentação dos túneis das minas (Helm e Bermam, 1947; Quintal, 2000). A maior epidemia de esporotricose humana descrita nos Estados Unidos ocorreu na década de 1980 na qual 84 trabalhadores de 15 estados adquiriram a doença ao participar de um programa de reflorestamento, sendo esses casos relacionados ao contato com um tipo de musgo contaminado com *S. schenckii* (Coles et al., 1992).

No Brasil, a maior série de casos da doença em gatos incluía oito casos (Freitas et al., 1965), até a descrição de 347 animais provenientes do Rio de Janeiro (Schubach et al., 2004a). Esta endemia de esporotricose relacionada aos gatos domésticos está em curso no Rio de Janeiro desde 1998, sendo a primeira sob a forma de zoonose encontrada na literatura. Aproximadamente 3.618 casos humanos, no período de 1987 a 2013 (Freitas et al., 2014), 3.804 casos felinos e 120 casos caninos foram diagnosticados no INI/Fiocruz, no período de 1998 a 2011 (Barros et al., 2010; Pereira et al., 2014; Gremião et al., 2015). Este número tende a aumentar a cada ano. No período de janeiro de 2012 a dezembro de 2012, 320 novos casos felinos foram diagnosticados nesta instituição (Gremião et al., 2015), apesar do real número de casos ser difícil de ser determinado (Pereira et al., 2014). Desde 1998, o INI/Fiocruz tem sido considerado centro de

referência para a doença em gatos, cães e humanos no Rio de Janeiro (Schubach et al., 2008; Barros et al., 2008; Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2014).

Silva e colaboradores (2012) relataram que o número de casos da epidemia no estado do Rio de Janeiro ultrapassou os cerca de 3.000 casos descritos na década de 1940 na África do Sul, uma vez que foi observado um aumento de 126,6% em relação a totalidade dos casos em onze anos de estudo, o que então caracteriza esta endemia como a maior endemia mundial. Porém, a esporotricose não é uma doença de notificação compulsória na maioria dos países, logo as informações sobre a incidência da doença não são bem conhecidas e estão limitadas aos dados gerados por publicações científicas (Barros et al., 2011). No Brasil os casos humanos apenas passaram a ser de notificação compulsória no ano de 2013, através da resolução SES nº 674 de 12 de junho de 2013, a notificação compulsória dos animais, que apresentavam esporotricose, foi através da portaria GM/MS nº 1.271 de 6 de junho de 2014, no artigo 2º, parágrafo IV. Segundo um estudo recente realizado por Zhang e colaboradores (2015) as regiões mais endêmicas são China, África do Sul e Brasil, que apresenta o maior número de casos de esporotricose tanto humana quanto animal.

Dos casos humanos de esporotricose atendidos no INI/Fiocruz durante o período de 1997 a 2007, 65% possuíam gatos e dentre eles, 80,3% declararam terem sido infectados por estes animais (Silva et al., 2012). Schubach e colaboradores (2012) acreditam que os gatos são os únicos animais que apresentam um potencial zoonótico importante em virtude da elevada quantidade de leveduras encontrada nas lesões, facilitando assim, a transmissão pelo contato, através da arranhadura, mordedura ou até mesmo pelo contato com exsudato das lesões dos animais doentes. O isolamento do fungo proveniente das cavidades nasal e oral, fragmentos de unhas, exsudato de lesões cutâneas e mucosas, órgãos internos e sangue de gatos (Schubach et al., 2001; Schubach et al., 2003a; Schubach et al., 2003b; Schubach et al., 2004a; Schubach et al., 2004b), associado aos relatos de casos humanos de esporotricose (Schubach et al., 2008) e à alta equivalência genotípica demonstrada entre isolados felinos e isolados humanos com os quais os gatos se relacionam (Reis et al., 2009), demonstram a importância do gato como fonte de infecção (Silva et al., 2012).

O resultado da endemia causada por *S. brasiliensis* no Rio de Janeiro pode ser considerado uma complexa interação patógeno-hospedeiro-ambiente, incluindo elevada

susceptibilidade do gato e alta virulência do patógeno, comportamento dos gatos e recente introdução de *S. brasiliensis* a uma população de felinos urbanos (Montenegro et al., 2014).

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

Na análise espacial da distribuição geográfica da doença na região metropolitana do Rio de Janeiro, observa-se uma elevada densidade de casos ao redor da capital fluminense, extrapolando seus limites para municípios vizinhos, denominado cinturão de esporotricose, indicando que esta é uma epidemia urbana (Barros et al., 2010; Silva et al., 2012).

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

Segundo Pereira e colaboradores (2014), a principal dificuldade para o controle desta epidemia é a falta de um programa de saúde pública que invista no controle da doença animal. Além disso, foram considerados como fatores de entrave, o abandono de animais doentes e o destino inadequado das carcaças de animais mortos, além do abandono do tratamento, o que pode levar a uma recorrência da doença impondo dificuldades no processo de cura desses animais (Chaves et al., 2013), podendo contribuir para a manutenção da endemia no Rio de Janeiro.

A esporotricose felina tem sido registrada em outros estados do Brasil ao longo dos últimos 20 anos, especialmente no Rio Grande do Sul (Oliveira et al., 2011a; Madrid et al., 2012) e São Paulo (Rodrigues et al., 2013a; Montenegro et al., 2014). No entanto, até o momento, o

número de casos descritos nos dois maiores estudos nessas regiões, são inferiores ao que é descrito no Rio de Janeiro, destacando a gravidade da situação epidemiológica neste último estado brasileiro (Pereira et al., 2014).

1.3.2. Esporotricose felina

Até o final dos anos 1990, existiam poucos relatos da doença em gatos no Brasil. Em 1998 foi descrito o primeiro caso de esporotricose felina no Rio de Janeiro (Baroni et al., 1998). Nos últimos anos, a frequência de relatos de casos de esporotricose em gatos vem aumentando no Brasil, notadamente no Rio de Janeiro (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2011; Pereira et al., 2014).

A susceptibilidade de gatos ao *S. schenckii* foi demonstrada experimentalmente, através da observação do desenvolvimento da doença com lesões localizadas e disseminadas (De Beurmann et al., 1909). Além disso os felinos apresentam características comportamentais como esfregar-se no solo, afiar as garras em árvores e madeiras, instintos de caça, hábitos higiênicos, como enterrar suas fezes, além de incursões fora dos seus limites domiciliares, tornando-os mais expostos ao fungo (Larsson et al., 1989; Davies e Troy, 1996; Barros et al., 2004).

Geralmente, os gatos adquirem a infecção após brigas com outros gatos infectados, quando ocorre a inoculação do fungo através da pele. Além da arranhadura e/ou mordedura os gatos podem se infectar através do contato corporal com outros gatos doentes, além do contato com ambiente contaminado (Schubach et al., 2004a). O isolamento de *Sporothrix* spp. foi realizado em ratos por Lutz e Splendore (1907), demonstrando que existe circulação do fungo entre esses roedores. Portanto, torna-se possível a transmissão da esporotricose para os gatos, uma vez que é um hábito comum dos felinos caçarem ratos. Os gatos machos jovens, não castrados e com acesso irrestrito à rua são os mais acometidos e envolvidos na dispersão de *Sporothrix* spp. no ambiente, além da transmissão do fungo a outros animais e seres humanos (Dunstan et al., 1986; Davies e Troy, 1996; Schubach et al., 2004a).

As classificações das formas clínicas da esporotricose em seres humanos são: cutânea-fixa, linfocutânea, extracutânea e disseminada (Barros et al., 2011). Como os gatos com esporotricose podem apresentar mais de uma forma da doença concomitantemente, esta mesma classificação torna-se difícil. Nestes animais, a doença apresenta um amplo aspecto clínico,

variando desde uma infecção subclínica, passando por lesões cutâneas únicas até formas múltiplas e sistêmicas, acompanhadas ou não de sinais extracutâneos, como as manifestações respiratórias (Schubach et al., 2004a), como demonstrado na figura 1. Schubach e colaboradores (2004a) propuseram uma classificação de acordo com o número e as localizações das lesões cutâneas, descrevendo como L0, o animal que apresenta ausência de lesões cutâneas, L1 apresentando lesões cutâneas em um local, L2 apresentando lesões cutâneas em dois locais não contíguos e L3 apresentando lesões cutâneas em três ou mais locais não contíguos.

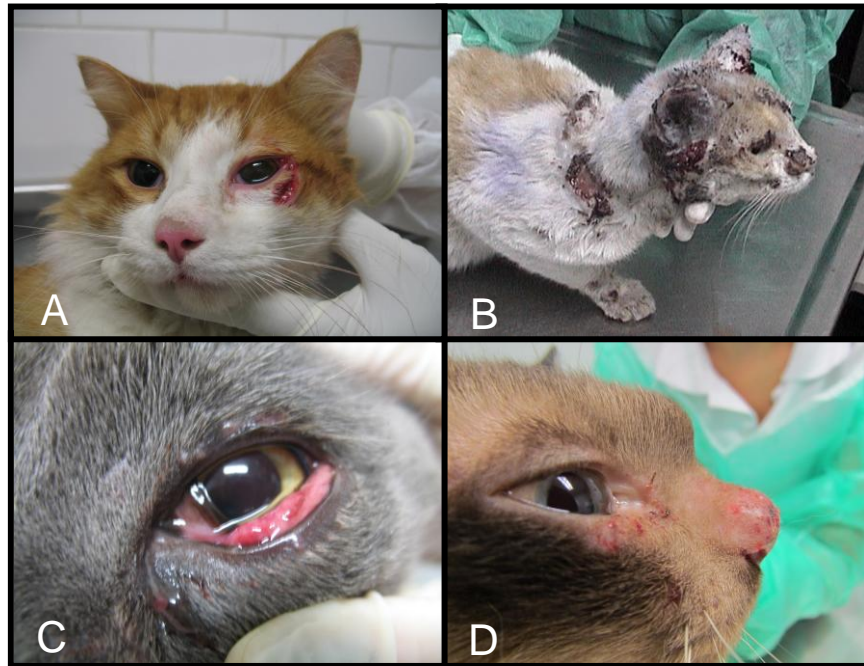


Figura 1: Gatos atendidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses/INI no período de 2006 a 2010, apresentando diferentes tipos de lesões causadas pela esporotricose. (A) Animal apresentando úlcera única em face. (B) Múltiplas úlceras na região da cabeça e pescoço. (C) Lesão em mucosa conjuntival. (D) Nódulo e aumento de plano nasal.

As lesões cutâneas mais frequentes em gatos são nódulos, gomas e úlceras (Schubach et al., 2004a). A maioria dessas lesões está localizada na cabeça, extremidades dos membros e cauda (Rosser e Dunstan, 2006). Cerca de 40% dos gatos com esporotricose apresentam lesões cutâneas em três ou mais localizações não contíguas (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010).

Linfadenite, linfangite nodular ascendente e lesões mucosas podem estar presentes nos gatos com esporotricose. Febre, desidratação, perda de peso e anorexia também podem ser observadas (Schubach et al., 2004a). A presença de sinais respiratórios é frequente em gatos com esporotricose, principalmente os espirros, os quais podem estar associados à lesão na região nasal, inclusive em mucosa (Schubach et al., 2004a). Em estudos sobre esporotricose felina realizados no INI, a frequência de sinais respiratórios variou de 44,4% (Schubach et al., 2004a) a 66,7% (Reis et al., 2012). Em um estudo sobre a terapêutica da esporotricose felina, a presença de sinais respiratórios esteve associada ao risco de falência terapêutica e óbito (Pereira et al., 2010).

Na esporotricose felina o amplo espectro de manifestações clínicas, a gravidade da doença e os baixos índices de cura clínica observados na endemia do Rio de Janeiro podem estar associados à espécie fúngica. Além disso a presença de acentuado infiltrado inflamatório piogranulomatoso, alta carga fúngica, extensão das lesões para a mucosa, cartilagem e ossos do nariz dos gatos e formas disseminadas atingindo órgãos internos são um indicativo da alta virulência do agente circulante na área endêmica do Rio de Janeiro (Schubach et al., 2003b; Gremião et al., 2015).

Os retrovírus FIV e FeLV deprimem o sistema imunológico do animal, favorecendo infecções por outros agentes. Existem poucos estudos sobre a associação entre estas infecções e a esporotricose, e até o momento não foi demonstrada correlação entre elas (Schubach, et al., 2004a; Miranda et al., 2012). Entretanto, em humanos que apresentam a AIDS, a esporotricose apresenta importante correlação como uma infecção oportunista (Freitas et al., 2012).

O tratamento da esporotricose felina, diferente do que é observado nos humanos, em muitos casos representa um desafio e um esforço em longo prazo para os veterinários (Pereira et al., 2010). O tempo de tratamento é longo, a administração dos fármacos por via oral é problemática e a adesão do responsável pelo gato ao tratamento é baixa (Chaves et al., 2013).

O itraconazol e o cetoconazol são os antifúngicos mais relatados no tratamento da esporotricose felina, sendo que o primeiro é o fármaco de eleição (Pereira et al., 2010). Os iodetos de potássio e sódio, a terbinafina, a anfotericina B, a termoterapia local, a remoção cirúrgica das lesões cutâneas (Pereira et al., 2009) e a criocirurgia (Pereira et al., 2014) representam outras opções de tratamento. O triazólico posaconazol mostrou bons resultados nos testes de susceptibilidade a antifúngicos, também representando uma opção para o tratamento da esporotricose (Marimon et al., 2008).

O itraconazol é utilizado, na medicina veterinária, com sucesso no tratamento de diversas micoses em gatos, sendo considerado o fármaco de eleição para o tratamento da maioria dos casos de esporotricose, uma vez que este tem sido usado de forma efetiva e segura, com baixa toxicidade e boa tolerância, mesmo por longos períodos de tratamento (Greene, 2012). Ultimamente, o cetoconazol tem sido substituído pelo itraconazol no tratamento das micoses em gatos, exceto quando o baixo custo do primeiro superar as vantagens do itraconazol (Pereira et al., 2009).

Os dois maiores estudos sobre terapêutica da esporotricose felina foram realizados no Rio de Janeiro por Schubach e colaboradores (2004a) e Pereira e colaboradores (2010). Schubach e colaboradores (2004a) estudaram 266 gatos com esporotricose e avaliaram diferentes esquemas terapêuticos, com a utilização de cetoconazol, itraconazol, iodeto de sódio, fluconazol e terbinafina. A cura clínica foi obtida em 25,4% dos casos e a duração do tratamento variou de 16 a 80 semanas (mediana = 36 semanas). Entretanto, o número de abandonos e mortes por diferentes causas somou 69,7%, explicitando o alto índice de não adesão ao tratamento e não permitindo a mensuração da eficácia de cada esquema terapêutico utilizado.

Pereira e colaboradores (2010) avaliaram a efetividade e a segurança do tratamento com os azólicos cetoconazol e itraconazol em 773 gatos com esporotricose, cujo critério de inclusão foi o tratamento oral com um dos azólicos por um período mínimo de dois meses. Destes, 30,8% obtiveram cura, 13,6% foram a óbito por diferentes causas e 55,6% abandonaram ou ainda se encontravam em tratamento no momento da análise. A mediana do tempo de tratamento até a cura foi 28 semanas. Com esses resultados, os autores demonstraram uma maior efetividade com a utilização do itraconazol quando comparado aos animais tratados com cetoconazol.

O triazólico posaconazol demonstrou uma boa resposta em testes de susceptibilidade antifúngica *in vitro* contra isolados de *Sporothrix* podendo representar uma alternativa no tratamento da esporotricose sistêmica (Marimon et al., 2008b; Pereira et al., 2010). Entretanto, não foram encontrados estudos clínicos utilizando posaconazol em felinos.

Existem poucos relatos sobre a utilização do triazólico fluconazol em felinos, sendo utilizado em um gato com múltiplas lesões cutâneas e sinais respiratórios que obteve a cura clínica. No entanto, o animal apresentou recidiva logo após a interrupção do tratamento (Crothers et al., 2009).

O iodeto de potássio é uma alternativa para o tratamento da esporotricose humana, devido ao baixo custo e efetividade (Yamada et al., 2011), principalmente em áreas endêmicas economicamente desfavorecidas (Bustamante e Campos, 2004; Bustamante e Campos, 2010; Vasquez-Del-Mercado et al., 2012). Existem poucos casos descritos com a utilização dos iodetos no tratamento da esporotricose felina e os resultados obtidos são controversos (Pereira et al., 2009). O estudo que apresenta a maior casuística com iodeto de potássio, sem tratamento prévio com antifúngicos orais, foi conduzido por Reis e colaboradores (2012), no qual foram incluídos 48 gatos com esporotricose. O percentual de cura obtido neste estudo (48%) foi superior ao descrito previamente para o itraconazol (38%) (Pereira et al., 2010). Apesar da ocorrência elevada de efeitos adversos clínicos (52,1%), estes foram reversíveis com a diminuição da dose ou interrupção temporária do fármaco.

A terbinafina é um antifúngico que apresenta alta atividade *in vitro* contra isolados de *Sporothrix* sp. (Marimon et al., 2008b). Entretanto, sua resposta terapêutica é considerada satisfatória somente para esporotricose cutânea e linfocutânea em seres humanos (Francesconi et al., 2009).

A anfotericina B tem sido indicada para o tratamento de micoses sistêmicas e esporotricose disseminada em seres humanos e animais (Kauffman et al., 2007). Poucos são os relatos sobre a utilização desse fármaco na esporotricose felina. Em casos de esporotricose felina com falência terapêutica ao itraconazol, a associação da anfotericina B, via subcutânea (SC) ou intralesional, pode ser utilizada como uma opção de tratamento (Gremião et al., 2009; Gremião et al., 2011, Gremião et al, 2015).

O longo período de tratamento e a aquisição da doença por um membro da família são fatores que levam ao frequente abandono e à solicitação de eutanásia pelo responsável (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2009). Segundo Chaves e colaboradores (2013), o abandono do tratamento ocorre principalmente no momento em que o responsável pelo animal observa melhora das lesões cutâneas e/ou sinais clínicos, não retornando para o acompanhamento clínico e terapêutico. A cura, a falência terapêutica, a recorrência e os efeitos adversos ocorrem independentes do esquema terapêutico utilizado (Schubach et al., 2004a).

1.4. Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico definitivo requer o isolamento do fungo em meio de cultura (Rippon, 1988), sendo esta metodologia considerada padrão de referência para o diagnóstico da esporotricose. *Sporothrix* spp., na natureza ou em meio de cultura rico em nutrientes, a temperatura ambiente ou a 25°C, cresce na forma filamentosa; enquanto que em parasitismo ou em meio de cultura a 37°C, encontra-se na forma de levedura (Kwon-Chung e Bennet, 1992). A cultura pode ser realizada inicialmente em meio de ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol ou ágar Mycosel a 25°C por cinco a sete dias, podendo as vezes ser um tempo maior. Após o crescimento de um fungo hialino na forma filamentosa que com o tempo adquire a capacidade de produzir melanina, este é inoculado em meio de infusão de cérebro e coração (BHI) e incubado a 37°C por cinco a sete dias, visando à conversão do fungo para a forma leveduriforme, com aspecto cremoso e coloração amarelada, concluindo-se assim o diagnóstico micológico (Rippon, 1988; Barros et al., 2011). As culturas que serão consideradas negativas devem ser mantidas por pelo menos 4 semanas (Rippon, 1988). A técnica de cultura caracteriza o fungo como *Sporothrix* spp. ou *Sporothrix schenckii latu sensu*. Para a caracterização das espécies torna-se necessário a aplicação de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares (Oliveira et al., 2011).

Nos gatos, os exames citopatológico e histopatológico são úteis no diagnóstico presuntivo desta micose (Pereira et al., 2011). No exame citopatológico do exsudato das lesões de gatos com esporotricose, observa-se grande quantidade de estruturas leveduriformes arredondadas, ovais ou em forma de charuto dentro dos macrófagos e neutrófilos ou no meio extracelular, sendo as colorações mais indicadas nas técnicas citopatológicas são as do tipo Romanowsky, como o método panótico rápido (Pereira et al., 2011). Em contraste com os felinos, os cães com esporotricose apresentam pequena quantidade de estruturas leveduriformes, o que prejudica a realização do exame citopatológico nesses animais (Pereira et al., 2011), o mesmo acontece com os exames diretos realizados em seres humanos (Barros et al., 2011).

No exame histopatológico predominam lesões granulomatosas supurativas com granulomas mal formados, estes apresentam uma predominância de macrófagos e frequentemente grande quantidade de leveduras (Miranda et al., 2013). A utilização de técnicas histológicas como a imuno-histoquímica para identificação de *Sporothrix* a partir de lesões em seres humanos, cães

e gatos, apresenta resultados satisfatórios. Assim, esta técnica permite a identificação específica do agente etiológico, melhorando a efetividade do exame histopatológico. Contudo, a indicação e o custo-benefício da utilização dessa técnica devem ser avaliados (Miranda et al., 2011).

De acordo com o tipo e a localização da lesão, diferentes amostras biológicas podem ser coletadas para isolamento do fungo (Schubach et al., 2002). Secreção nasal e exsudato de lesões cutâneas ou mucosas podem ser obtidas através de um *swab* estéril (Schubach et al., 2003b). Também podem ser enviados para o cultivo fragmentos de lesões cutâneas ou mucosas obtidos por biópsia, aspirado de conteúdo purulento ou seropurulento proveniente de abscesso não ulcerado (Schubach et al., 2004a), sangue (Schubach et al., 2003a), unhas (Schubach et al., 2001) e lavado broncoalveolar (Leme et al., 2007).

Embora a cultura seja o padrão de referência para a detecção da esporotricose, técnicas sorológicas e moleculares têm sido recentemente adotadas como ferramentas auxiliares para o diagnóstico (Barros et al., 2011). A sorologia se mostra como uma alternativa viável de diagnóstico da esporotricose felina, particularmente em casos com resultados negativos aos métodos micológicos (Fernandes et al., 2011).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos moleculares baseados na detecção de DNA para identificação de isolados fúngicos promoveu uma redução no tempo do diagnóstico, mantendo ou melhorando a especificidade, sensibilidade e precisão quando comparado à cultura fúngica. Poucos métodos moleculares têm sido aplicados na detecção de DNA de *S. schenckii* a partir de espécimes clínicos e na identificação de *Sporothrix* em cultura (Oliveira et al., 2014a). Porém, um estudo recente demonstrou a identificação rápida de *S. schenckii* a partir de biópsia de tecido humano através da PCR, superando a cultura fúngica, que apresenta baixa sensibilidade e o tempo consumido no procedimento (Liu et al., 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Desde 1998 ocorre uma epidemia de esporotricose com transmissão zoonótica envolvendo seres humanos, cães e gatos na região metropolitana do Rio de Janeiro. Somente no INI/Fiocruz foram diagnosticados ao longo dos últimos 17 anos mais de 8.000 casos entre seres humanos e animais.

Os isolados felinos têm sido formalmente classificados como *S. schenckii* ao longo da epidemia. Entretanto, recentemente, técnicas para caracterização de espécies dentro do complexo *Sporothrix* têm sido realizadas em isolados humanos da mesma região e a espécie *S. brasiliensis* foi descrita como o agente etiológico em aproximadamente 90% dos casos.

Estudos que envolvam a caracterização dos isolados clínicos de gatos dentro do complexo *Sporothrix* são escassos e a associação com os dados clínicos e epidemiológicos destes animais ainda não foi realizada.

Desde o início da epidemia que ocorre no Rio de Janeiro até a publicação dos resultados do estudo conduzido por Rodrigues e colaboradores (2013a) que incluiu 15 isolados felinos do Rio de Janeiro, os isolados felinos eram classificados como *S. schenckii*. O estudo dos isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos participantes de um ensaio clínico, realizado em um cenário epidemiológico único até o momento, constitui uma oportunidade singular para caracterização destes isolados a nível de espécie e a sua associação com as características clínicas e epidemiológicas dos gatos.

3. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os isolados clínicos de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos da região metropolitana do Rio de Janeiro e correlacioná-los com as características clínicas e epidemiológicas desses animais.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Avaliar as características fenotípicas e moleculares dos isolados clínicos de *Sporothrix* spp. dos gatos;
- b) Verificar a frequência das espécies do complexo *Sporothrix*;
- c) Avaliar a associação das características clínicas e epidemiológicas com o desfecho do tratamento;
- d) Avaliar as características clínicas e epidemiológicas dos gatos e correlaciona-las com as espécies de *Sporothrix* identificadas;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo.

4.2. Casuística

Foi utilizada uma amostra de conveniência constituída de 47 isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos participantes de um ensaio clínico fase IV, randomizado, duplo-cego e controlado de duas diferentes doses de cetoconazol e itraconazol, realizado no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz (Licença CEUA/Fiocruz L-041/06) no período de 2006 a 2010.

4.3. Materiais, Procedimentos e Técnicas

4.3.1. Isolados de *Sporothrix* spp.

Foram utilizados isolados clínicos provenientes de lesões cutâneas dos gatos antes da instituição do tratamento antifúngico. Estes isolados estavam sob a guarda do LabMicol/INI/Fiocruz. As amostras foram classificadas durante o período do ensaio clínico e, posteriormente, os isolados fúngicos viáveis provenientes de felinos foram armazenados em leite desnatado 10% (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Switzerland), a -20°C. Para as amostras serem consideradas viáveis, elas foram cultivadas em ágar batata dextrose – PDA (Difco™; Becton, Dickinson and Company, Sparks MD EUA) a 25°C e posteriormente identificadas morfolologicamente, através de aspectos macroscópicos e microscópicos de suas colônias (Figura 2).

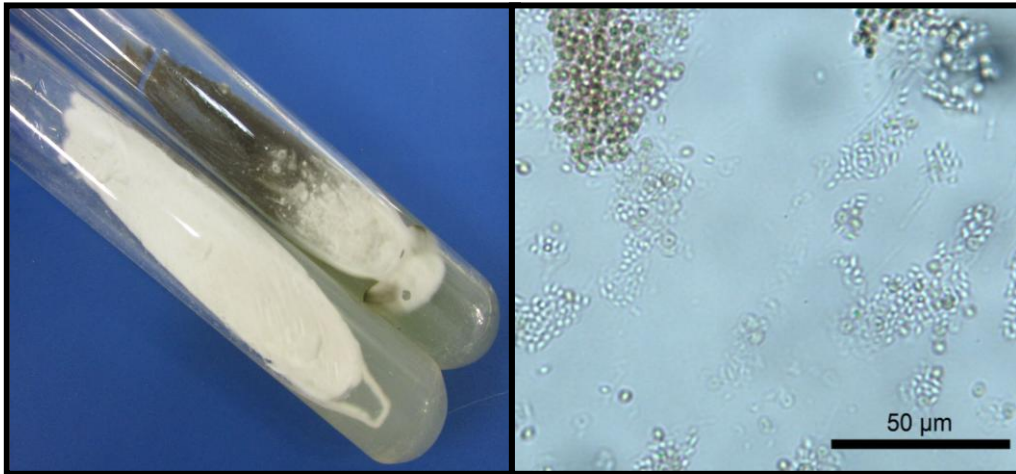


Figura 2: (A) Colônias (IPEC8695 e IPEC8509) cultivadas em PDA a 25°C após 7 dias de crescimento, que foram consideradas viáveis para o armazenamento em leite desnatado a 10%, apresentando colônias de textura lisa, branco acizentada, tornando-se escurecidas com o passar dos dias. (B) Micromorfologia da forma filamentosa da colônia IPEC8718 em lâmina corada com lactofenol, apresentando hifas finas, hialinas e septadas com conídios ovóides e soltos, podendo ser demáceo ou hialino (Aumento 400x).

4.3.2. Estudo morfológico

O dimorfismo fúngico foi demonstrado através da conversão para a forma de levedura através de incubação em meio infusão de cérebro e coração (*Brain Heart Infusion – BHI*) (Difco™, Beckton, Dickinson & Company, Sparks MD EUA) durante 7 dias em estufa a 37°C (Rippon, 1988). Colônias da forma filamentosa dos isolados cultivados em PDA, por 7 dias, foram examinadas visualmente quanto à produção de pigmento negro correspondente à produção de melanina DHN (Almeida-Paes et al., 2009).

A fim de estudar a conidiogênese, isolados foram sub-cultivados em ágar farinha de milho (BBL™, BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e incubados a 30°C em ambiente escuro. Após 10 dias, as características microscópicas foram determinadas usando lactofenol no preparo de lâminas, como descrito anteriormente (de Meyer et al., 2008) para a identificação da micromorfologia do gênero *Sporothrix*.

4.3.3. Estudos fisiológicos

Os isolados clínicos foram cultivados em placas de Petri de tamanho 90x15mm contendo 20 mL de PDA e, posteriormente, incubadas a 30°C. Para incubação a 37°C foram utilizadas placas menores de tamanho 50x10mm contendo 5 mL de PDA. As placas foram inoculadas centralmente com um fragmento fúngico de aproximadamente 1 mm de diâmetro e colocados virados para baixo, para certificação de que o fungo está em contato com o meio de cultura. Após 21 dias de incubação, foi verificada ausência ou presença de crescimento fúngico, bem como a determinação do diâmetro das colônias filamentosas nas respectivas temperaturas, com auxílio de uma régua milimetrada (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2011). Os cultivos foram realizados em duplicata e foi considerada a média dos diâmetros das colônias (Marimon et al., 2007).

Para os testes de assimilação de carboidratos foram, primeiramente, utilizadas microplacas de 96 poços, onde em cada coluna foi colocado 100 µL de meio de cultura *Yeast Nitrogen Base* - YNB (Difco) acrescidos de 50 µL de sacarose ou rafinose, a uma concentração de 0,5%, exceto nos poços do controle negativo. Os poços do controle negativo foram acrescidos de 50 µL de água destilada estéril e os dos controles positivos foram acrescidos de 50 µL de glicose para posteriormente serem armazenadas a – 20°C.

O inóculo foi preparado utilizando 2 mL de água destilada estéril filtrada no tubo contendo PDA com o fungo semeado. Posteriormente, foi realizada a fricção nas colônias com a ponta de uma pipeta e posteriormente foi retirado 1 mL e adicionado a um tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL de volume. A solução de inóculo utilizado continha 2×10^5 até 2×10^6 CFU/mL. Para conferir se o inóculo estava na concentração adequada foi realizada a leitura da densidade ótica da solução a 530 nm de comprimento de onda em um espectrofotômetro. A concentração adequada deveria estar entre 0,21 e 0,29. Para as amostras que estavam com densidade acima de 0,29, foi acrescentada água destilada estéril para a diluição. Por sua vez as amostras que estavam com densidade abaixo de 0,21 foram concentradas após a adição de mais conídios, a partir da cultura original em PDA. Com todas as amostras dentro da concentração desejada, aplicou-se 50 µL da solução do inóculo na placa preparada com o meio de cultura YNB junto aos substratos, dispostos sempre na sequência: controle negativo – controle positivo – sacarose – rafinose (Figura 3). Ao final da aplicação da solução na placa todos os poços continham um volume total de 200 µL. Como controle positivo da utilização de sacarose e

rafinose aplicadas na placa foi utilizada a cepa do fungo *Rhodotorula* sp. (IPEC41978), que é considerado um fungo oportunista, e foi utilizado, uma vez que, assimila ambos os açúcares testados.

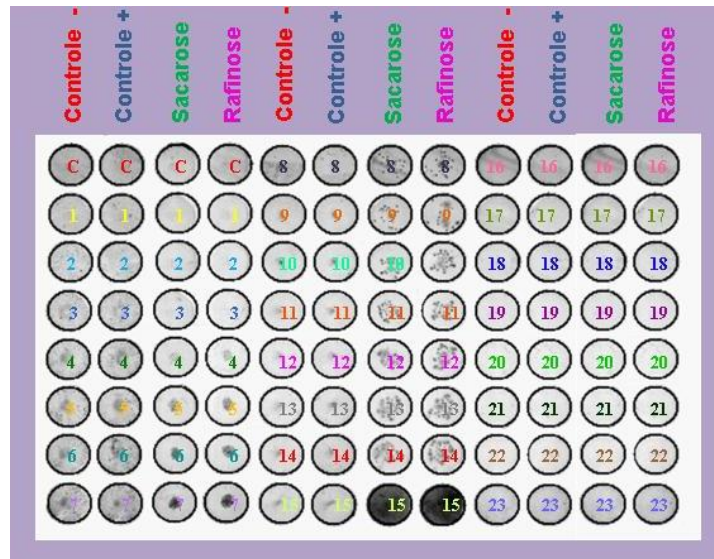


Figura 3: Esquema demonstrando a disposição dos açúcares testados e controles positivo e negativo na placa utilizada para realização do teste de assimilação de carboidratos. (C) Controle: *Rhodotorula* sp. (1 ao 23) Amostras testadas. (Fonte: Oliveira, 2013)

Foram realizadas duas leituras das placas, após 5 e 10 dias de incubação a 25°C (Marimon et al., 2007; Oliveira et al., 2010). Os experimentos foram realizados pelo menos três vezes e, em caso de resultados discordantes, foram repetidos mais duas vezes.

Após os 10 dias de incubação, foram lidos os meios contendo sacarose e rafinose, sendo considerados positivos os meios com crescimento semelhante ao do meio com glicose, ou seja, com crescimento fúngico no poço inoculado e negativo aqueles semelhantes ao meio de cultura sem carboidrato, logo, sem nenhum crescimento fúngico. Este experimento foi realizado no mínimo duas vezes para cada um dos isolados. O experimento seria invalidado e repetido se não houvesse crescimento no controle positivo de *Rhodotorula* sp. (IPEC41978).

Após a obtenção dos resultados dos testes morfológicos e fisiológicos a espécie de cada isolado foi definida quando comparada com o perfil fenotípico de cada espécie (Quadro 1).

Quadro 1: Chave de identificação para cada espécie do gênero *Sporothrix* (Oliveira, 2013a-Adaptada de Marimon et al., 2007)

Espécie	Conídio sésil e demáceo	Diâmetro da colônia >50mm	Termotolerância 37°C	Assimilação de açúcar	
				Sacarose	Rafinose
<i>S. pallida</i>	Não	Sim	Sim	+	-
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+
<i>S. luriei</i>	Não	Sim	Sim	-	-

4.3.4. Identificação Molecular

4.3.4.1. Extração do DNA

A extração foi realizada com colônias filamentosas com crescimento de 10 a 14 dias cultivados em PDA, onde foi realizada a raspagem do fungo com estilete de platina e adicionadas cerca de 500 µL de material em tubo do tipo Eppendorf de 1,5 mL. Para a maceração e consequente lise da parede e membrana das células para a liberação do material nuclear, foi utilizado nitrogênio líquido e a maceração feita com pistilos. O tampão de lise, TES (EDTA 50mM, Sacarose 20%, Tris Base 1M, pH final = 8,0), foi adicionado para manter o pH ótimo da solução que impede a ação das nucleases que degradam o DNA. Essa solução passou por um aquecimento à 100°C por 5 minutos. Após estas etapas as amostras passaram por uma série de centrifugações, que consistiam em duas centrifugações de 13.000rpm, uma com tempo de duração de 10 minutos e a segunda com três minutos, e cinco centrifugações de 14.000rpm, quatro de 10 minutos e uma de 30 minutos. As centrifugações eram realizadas com a intenção de obter um melhor rendimento da amostra e eliminar debris celulares.

Para precipitação de proteínas da solução foi utilizado o clorofórmio álcool-isoamílico (24:1) e realizadas no máximo três vezes. Posteriormente, foram utilizadas soluções de acetato de sódio 3M e etanol 100% para a precipitação do DNA. O etanol 100% foi utilizado para precipitar

o DNA e para remoção de resíduos do clorofórmio álcool isoamílico. Uma vez formado o *pellet*, uma última lavagem foi realizada com o etanol 70% para dessanilizar o DNA, promovendo lavagem do etanol 100% e do acetato de sódio 3M. A última etapa da extração é a secagem do etanol 70% e utilização de água miliq estéril para a dissolução do *pellet*, que é armazenado a 4°C *overnight* para a sua completa hidratação (Woods et al., 1993 modificado por Oliveira et al., 2011). DNA foi quantificado utilizando 2 µL do DNA hidratado no espectrofotômetro, Nano Vue™ Plus (GE Healthcare), e diluído para uma concentração de 25ng para que as reações pudessem ser realizadas. Posteriormente todas as amostras diluídas foram armazenadas a -20°C.

4.3.4.2. PCR T3B *fingerprinting*

A PCR T3B *fingerprinting* utiliza o “primer” inespecífico T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') para a distinção das espécies do complexo *Sporothrix* spp., além de avaliar a similaridade genética (Oliveira et al., 2012). O “primer” T3B foi inicialmente desenvolvido para identificação de *Streptococcus* spp., e tem sido utilizado com sucesso na identificação de espécies de leveduras que pertencem ao género *Candida* (Correia et al., 2004). Cepas de *S. brasiliensis* (IPEC16490), *S. globosa* (IPEC27135), *S. mexicana* (MUM11.02) e *S. schenckii* (IPEC27722) foram utilizados como controles. Para o preparo do *mix* da reação da PCR utilizou-se 2,5 µL *buffer* 10x com KCl, 0,5 µL de dNTP a 0,2mM, 2 µL de MgCl₂ a 50mM, 0,2 µL de *platinum* TAQ DNA polimerase, 1 µL do *primer* T3B e 15,8 µL de água estéril, completando o volume de 22 µL do *mix* para cada amostra.

As condições para a amplificação realizada no termociclador, C1000™ Thermal Cycler (Bio Rad), foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida por 36 ciclos de desnaturação de 1 minuto a 95°C, hibridização a 50 segundos a 52°C e extensão por 1 minuto a 72°C e posteriormente extensão final por 10 minutos a 72°C. Ao final, o material foi resfriado a 10°C e a reação finalizada. Esta técnica gera bandas distintas para cada espécie do complexo *Sporothrix*, permitindo assim, a diferenciação entre elas (Oliveira et al., 2012).

A eletroforese visa a separação de moléculas de acordo com suas cargas elétricas, seus pesos moleculares e suas conformações, em gel de agarose e tampões apropriados, sob a influência de um campo elétrico contínuo. Moléculas de menor peso molecular terão mais facilidade em atravessar a malha do gel, se posicionando assim mais próximas do catodo (polo

positivo), enquanto as moléculas com maior peso apresentam maior dificuldade e se posicionam mais próximas do anodo (polo negativo).

Após o processo no termociclador, foi realizada a corrida eletroforética, para tal foi confeccionado gel de agarose a 1,2%. As amostras de DNA foram pipetadas junto ao marcador, nos respectivos poços. A eletroforese foi realizada a uma voltagem de 70 A, com o gel imerso em solução de TBE 0,5%. Após o tempo necessário para a ocorrência da eletroforese, o gel era retirado e colocado em banho de brometo de etídio por 30 minutos, para que as bandas fossem coradas e pudessem ser visualizadas após a revelação.

Os perfis da PCR T3B *fingerprinting* foram analisados utilizando software NTSYS 2.0 (Applied Biosystem). A análise de *cluster* foi realizada por meio de métodos de grupo não ponderadas, SAHN.

4.3.5. Análise dos dados dos animais

Para a análise do banco de dados dos gatos incluídos no estudo, foi considerado para os desfechos clínicos:

- Cura clínica → cicatrização completa das lesões e remissão de todos os sinais clínicos relacionados à esporotricose;
- Falência terapêutica → ocorrência da estagnação ou piora do quadro clínico por dois meses consecutivos de tratamento com antifúngico;
- Abandono do tratamento → não comparecimento para avaliação clínica/laboratorial em duas revisões mensais consecutivas;
- Óbito → animal que vinha a óbito, podendo ser devido a doença ou por qualquer outra causa.

Consideramos para este trabalho como desfechos desfavoráveis a falência terapêutica, o abandono de tratamento, o óbito pela esporotricose e óbito por outra causa.

Para a variável estado geral, foi considerado:

- Bom → condição corporal ideal, normorexia, defecação e micção normais, normotermia e animal alerta;

- Regular → magreza, hiporexia, alterações nas funções digestivas e urinárias, desidratação leve, temperatura corporal normal ou alterada, estado de alerta pode estar afetado;
- Ruim → magreza ou caquexia, hipo ou anorexia, distúrbios gastrintestinais ou urinários, desidratação severa, temperatura corporal alterada, estado de alerta alterado.

Quanto à observação e classificação da linfadenopatia nos gatos incluídos, foram considerados os seguintes aspectos:

- Linfadenopatia localizada → palpação com observação de aumento do linfonodo em um sítio anatômico;
- Linfadenopatia generalizada → palpação com observação de aumento do linfonodo em dois ou mais sítios anatômicos.

Foram considerados como sinais respiratórios: espirros, dispnéia, rinorréia e tosse. Para lesões cutâneas foram considerados eritema, pápula, nódulo, goma, ulceração, tumoração, necrose, rarefação pilosa, alopecia e escoriações. Lesões em mucosa nasal, oral, conjuntival, genital e anal foram consideradas em nossas análises. Rinite funcional foi considerado devido a ocorrência de obstrução nasal, com presença de lesões, além de espirro e/ou secreção nasal.

Para distribuição de lesões cutâneas foi utilizada a classificação proposta por Schubach e colaboradores (2004a):

- L0 → ausência de lesões cutâneas
- L1 → presença de lesões cutâneas em 1 local não contíguo
- L2 → presença de lesões cutâneas em 2 locais não contíguos
- L3 → presença de lesões cutâneas em 3 ou mais locais não contíguos

5. PLANO DE ANÁLISE

A análise exploratória de dados foi realizada através da descrição de frequências. Foram descritas as frequências simples de cada espécie do complexo *Sporothrix* dos isolados felinos, assim como das variáveis clínicas dos gatos (distribuição das lesões cutâneas, ocorrência de linfadenopatia, presença de sinais respiratórios, de lesão mucosa e resposta terapêutica) e

variáveis epidemiológicas (procedência e possível forma de infecção do gato), ambas descritas em fichas clínicas individuais do ensaio clínico. Na verificação de associação entre variáveis categóricas, foi empregado o teste exato de Fisher e o teste qui-quadrado de Pearson. Para a correlação de amostras relacionadas foi utilizado o teste de Wilcoxon.

P-valores < 0,05 indicaram associações significativas nos testes estatísticos. Os dados serão armazenados num banco informatizado e processados utilizando o *software Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 16.0.

6. RESULTADOS

6.1. Dados clínicos e epidemiologia

Dos 47 gatos incluídos neste estudo, 35 (74,5%) eram machos, 43 (91,5%) não apresentavam raça definida, a idade mediana foi 36 meses (6-96 meses). Vinte e oito gatos (59,6%) não eram castrados, 40 (85,1%) tinham acesso ao ambiente extradomiciliar e os responsáveis por 32 animais (68,1%) relataram que estes costumavam brigar com outros gatos, concluindo-se que a possível forma de transmissão tenha sido por arranhadura e/ou mordedura. Trinta e cinco gatos (74,5%) residiam no município do Rio de Janeiro, sete (14,9%) em Nova Iguaçu, três (6,4%) em São João de Meriti, e dois (4,2%) em Duque de Caxias. Dentre os 35 animais que residiam no município do Rio de Janeiro, 22 (46,8%) moravam em bairros localizados na zona norte e 13 (27,7%) em bairros da zona oeste.

Na primeira consulta clínica, 42 (89,4%) apresentavam bom estado geral e todos apresentavam bom estado de hidratação. As lesões cutâneas estavam presentes em 45 (95,7%) gatos, dos quais 97,9% apresentavam úlceras e 17% nódulos, os outros dois animais apresentavam apenas lesão em mucosa. Com relação a distribuição de lesões, 15 (31,9%) animais foram considerados como L1, 16 (34%) como L2 e 16 (34%) como L3. A linfadenopatia, local ou generalizada, estava presente em 42 (89,4%) animais. A conjuntivite foi observada em sete animais (14,9%). Os sinais respiratórios estavam presentes em 27 gatos (57,4%), destes 51,1% apresentavam espirros e 48,9% rinorréia. Dos 47 gatos, 20 (42,6%) apresentavam rinite funcional.

Vinte e dois gatos (46,8%) apresentavam lesões em mucosa, sendo destes 17 (36,2%) com lesões em mucosa nasal e cinco (10,6%) na conjuntiva. Dezesseis (34,1%) animais apresentavam concomitantemente lesões cutâneas, lesões em mucosa e sinais respiratórios e 18 (38,3%) apresentaram somente lesões cutâneas. Dez animais (21,3%) eram FeLV positivos, um (2,1%) era FIV positivo e um (2,1%) apresentou sorologia positiva para ambas as doenças.

Com relação ao desfecho desses animais após tratamento antifúngico com itraconazol ou cetoconazol, 17 (36,2%) obtiveram cura clínica e 30 (63,8%) obtiveram desfecho desfavorável para a esporotricose. Dentre os desfechos desfavoráveis observados, em 10 gatos (21,3%) foi observada a falência terapêutica, em 10 (21,3%) houve abandono do tratamento, seis (12,8%) foram a óbito devido à esporotricose, dois animais (4,3%) foram a óbito devido a alguma outra causa não relacionada à esporotricose e dois (4,3%) foram submetidos à eutanásia por solicitação do proprietário. A terapia antifúngica empregada foi cetoconazol ou itraconazol (50-100 mg/gato/dia/via oral), dos 47 animais, em 25 (53,2%) foi administrado itraconazol e em 22 (46,8%) cetoconazol.

Por meio do teste exato de Fisher e teste qui-quadrado de Pearson buscou-se a associação entre variáveis clínicas e epidemiológicas com o desfecho desses animais, onde foi possível observar que obtivemos significância estatística para a presença de sinais respiratórios, presença de rinite funcional e o *status* reprodutivo (Tabela 1). Foi realizada a associação entre o desfecho e as variáveis estado geral e lesões cutâneas, porém estas apresentavam grupos para comparação com número igual a zero, logo a realização da comparação entre grupos não foi possível.

Tabela 1: Correlação entre variáveis clínicas e epidemiológicas com o desfecho dos felinos assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas/FIOCRUZ no período de 2006 a 2010.

Variáveis		Cura n=17	Desfecho desfavorável n=30	p-valor (p<0,05)
<i>Estado geral</i>	Bom	17 (100%)	25 (83,3%)	-
	Regular	0	5 (16,7%)	
<i>Distribuição de lesões</i>	L1	8 (47,1%)	7 (23,3%)	0,133
	L2	6 (35,3%)	10 (33,3%)	
	L3	3 (17,6%)	13 (43,3%)	
<i>Sinais respiratórios</i>	Presente	6 (35,3%)	21 (70%)	0,032*
	Ausente	11 (64,7%)	9 (30%)	
<i>Lesões cutâneas</i>	Presente	15 (88,2%)	30 (100%)	-
	Ausente	2 (11,8%)	0	
<i>Lesões em mucosa</i>	Nasal	3 (17,6%)	14 (46,7%)	0,134
	Conjuntival	3 (17,6%)	4 (13,3%)	
	Ausente	11 (64,7%)	12 (40%)	
<i>Linfadenopatia</i>	Presente	15 (88,2%)	27 (90%)	1,000
	Ausente	2 (11,8%)	3 (10%)	
<i>Tratamento</i>	Itraconazol	11 (64,7%)	14 (46,7%)	0,362
	Cetoconazol	6 (35,3%)	16 (53,3%)	
<i>Castração</i>	Sim	12 (70,6%)	7 (23,3%)	0,002*
	Não	5 (29,4%)	23 (76,7%)	
<i>FIV/FeLV</i>	Positivo	3 (17,6%)	9 (30%)	0,492
	Negativo	14 (82,4%)	21 (70%)	
<i>Acesso à rua</i>	Sim	13 (76,5%)	27 (90%)	0,235
	Não	4 (23,5%)	3 (10%)	
<i>Rinite funcional</i>	Presente	3 (17,6%)	17 (56,7%)	0,014*
	Ausente	14 (82,4%)	13 (43,3%)	
<i>Sexo</i>	Fêmea	6 (35,3%)	6 (20%)	0,306
	Macho	11 (64,7%)	24 (80%)	

6.2. Caracterização fenotípica

6.2.1. Estudos morfológicos

Quanto ao aspecto macromorfológico, todas as colônias subcultivadas em meio PDA apresentaram aspecto aveludado ou liso. Destas colônias, 41 (87,2%) apresentavam coloração marrom, enegrecida ou branca com alguma produção de pigmento e em seis (12,7%) não se observou pigmentação (Figura 4).

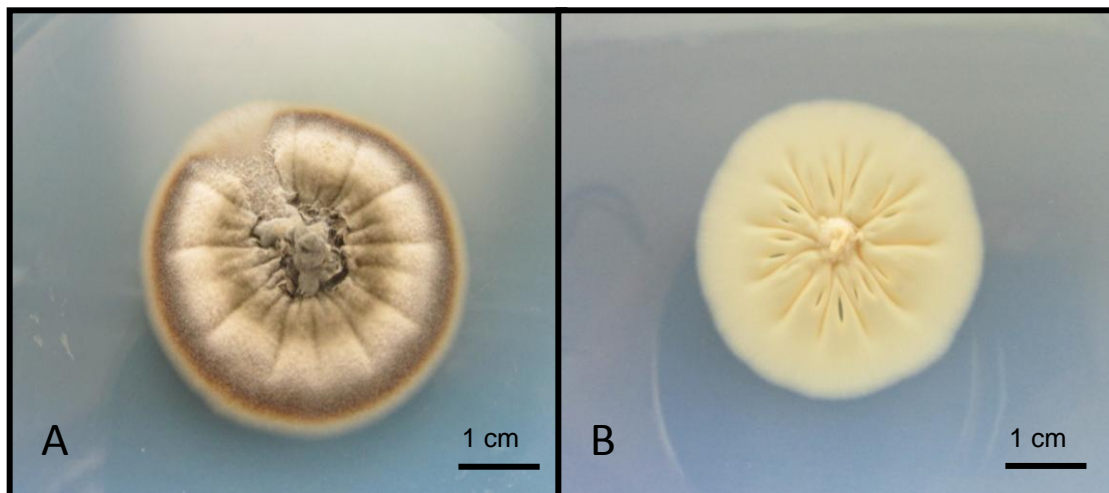


Figura 4: Macromorfologia das colônias de *Sporothrix* spp., cepas IPEC9042/1 e IPEC8607/1, cultivadas em meio PDA por 21 dias, para a avaliação da taxa de crescimento fúngico e observação da macromorfologia, apresentando colônias com aspecto liso ou aveludado com coloração branca acizentada

Com relação à micromorfologia, todas as 47 colônias apresentaram hifas finas, hialinas e septadas. Quarenta e seis (97,8%) colônias apresentaram conídios hialinos e demáceos e em um isolado (2,1%) observou-se somente a presença de conídios hialinos em CMA. Porém, macroscopicamente em PDA, essa colônia apresentou coloração marrom demonstrando assim a produção de melanina pelo fungo (Figura 5).

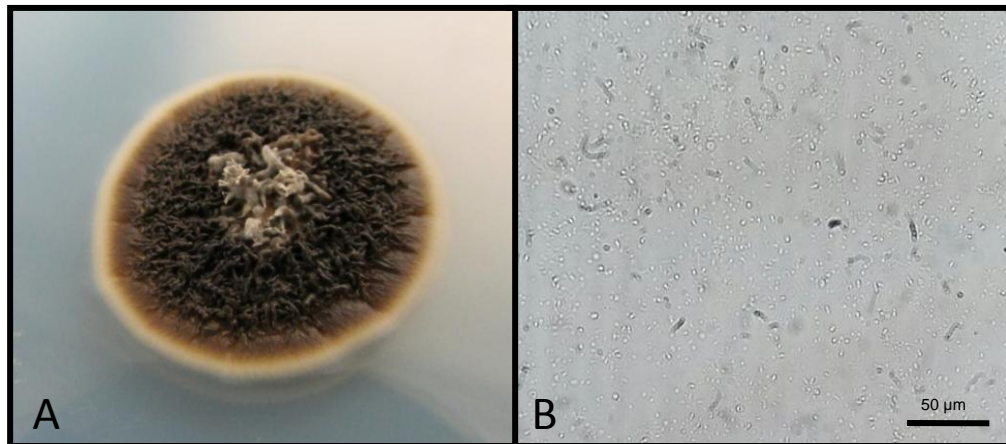


Figura 5: (A) Macromorfologia da colônia de um isolado de *Sporothrix* spp., cepa IPEC8723/1, cultivado em meio PDA, após 21 dias de incubação, apresentando coloração amarronzada, o que demonstra produção de pigmento. (B) Micromorfologia, do mesmo isolado, cultivado em CMA, apresentando apenas conídios hialinos, não justificando a presença de pigmento na macromorfologia (aumento 400X).

Os conídios demáceos apresentaram formato globoso, subgloboso ou em forma de pera e os conídios hialinos apresentaram formato fino e alongado. Além disso, a presença do conidióforo simpodial pôde ser visualizada, como demonstrado na figura 6. Nenhum conídio com formato triangular foi encontrado em nossos isolados. Nas seis colônias, onde a macromorfologia não apresentou pigmentação, foi possível observar a presença tanto de conídios demáceos, quanto de conídios hialinos.

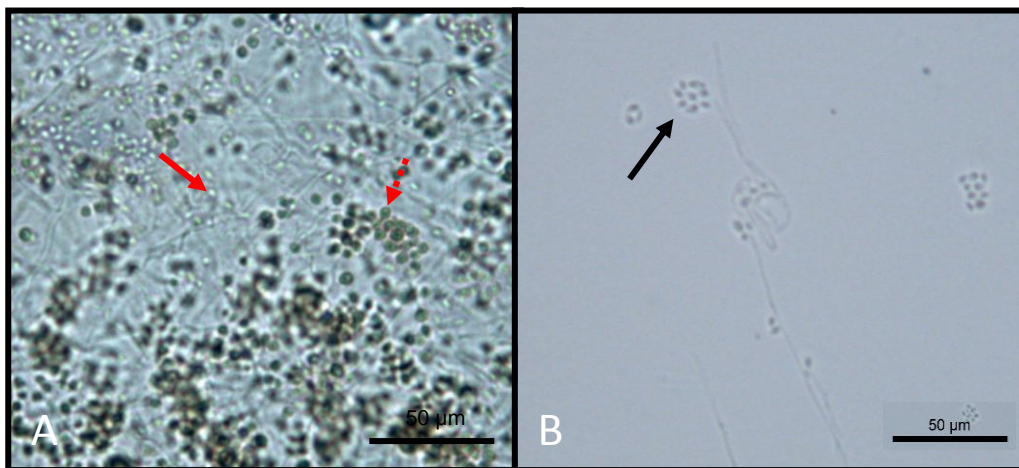


Figura 6: Micromorfologia da forma filamentososa corado com lactofenol (aumento de 400X). (A) Seta contínua indica conídio hialino e seta tracejada indica conídio demáceo. (B) Conidióforo simpodial ao longo da hifa.

6.2.2. Estudos fisiológicos

Todos os isolados deste estudo apresentaram ótimo crescimento a 30°C e foram termotolerantes a 37°C. A mediana do diâmetro das colônias incubadas a 30°C foi de 33,75 mm apresentando mínimo e máximo equivalentes a 20-44 mm, enquanto que a mediana das colônias a 37°C foi de 16,5 mm com mínimo e máximo de 5-23,5 mm (Figura 7). Aplicando o teste não paramétrico de duas amostras relacionadas ou teste de Wilcoxon, observou-se que o crescimento das colônias incubadas a 30°C foi melhor do que o observado a 37°C ($p < 0,05$).

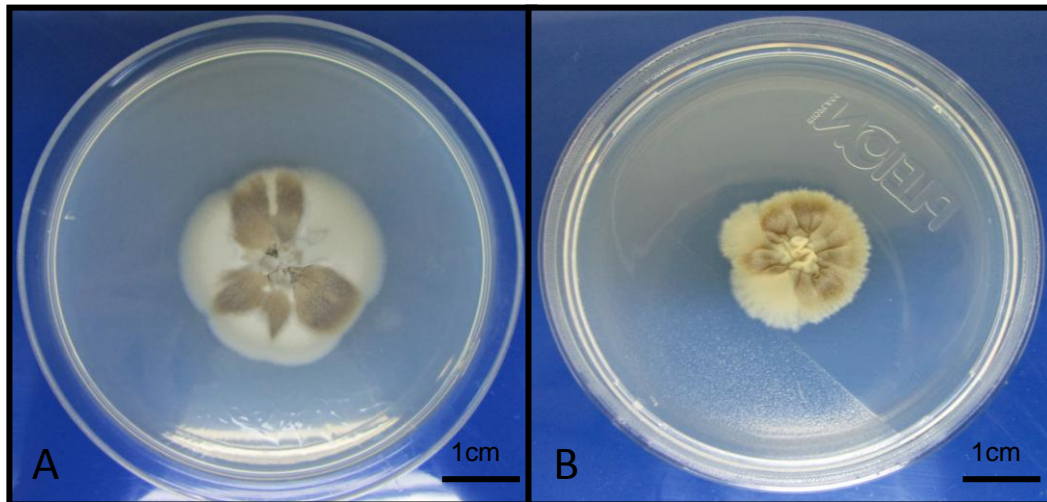


Figura 7: Placas de PDA cultivadas com um mesmo isolado (IPEC8440), por 21 dias. Ambas as colônias apresentam colônias de aspecto liso, de coloração esbranquiçada a amarronzada (A) Placa incubada a 30°C. (B) Placa incubada a 37°C, onde apresentou diminuição do crescimento fúngico, quando comparado a placa da figura A.

Depois de 10 dias a glicose foi assimilada por todos os isolados incluindo os controles. No teste de assimilação de carboidratos, 35 (72,9%) isolados não assimilaram a sacarose e a rafinose, 11 (22,9%) assimilaram a sacarose, porém não assimilaram a rafinose e apenas um (2,1%) isolado assimilou ambos os açúcares testados. Nenhum isolado assimilou apenas a rafinose e nenhum apresentou crescimento nos controles negativos (Figura 8).

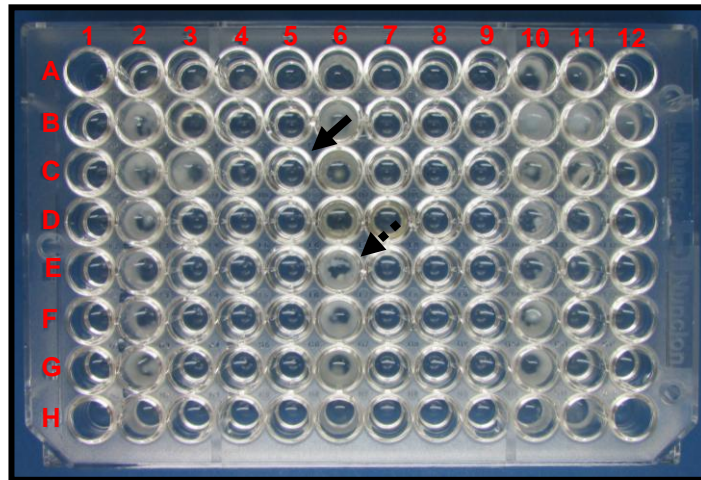


Figura 8: Auxonograma após 10 dias de incubação a 25°C. Colunas 1, 5 e 9: Controles negativos. Colunas 2, 6 e 10: Controles positivos. Colunas 3, 7 e 11: Sacarose. Colunas 4, 8 e 12: Rafinose. (A1 a A4) *Rhodotorula* sp. (IPEC41978). (Cruzamento de colunas e linhas: B1 ao H12) Amostras testadas. Seta contínua indica resultado negativo, e seta tracejada indica resultado positivo para a assimilação dos açúcares testados, onde é possível visualizar o crescimento fúngico.

Com os resultados dos testes morfológicos e fisiológicos foi possível realizar a caracterização fenotípica de cada isolado (Tabela 2) comparando com a chave fenotípica proposta por Marimon e colaboradores (2007). Logo, 35 (74,4%) isolados termotolerantes, com diâmetro da colônia menor que 50 mm em PDA à 30°C após 21 dias de incubação, presença de conídios demáceos e hialinos, que não apresentaram assimilação de ambos os açúcares testados, foram caracterizados como *S. brasiliensis*. Doze (23,4%) não apresentaram características fenotípicas compatíveis com nenhuma espécie, não sendo possível atribuir uma espécie a estes isolados, que foram então classificados como *Sporothrix* spp.. Um isolado apresentou características fenotípicas semelhantes ao *S. schenckii*, pois apresentou diâmetro das colônias a 30°C abaixo de 50 mm, foi termotolerante a 37°C e assimilou ambos os carboidratos testados, porém foi considerado como *Sporothrix* spp. por não apresentar conídios com o formato triangular.

Tabela 2: Caracterização fenotípica de isolados clínicos de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos com esporotricose assistidos no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos INI/Fiocruz no período de 2006 a 2010.

Isolado	Nº molecular	Crescimento		Assimilação			Conídios demáceos	Caracterização Fenotípica
		30°C	35°C	GLI	SAC	RAF		
8440	2G	34,7mm	17mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8491	23G	28,7mm	12,7mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8509	29G	33,5mm	18,5mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8488	10G	44mm	19mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8547	1G	36,2mm	16,5mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8584	9G	37,5mm	16mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8607/1	8G	23mm	13mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8612/1	18G	37mm	17mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8639/1	6G	37mm	22,7mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8648	11G	34,5mm	17mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8678	21G	40,5mm	18mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8671	5G	37mm	13,2mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8688	20G	23mm	10mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8664/3	46G	32mm	11mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8695	19G	31mm	12mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8723/1	53G	21,5mm	6,5mm	+	-	-	-	<i>S. brasiliensis</i>
8718	15G	36mm	17,5mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8726	12G	34mm	4mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8761/1	13G	30,5mm	13,7mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8756/1	50G	38mm	13mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8775/1	24G	30mm	17mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8729	47G	29,5mm	19mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8862/2	40G	31mm	11mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
8854/1	55G	35,5mm	6mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8881/2	22G	35mm	18mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8912/2	48G	39,5mm	21mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8908/2	17G	37mm	23,5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>

8904	58G	44mm	21mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8887	57G	35mm	19mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8902/1	39G	33mm	22mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
8986	14G	27,5mm	7mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9042/1	35G	28,2mm	13mm	+	+	+	+	<i>Sporothrix</i> spp.
9032/1	54G	36mm	15mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9020/1	4G	20mm	9,5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9062/1	59G	24mm	22,5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9056/1	33G	31mm	5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9050/1	38G	21mm	10,5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9090/1	51G	31mm	11mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
9099/1	41G	34mm	19mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9101/1	49G	30mm	12mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
9115/1	30G	31,8mm	21mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9203	32G	33,5mm	19mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9236	34G	27,5mm	16mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9260	56G	34,5mm	14mm	+	+	-	+	<i>Sporothrix</i> spp.
9345	37G	41mm	23mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9362/1	60G	42,5mm	5,5mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>
9409/1	31G	36mm	17mm	+	-	-	+	<i>S. brasiliensis</i>

6.3. Caracterização molecular

As cepas controle na PCR T3B *fingerprinting* demonstraram perfis de bandas bastante distintas que permitiram diferenciar as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii*, sendo possível então fazer uma comparação destes controles com os isolados felinos deste estudo, concluindo que os 47 (100%) isolados foram identificados como *S. brasiliensis*. Porém, ao construirmos um dendograma, foi possível visualizar a presença de 14 isolados caracterizados como *S. brasiliensis*, com uma pequena variação intraespecífica, ou seja, existia uma variação quando comparada a cepa tipo de *S. brasiliensis* (Figura 9).

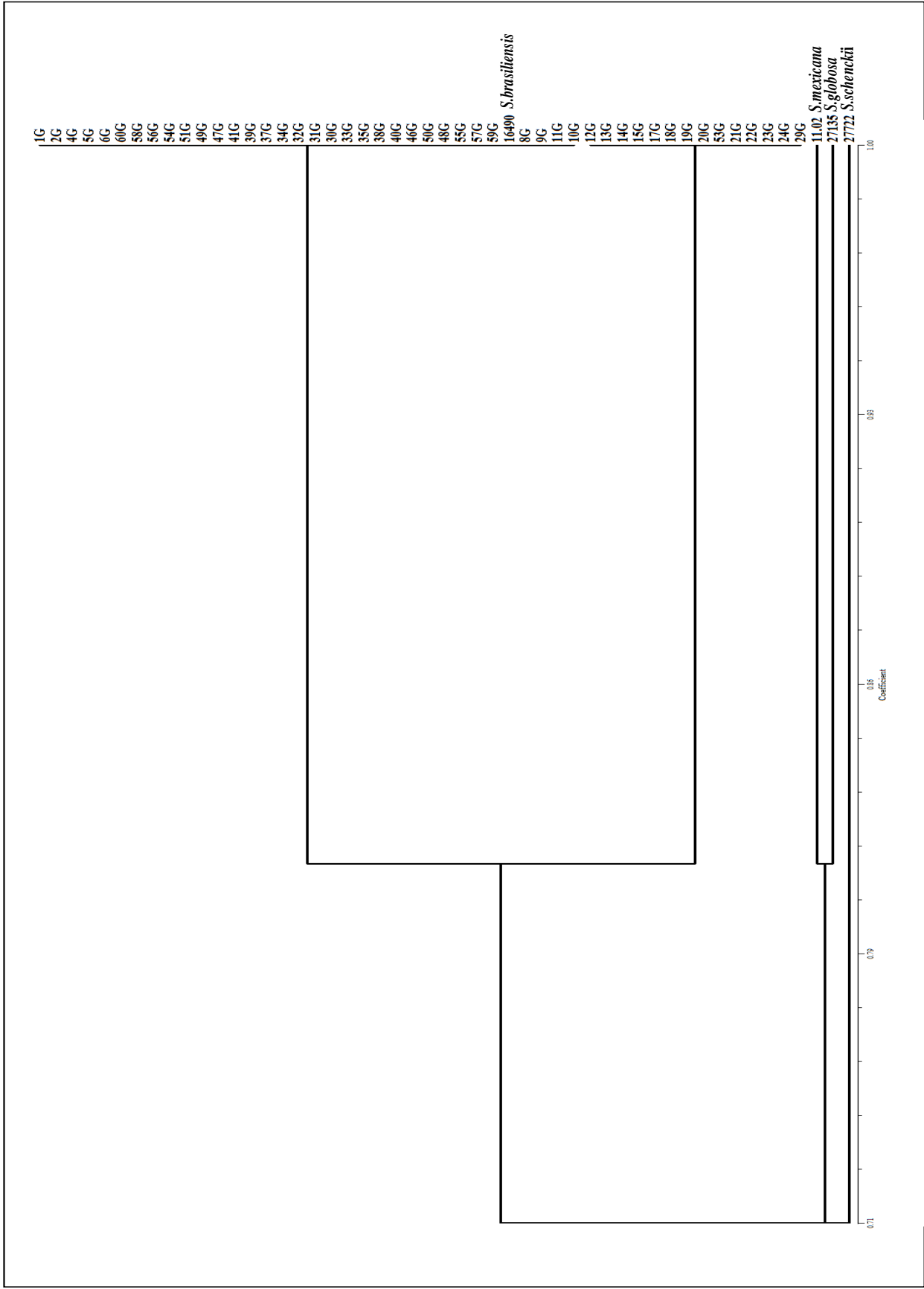


Figura 9: Dendrograma demonstrando o grau de similaridade entre os perfis da PCR T3B *fingerprinting* dos 47 isolados felinos caracterizados como *S. brasiliensis*.

6.4. Correlação entre isolados caracterizados como *S. brasiliensis* e variáveis clínicas e epidemiológicas

Não foi possível observar nenhuma correlação entre esses isolados com pequenas variações intraespecífica e as variáveis clínicas e epidemiológica dos mesmos, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3: Correlação entre isolados de caracterizados como *Sporothrix brasiliensis* que apresentaram diferenças intraespecífica e os que não apresentaram, com variáveis clínicas e epidemiológicas dos gatos atendidos no Lapclin-dermzoo/INI/Fiocruz no período de 2006 a 2010.

Variáveis		Com diferença intraespecífica	Sem diferença intraespecífica	p-valor (p<0,05)
		n=14	n=33	
<i>Estado geral</i>	Bom	13 (92,9%)	29 (87,9%)	1
	Regular	1 (7,1%)	4 (12,1%)	
<i>Distribuição de lesões</i>	L1	5 (35,7%)	10 (30,3%)	0,478
	L2	6 (42,9%)	10 (30,3%)	
	L3	3 (21,4%)	13 (39,4%)	
<i>Sinais respiratórios</i>	Presente	11 (78,6%)	16 (48,5%)	0,105
	Ausente	3 (21,4%)	17 (51,5%)	
<i>Lesões cutâneas</i>	Presente	12 (85,7%)	33 (100%)	-
	Ausente	2 (14,3%)	0	
<i>Lesões em mucosa</i>	Presente	8 (57,1%)	12 (36,4%)	0,214
	Ausente	6 (42,9%)	21 (63,6%)	
<i>Linfadenopatia</i>	Presente	14 (100%)	28 (84,8%)	-
	Ausente	0	5 (15,2%)	
<i>Tratamento</i>	Itraconazol	4 (28,6%)	21 (63,6%)	0,053
	Cetoconazol	10 (71,4%)	12 (36,4%)	
<i>FIV/FeLV</i>	Positivo	3 (21,4%)	9 (27,3%)	1
	Negativo	11 (78,6%)	24 (72,7%)	
<i>Rinite funcional</i>	Presente	9 (64,3%)	11 (33,3%)	0,062
	Ausente	5 (35,7%)	22 (66,7%)	
<i>Desfecho</i>	Cura	5 (35,7%)	12 (36,4%)	1
	Desfavorável	9 (64,3%)	21 (63,6%)	
<i>Castração</i>	Sim	7 (50%)	12 (36,4%)	0,518
	Não	7 (50%)	21 (63,4%)	
<i>Sexo</i>	Fêmea	4 (28,6%)	8 (24,2%)	0,731
	Macho	10 (71,4%)	25 (75,8%)	
<i>Acesso à rua</i>	Sim	13 (92,9%)	27 (81,8%)	0,657
	Não	1 (7,1%)	6 (18,2%)	

Foi possível identificarmos isolados cujo resultado da identificação fenotípica foi discordante da identificação molecular através da PCR *fingerprinting* (Tabela 4). Apenas foi confirmada a caracterização destes isolados como *S. brasiliensis*, após a realização da PCR T3B *fingerprinting* e eletroforese em gel de agarose (Figura 10).

Tabela 4: Diferenças encontradas, em 12 isolados felinos, entre a caracterização fenotípica e a caracterização molecular

Isolados	Caracterização fenotípica	Caracterização molecular
8509	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8547	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8612/1	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8695	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8718	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8726	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8729	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
8862/2	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
9042/1	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
9090/1	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
9101/1	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>
9260	<i>Sporothrix</i> spp.	<i>S. brasiliensis</i>

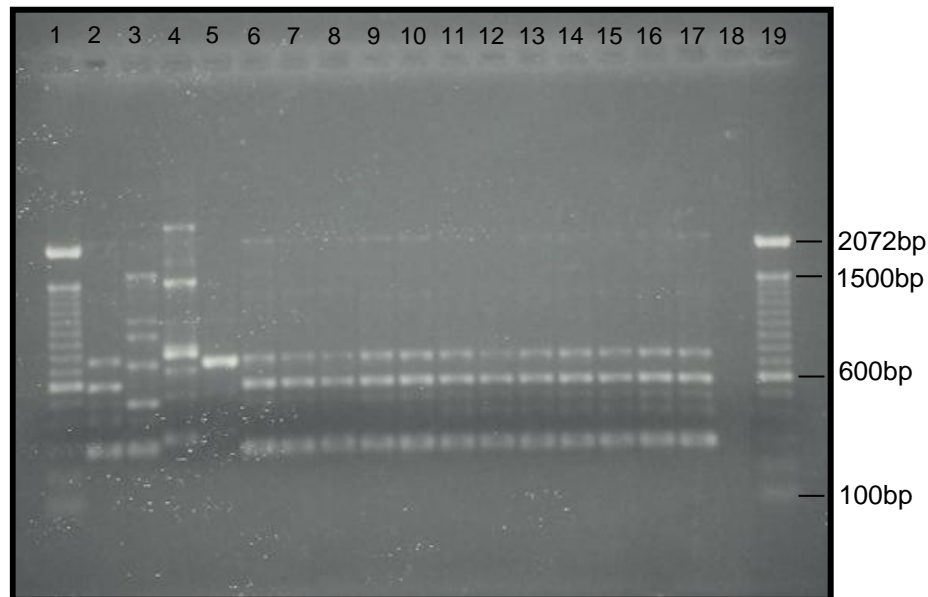


Figura 10: Gel da PCR T3B *fingerprinting* realizada com as 12 amostras que apresentaram resultados fenotípicos divergentes dos resultados moleculares. (18) Representa o controle negativo (1 e 19) Representam o marcador molecular DNA ladder, 100pb. (2) *S. brasiliensis* (IPEC16490). (3) *S. schenckii* (IPEC27722). (4) *S. mexicana* (MUM11.02). (5) *S. globosa* (IPEC27135). (6 ao 17) Representam isolados felinos caracterizados como *S. brasiliensis* de acordo com o perfil de bandas apresentadas.

Após a realização da correlação entre os sinais clínicos e os fenótipos discordantes, observou-se que não houve associação com nenhuma das variáveis testadas (Tabela 5).

Tabela 5: Correlação entre isolados caracterizados como *S. brasiliensis* que apresentaram fenótipos concordantes e discordantes da caracterização molecular com variáveis clínicas e epidemiológicas dos isolados felinos com esporotricose assistidos no Lapclin-Dermzoo/INI no período de 2006 a 2010.

Variáveis	Fenótipo		p-valor (p<0,05)
	Concordante n= 35	Discordante n= 12	
<i>Estado geral</i>	Bom	31 (88,6%)	1
	Regular	4 (11,4%)	
<i>Distribuição de lesões</i>	L1	14 (40%)	0,177
	L2	10 (28,6%)	
	L3	11 (31,4%)	
<i>Sinais respiratórios</i>	Presente	21 (60%)	0,737
	Ausente	14 (40%)	
<i>Lesões cutâneas</i>	Presente	33 (94,3%)	-
	Ausente	2 (5,7%)	
<i>Lesões em mucosa</i>	Presente	14 (40%)	1
	Ausente	21 (60%)	
<i>Linfadenopatia</i>	Presente	30 (85,7%)	-
	Ausente	5 (14,3%)	
<i>Tratamento</i>	Itraconazol	20 (57,1%)	0,505
	Cetoconazol	15 (42,9%)	
<i>Castração</i>	Sim	16 (45,7%)	0,310
	Não	19 (54,3%)	
<i>FIV/FeLV</i>	Positivo	7 (20%)	0,248
	Negativo	28 (80%)	
<i>Rinite funcional</i>	Presente	14 (40%)	0,737
	Ausente	21 (60%)	
<i>Desfecho</i>	Cura	14 (40%)	0,492
	Desfavorável	21 (60%)	
<i>Castração</i>	Sim	16 (45,7%)	0,310
	Não	19 (54,3%)	
<i>Sexo</i>	Fêmea	10 (28,6%)	0,703
	Macho	25 (71,4%)	
<i>Acesso à rua</i>	Sim	28 (80%)	-
	Não	7 (20%)	

7. DISCUSSÃO

No presente estudo o enfoque principal foi a caracterização fenotípica e molecular em nível de espécie dos isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos com esporotricose assistidos no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz no período de 2006 a 2010. Foram realizadas técnicas fenotípicas e a PCR T3B *fingerprinting* para análise molecular dos isolados. As características clínicas e epidemiológicas da população felina incluída no estudo foram analisadas em conjunto com os resultados da caracterização das espécies.

A esporotricose é uma micose subcutânea, de ocorrência mundial, sendo considerada endêmica na América Latina, principalmente na região metropolitana do Rio de Janeiro, onde a primeira epidemia de esporotricose com transmissão zoonótica foi detectada no final dos anos 1990 (Barros et al., 2001; Pereira et al., 2014). Os gatos são os animais mais acometidos pela esporotricose, e apresentam, por motivos ainda não conhecidos, uma alta carga fúngica em suas lesões cutâneas (Pereira et al., 2011), o que faz com que esses animais sejam uma fonte de infecção e apresentem um alto potencial zoonótico (Schubach et al., 2012).

A descrição do perfil da população felina acometida pela esporotricose no Brasil e em outros países é semelhante (Davies e Troy, 1996; Crothers et al, 2009). Em nosso estudo, os machos, não castrados, sem raça definida e com acesso irrestrito à rua foram os mais frequentemente acometidos pela esporotricose, corroborando com os achados de outros autores que realizaram seus estudos no Brasil, na mesma região endêmica e em outras regiões endêmicas (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010; Gremião et al., 2011; Madrid et al., 2012; Reis et al., 2012; Gremião et al., 2015). A infecção relacionada à briga com outros gatos ocorreu predominantemente em animais não castrados, como foi descrito em outro estudo (Schubach et al., 2004a), sugerindo que a castração é uma importante medida de prevenção e controle da esporotricose felina (Pereira et al., 2014).

As lesões mais frequentemente observadas nos gatos avaliados neste estudo foram nódulos e úlceras cutâneas, corroborando com os achados de outros autores (Davies e Troy, 1996; Schubach et al., 2004a; Madrid et al., 2010; Pereira et al., 2010). A distribuição de lesões cutâneas observada em nosso estudo corroborou com achados dos dois maiores estudos sobre

esporotricose felina realizados até o momento (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010), que relataram uma frequência maior de animais do grupo L3, seguido de L1 e L2.

Na esporotricose felina é frequente o relato de envolvimento extracutâneo, principalmente a linfadenopatia e a presença de sinais respiratórios, como espirros, dispnéia, rinorréia (Pereira et al., 2010; Madrid et al., 2012; Schubach et al., 2012; Gremião et al., 2015). Em nosso estudo, os sinais extracutâneos foram semelhantes aos previamente descritos, com a maior frequência do espirro, rinorréia e linfadenopatia, podendo esta ser localizada ou generalizada. Pereira e colaboradores (2010) descreveram que sinais respiratórios estão associados com falência terapêutica e óbito do animal. Essa associação também foi descrita por Gremião e colaboradores (2015), onde foi observado que o tratamento antifúngico não minimizava a severidade das lesões e não prevenia a multiplicação de elementos fúngicos na narina dos animais, demonstrando a dificuldade no tratamento quando existe o acometimento nasal e indicando que a severidade e a extensão das lesões podem dificultar a cura. Em nossos estudos também houve associação do desfecho negativo do animal com sinais clínicos respiratórios e a presença de rinite funcional.

Apesar da terapêutica da esporotricose felina não ter sido o foco deste estudo, a frequência de cura clínica observada nos gatos incluídos e tratados com cetoconazol ou itraconazol foi maior do que a relatada em estudo anterior conduzido na mesma instituição (Pereira et al., 2010). Não houve associação entre o desfecho dos casos e o resultado da sorologia para as retrovíruses causadas pelo FIV e FeLV, o que corrobora com os achados de estudos anteriores (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010).

Silva e colaboradores (2012) relataram que os casos humanos de esporotricose na região metropolitana do Rio de Janeiro estavam situados em maior concentração no município do Rio de Janeiro, seguido dos municípios vizinhos, como Duque de Caxias, São João de Meriti, Nova Iguaçu, Nilópolis, Belford Roxo e Mesquita, e demonstraram a existência de um cinturão de esporotricose, devido a elevada densidade de casos ao redor da capital, próximo aos municípios vizinhos acometidos. Esses achados corroboram com os dados epidemiológicos encontrados em nosso estudo, uma vez que os animais incluídos eram na sua maioria provenientes do município do Rio de Janeiro e municípios da Baixada Fluminense.

Até 2007, *S. schenckii* era considerado o agente etiológico da esporotricose e a única espécie patogênica para o ser humano e os animais (Schubach et al., 2005). Estudos realizados por Marimon e colaboradores (2007, 2008a) sugeriram que *S. schenckii* não deveria ser

considerada a única espécie causadora da esporotricose e propuseram quatro novas espécies: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei*, sendo que *S. brasiliensis* seria a espécie responsável pela ocorrência dos casos humanos e felinos no Rio de Janeiro (Rodrigues et al., 2013a; Almeida-Paes et al., 2014).

Desde o início da epidemia que ocorre no Rio de Janeiro até a publicação dos resultados do estudo conduzido por Rodrigues e colaboradores (2013a) que incluiu 15 isolados felinos do Rio de Janeiro, os isolados felinos eram classificados como *S. schenckii*.

Assim como foi observada a importância da confirmação taxonômica de isolados humanos provenientes do Rio de Janeiro desde o início da epidemia (Almeida-Paes et al., 2014), é fundamental que seja realizada a caracterização e confirmação taxonômica dos isolados felinos, uma vez que estes animais apresentam importância singular na transmissão zoonótica de *Sporothrix*. Além disso, poucos estudos foram realizados para a caracterização das espécies desse fungo em gatos no Brasil (Oliveira et al., 2011; Oliveira et al., 2013; Montenegro et al., 2014), principalmente no Rio de Janeiro (Rodrigues et al., 2013a), onde é descrita a maior casuística mundial da esporotricose felina (Pereira et al, 2014; Gremião et al, 2015).

Afim de identificar as espécies de cepas isoladas durante a endemia no Rio de Janeiro, a caracterização fenotípica e molecular foi realizada em 47 isolados obtidos de felinos com esporotricose diagnosticados no Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz, no período de 2006 a 2010. Após realização das técnicas fenotípicas e moleculares, *S. brasiliensis* foi a espécie responsável pela infecção dos 47 gatos incluídos nesse estudo.

Sporothrix brasiliensis tem sido descrita como uma espécie emergente, altamente patogênica para humanos e animais e com uma distribuição geográfica regional no Brasil (Marimon et al., 2007; Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013a). Esta foi a única espécie encontrada em nosso estudo, o que confirma achados de um outro estudo que associa *S. brasiliensis* com a endemia de esporotricose felina no Rio de Janeiro (Rodrigues et al., 2013a). Na região Sudeste do Brasil, autores descreveram a predominância de *S. brasiliensis* no acometimento dos gatos com esporotricose, sendo relatado casos em todos os estados da região Sudeste, sendo estes Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo (Rodrigues et al., 2013a; Oliveira et al., 2013; Montenegro et al., 2014), corroborando com nossos achados. Acreditamos que esses achados sejam basicamente devido à proximidade dos estados de São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo com a região endêmica do Rio de Janeiro e a

possibilidade dos gatos migrarem da área endêmica para essas regiões com seus responsáveis. A região Sul do Brasil apresenta um perfil de espécie um pouco diferente, no Rio Grande do Sul, a principal espécie encontrada foi *S. schenckii* (Oliveira et al., 2011), porém já foram relatados casos de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis*, não só no Rio Grande Sul, como também no Paraná (Rodrigues et al., 2013a).

Como já foi descrito anteriormente, *S. pallida* tipicamente produz colônias acima de 50 mm e não produz conídios demáceos. Da mesma forma, *S. luriei* não produz conídios hialinos. Em nosso grupo de amostras, um isolado produziu apenas conídios hialinos, obteve diâmetro da colônia a 30°C inferior a 50 mm, demonstrou termotolerância a 37°C e não assimilou sacarose e rafinose. O perfil de assimilação de carboidratos e taxa de crescimento do isolado a 30°C e 37°C é característico de *S. brasiliensis*, porém a estrutura dos conídios foi sugestiva de *S. pallida* ou *S. luriei*. Além disso, macroscopicamente houve produção de melanina pelo fungo em meio PDA, contradizendo os achados microscópicos feitos em CMA. Apesar da colônia ser demácea, houve produção somente de conídios hialinos, sugerindo que o meio de cultura utilizado para o preparo da lâmina, sendo este o CMA não ofereceu substratos suficientes para que este isolado em particular formasse conídios demáceos.

Em seis isolados classificados por técnicas moleculares como *S. brasiliensis* não foi visualizada macroscopicamente a pigmentação da colônia, mas estes desenvolveram conídios globosos e demáceos assim como em outro estudo (Oliveira et al., 2011).

Em 12 isolados (25,5%) não foi possível chegar a uma classificação taxonômica em nível de espécie somente com a caracterização fenotípica, sendo estes classificados como *Sporothrix* spp. A assimilação de carboidratos desses isolados foi sugestiva de *S. pallida* ou *S. globosa* por assimilarem apenas a sacarose, porém a presença de conídios demáceos e a termotolerância a 37°C de todos esses isolados não permitiu esta classificação. Com esses dados é possível sugerir que exista uma variabilidade fenotípica entre essas espécies. Devido a esta diversidade de resultados nos testes fenotípicos, sugerimos que a identificação das espécies do gênero *Sporothrix* utilizando apenas testes morfológicos e fisiológicos seja utilizada com restrição.

A PCR T3B *fingerprinting* desses isolados foi realizada e estas foram classificadas como *S. brasiliensis*. Sendo assim, detectamos diversos isolados com divergências entre a identificação fenotípica e molecular, corroborando com relatos de outros autores (Oliveira et al., 2011; Almeida-Paes et al., 2014) e discordando dos autores que afirmam que as espécies do complexo

podem ser facilmente identificadas sem o auxílio de ferramentas moleculares (Marimon et al., 2007). Esses resultados sugerem que a caracterização de espécies do complexo *Sporothrix* deve ser baseada na associação de técnicas fenotípicas e moleculares que permitam a diferenciação das espécies.

Apesar dos resultados fenotípicos não conclusivos, a caracterização foi realizada pela técnica molecular PCR T3B *fingerprinting*, no qual conseguimos identificar com sucesso as espécies dos isolados felinos com esta técnica, que além disso demonstrou ser simples e rápida, como já havia sido demonstrado por Oliveira e colaboradores (2012). Houve pequena variação intraespecífica entre os nossos isolados classificados como *S. brasiliensis*, porém não foram encontradas correlações entre esses achados e os dados clínicos e epidemiológicos dos felinos, sugerindo então que mais estudos sejam realizados a fim de estudar a relação entre genótipos e fenótipos de *Sporothrix* e as características clínicas dos animais naturalmente infectados por estes fungos.

Apesar do p-valor não ter demonstrado significância estatística, a distribuição entre os grupos L1, L2 e L3, nos isolados que apresentaram fenótipo discordante da identificação molecular, não foi proporcional quando comparada com a distribuição das lesões da população felina geral do estudo. Sugerindo então, que os isolados que apresentam fenótipo discordante possam ser mais virulentas, sugerindo que mais estudos sejam realizados para que tal comparação possa ser realizada.

8. CONCLUSÃO

Com base no estudo realizado, pode-se concluir que:

1. *S. brasiliensis* é o agente etiológico da esporotricose felina na região metropolitana do Rio de Janeiro;
2. Há pequena variação fenotípica e genotípica nos isolados de *S. brasiliensis* na região endêmica do Rio de Janeiro;
3. A utilização de técnicas morfológicas e fisiológicas isoladamente para a caracterização de espécies do complexo *Sporothrix* deve ser feita com restrições devido a possibilidade de não concordância entre os resultados, logo é fundamental a utilização de técnicas fenotípicas combinadas a técnicas moleculares para a identificação de isolados felinos
4. A presença de sinais respiratórios e rinite funcional foi associada aos desfechos negativos observados nos gatos com esporotricose tratados com itraconazol ou cetoconazol;
5. Não houve associação entre as variáveis clínicas e epidemiológicas dos gatos com esporotricose e as e as variações fenotípicas e genotípicas dos isolados de *S. brasiliensis* identificados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Paes R, Frases S, Monteiro PCF, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Nosanchuk JD. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes Infect.* 2009; 11:554-562.

Almeida-Paes R, Oliveira MME, Freitas DF, Francesconi AC, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(9) e3094

Arenas R, Miller D, Campos-Macias P. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. *Int J Dermatol.* 2007; 46:177-179.

Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Marine M, Gene J, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(7):651-655.

Baroni FA, Campos SG, Direito GM. A cat sporotrichosis case. *Rev Bra Med Vet.* 1998; 20(1):25-27

Barros MB, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, Zancopé-Oliveira RM, Lazéra MS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Marzochi KBF, Wanke B, Valle ACF. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:777-779.

Barros MB, Schubach AO, do Valle AC, Gutierrez Galhardo MC, Conceicao-Silva F, Schubach TM, et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clin Infect Dis.* 2004; 38(4):529-535.

Barros MB, Schubach AO, Schubach TM, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiology and Infection.* 2008; 136(9):1192-1196.

Barros MB, Schubach TP, Coll JO, Gremiao ID, Wanke B, Schubach A. Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. *Rev Panam Salud Publica.* 2010; 27(6):455-460.

Barros MB, Almeida-Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Reviews.* 2011; 24(4): 633-654.

Beer ZW, Harrington TC, Vismer HF, Wingfield BD, Wingfield MJ. Phy-logeny of the *Ophiostoma stenoceras*–*Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia.* 2003;95:434 - 441

- Bustamante B, Campos PE. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. *Expe Rev of Anti-Infective Therap.* 2004; 2(1):85-94.
- Bustamante B, Campos PE. Sporotrichosis Treatment: Overview and Update. *Curr Fungal Infect Rep* 2010.
- Charmichael JW. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic Hyphomycetes. *Can J Bot.* 1962; 40:1137-1173.
- Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycology.* 2015; 53:3-14
- Chaves AR, Campos MP, Barros MBL, Carmo CN, Gremião ID, Pereira SA, Schubach TM. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. *Zoonoses and Public Health.* 2013; 60, 149–153
- Civila ES, Bonasse J, Conti-Díaz IA, Vignale RA. Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol.* 2004; 43(11):808-810.
- Coles FB, Schuchat A, Hibbs JR, Kondracki SF, Salkin IF, Dixon DM, Chang HG, Duncan RA, Hurd NJ, Morse DL. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. *Am J Epidemiol.* 1992; 136: 475-487.
- Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals, São Paulo, Brazil. *Mycopathologia.* 1994; 125(1):19-22.
- Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter VK. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *Vet Dermatol.* 2009; 20(4):249-259.
- Davies C, Troy GC. Deep mycotic infections in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1996; 32(5):380-391.
- De Beurmann L, Gougerot H. *Les sporotrichoses.* Paris: Librairie Félix Alcan; 1912.
- De Beurmann L, Gougerot H, Vaucher. Sporotrichose expérimentale du chat. *Comptes Rendus de la Société de Biologie.* 1909; 66:338-340.
- De Meyer EM, de Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AM, de Hoog GS, Vismer HF, et al. Taxonomy and phylogeny of new wood- and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia.* 2008;100(4):647-661.
- Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancope-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis Caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(10):1975-1976.
- Donadel K, Reinoso Y, Oliveira J, Azulay R. Esporotricose: revisão. *Anais Bras Dermatol.* 1993;68(1):45-52.

Dunstan RW, Langham RF, Reimann KA, Wakenell PS. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. *J America Acad Dermatol* 1986; 15(1):37-45.

Feeney KT, Arthur IH, Whittle AJ, Altman SA, Speers DJ. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. *Emerg Infect Dis* 2007; 13(8):1228-1231.

Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR, Schubach TM, Dias MA, Pereira SA, de Camargo ZP. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzymelinked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Vet. Microbiol.* 2011; 147(3-4):445-449.

Francesconi G, Valle AC, Passos S, Reis R, Galhardo MC. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009;23(11):1273-1276.

Freitas D, Migliano M, Zani Neto L. Esporotricose - Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). *Ver Facul Med Vet São Paulo* 1956; 5(4):601-604.

Freitas D, Moreno G, Saliba A, Bottino J, Mós E. Esporotricose em cães e gatos. *Rev Facul Med Vet São Paulo.* 1965; 7(2):381-387.

Freitas DF, Hoagland BS, Francesconi AC, Fraga BB, Barros MB et al., Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycology.* 2012; 50, 170–178.

Freitas DF, Valle AC, da Silva MB, Campos DP, Lyra MR, de Souza RV, Veloso VG, Zancopé-Oliveira RM, Bastos FI, Galhardo MC. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8(8):e3110.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(3):454-500.

Ghosh A, Maity PK, Hemashettar BM, Sharma VK, Chakrabarti A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses.* 2002; 45:449- 454.

Greene CE. Antifungal Chemotherapy In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed: Saunders Elsevier; 2012.

Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TM, Figueiredo AB, Cavalcanti MC, Pereira SA. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycology.* 2015; 53: 15-21

Gremião IDF, Schubach T, Pereira S, Rodrigues A, Honse C, Barros M. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J.* 2011; 89(9):346-351.

Gremião IDF, Schubach TM, Pereira SA, Rodrigues AM, Chaves AR, Barros MB. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. *J Feline Med Surg.* 2009; 11(8):720-723.

Gutierrez-Galhardo MC, Barros MBL, Schubach AO, Cuzzi T, Schubach TMP, Laz-era MS, et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005; 19:507-9

Helm MAF, Berman C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. In: *Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association.* 1947; 59-47.

Hektoen L, Perkins CF. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*, a new pathogenic fungus. *J Experi Med.* 1900; 5:77-89.

Ishizaki H, Kawasaki M, Aoki M, Vismer H, Muir D. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in South Africa and Australia. *Med Mycol.* 2000; 38:433-436.

Kanbe T, Natsume L, Goto I, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H, Kikuchi A. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. *J Dermatol Sci.* 2005; 38:99-106.

Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis.* 1999; 29(2):231-236; quiz 237.

Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(10):1255-1265.

Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol.* 2008; 46:53-56.

Kwon-Chung K, Bennet J. Sporotrichosis. In: Kwon-Chung K, Bennet J, editors. *Med Mycol.* 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 707-729.

Larsson CE, Goncalves MA, Araujo VC, Dagli ML, Correa B, Fava Neto C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1989; 31(5):351-358.

Leão A, Silva J, Proença M. Sur un cas de sporotrichose a *Sporotrichum Beurmanni*, observé pour la première fois chez un mulet a Rio de Janeiro. *C R Soc Biol.* 1934; 116:1157-1158.

Leme LR, Schubach TM, Santos IB, Figueiredo FB, Pereira SA, Reis RS, et al. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. *Mycoses.* 2007; 50(3):210-214.

Lin J, Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, You G, Li R. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* clinical isolates from China. *Mycopathologia.* 1999, 148:69-72.

- Liu T, Zhang K, Zhou X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol). 2014;15(1):100-108
- Liu X, Zhang Z, Hou B, Wang D, Sun T, Li F, Wang H, Han S. Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2013; 27(12):1491-1497.
- Londero A, Ramos C. Esporotricose. Estudo de 195 casos observados no interior do Estado do Rio Grande do Sul. Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul. 1980; 24(2):104-106.
- Lopez-Romero E, Reyes-Montes Mdel R, Perez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagomez-Castro JC, Mora-Montes HM, et al. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiol. 2011; 6(1):85-102.
- Lutz A, Splendore A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. Rev Med São Paulo. 1907; 21:433-450.
- Macoleta-Ruiz E, Nochebuena-Ramos E. Sporotrichosis among rural communities in the Northern Sierra in Puebla. Report of 55 cases September 1995 - December 2005. Gac Med Mex. 2006; 142(5):377-380.
- Madrid H, Cano J, Gene J, Bonifaz A, Toriello C, Guarro J. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. Rev Iberoam Micol. 2009; 26(3):218-222.
- Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre M de O, Meireles MC. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. Mycopathologia. 2012; 173(4):265-273.
- Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M, Meireles M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. Zoonoses Public Health. 2010; 57(2):151-154.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazera M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol. 2006; 44(9):3251-3256.
- Marimon R, Cano J, Gene J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007; 45(10):3198-3206.
- Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. Med Mycol. 2008a; 46(6):621-625.
- Marimon R, Serena C, Gene J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *sporothrix*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2008b; 52(2):732-734.
- Matruchot L. Les champignons pathogenes, agents des sporotrichoses. Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. 1910; 150:543-545.

- Mehta KI, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Ranjan N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. *Mycoses*. 2007; 50(6):496-501.
- Mesa-Arango AC, Reyes-Montes MR, Perez-Mejia A, Navarro-Barranco H, Souza V, Zuniga G, et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of Sporotrichosis. *J Clin Micro-biol*. 2002; 40:3004–3011
- Miranda LH, Conceição-Silva F, Quintella LP, et al. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013; 36(4):425-432
- Miranda LH, Quintella LP, Menezes RC, dos Santos IB, Oliveira RV, Figueiredo FB, LopesBezerra LM, Schubach TM. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet J*. 2011; 190(3):408-411.
- Miranda LHM. Avaliação da resposta inflamatória *in vivo* e *in vitro* na esporotricose felina em diferentes apresentações clínicas. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
- Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, Silva EA, Bernardi F, Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014; 10(1): 269
- Mora-Cabrera M, Alonso RA, Ulloa-Arvizu R, Torres-Guerrero H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii*. *Med Mycol*. 2001; 39:439-444.
- Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG, Kim JY, Burd EM. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Med Mycol*. 2013; 88–90
- Neyra E, Fonteyne PA, Swinne D, Fauche F, Bustamante E, Nolard N. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol*. 2005; 43:1348-1352.
- Oliveira DC, Lopes PG, Spader TB, Mahl CD, Tronco-Alves GR, Lara VM, Santurio JM, Alves SH. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2011a; 49(8):3047-3049.
- Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Barros MBL, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*. 2010; 169:359–363.
- Oliveira MM, Almeida-Paes R, Muniz MM, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. 2011b; 172(4):257-267.

Oliveira MME, Sampaio P, Almeida-Paes R, Pais C, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Rapid Identification of *Sporothrix* Species by T3B Fingerprinting. J Clin Microbiol. 2012; 50(6):2159-2162

Oliveira MME. Análise filogenética e implementação de ferramentas moleculares na identificação de isolados do complexo *Sporothrix* spp.. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2013a.

Oliveira MME, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancopé-Oliveira RM. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013b; 108(7): 936-938

Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. Rev Ibero Micol. 2014a; 31(1):2-6

Oliveira MME, Veríssimo C, Sabino R, Aranha J, Zancopé-Oliveira RM, Sampaio P, Pais C. First autochthonous case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014b; 78(4):388-390

Padhye AA, Kaufman L, Durré E, Banerjee CK, Jindal SK, Talwar P, et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. J Clin Microbiol. 1992; 30(9):2492-2494.

Pappas PG, Tellez I, Deep A E, Nolasco D, Holgado W, Bustamanate B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. Clin Infect Dis. 2000; 30: 65-70.

Pereira SA, Gremiao ID, Kitada AA, Boechat JS, Viana PG, Schubach TM. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2014; 47(3):392-393.

Pereira SA, Menezes RC, Gremiao ID, Silva JN, Honse Cde O, Figueiredo FB, et al. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. J Feline Med Surg. 2011; 13(4):220-223.

Pereira SA, Passos SR, Silva JN, Gremiao ID, Figueiredo FB, Teixeira JL, et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. Vet Rec. 2010; 166(10):290-294.

Pereira SA, Schubach TM, Gremiao ID, Silva DT, Figueiredo FB, Assis NV, et al. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. Acta Scientiae Veterinariae. 2009; 37(4):331-341.

Pupo JA. Frequência da Sporotricose em São Paulo. Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia. 1917; 8(3): 53-68.

Quintal D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. J Cutan Med Surg. 2000; 4:51-54.

- Reis EG, Gremiao ID, Kitada AA, Rocha RF, Castro VS, Barros MB, et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg*. 2012; 14(6):399-404
- Reis, RS, Almeida-Paes R, Muniz MM, Tavares PM, Monteiro PC et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104:769–774.
- Rippon J. Sporotrichosis. In: Rippon J, editor. *Medical Mycology - The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988. p. 325-352.
- Rodrigues AM, Bagagli E, Camargo ZP, Bosco SM. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. *Mycopathologia*. 2014a; 177:199–206
- Rodrigues AM, Hoog GS, Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol*. 2013b; 51: 405-412
- Rodrigues AM, Hoog GS, de Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014b; 78, 383-387
- Rodrigues AM, Teixeira MM, Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Santos PO, et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013a; 55(suppl. 4):233-4
- 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*. 2011; 172:179 – 186.
- Rosser E, Dunstan R. Sporotrichosis. In: Greene CE, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.
- Schechtman RC. Sporotrichosis: Part II. *Skinmed* 2010; 8(5):275-280.
- Schenck B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Johns Hopkins Hospital Bulletin*. 1898; 240(93):286-290.
- Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008; 21(2):129-133.
- Schubach TM, de Oliveira Schubach A, dos Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TC, Monteiro DF, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 2002; 153(2):83-86.
- Schubach TM, Menezes RC, Wanke B. Sporotrichosis. In: Greene EC. *Infectious diseases of the dog and cats*. 4th ed. Missouri: Elsevier; 2012; 645-650
- Schubach AO, Schubach TMP, Barros MBL. Epidemic cat-transmitted sporotrichosis. *N Engl J Med*. 2005; 353:1185-1186.

- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2004a; 224(10):1623-9.
- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, Pereira SA, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol*. 2006; 44(1): 87-92.
- Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Pellon IV, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, et al. Haematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. *J Small Anim Pract*. 2003a; 44(9):395-398.
- Schubach TM, Schubach Ade O, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PC, et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec*. 2003b; 152(6):172-175.
- Schubach TM, Valle AC, Gutierrez-Galhardo MC, Monteiro PC, Reis RS, Zancoppe-Oliveira RM, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol*. 2001; 39(1):147-149.
- Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Leme LRP, et al. *Sporothrix schenckii* isolation from blood clot of naturally infected cats. *Bra J Vet Resear Animal Sci*. 2004b; 41(6):404-408.
- Silva-Vergara , ML , Camargo , ZP , Silva PF, et al. Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. *Am J Trop Med Hyg*. 2012; 86:477-480 .
- Silva MB, Costa MM, Torres CC, Gutierrez-Galhardo MC, Valle AC, et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2012; 28(10):1867-1880
- Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. *New York State J Med*. 1952; 52(17:1):2147-2153.
- Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013; 27(3):313-318
- Suzuki K, Kawasaki M, Ishizaki H. Analysis of restriction profiles of mitochondrial DNA from *Sporothrix schenckii* and related fungi. *Mycopathologia*. 1988; 103:147-151.
- Takeda Y, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny and molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* in Japan. *Mycopathologia*. 1991; 116:9-14
- Takenada M, Sato S, Nishimoto K. Survey of 155 sporotrichosis cases examined in Nagasaki Prefecture from 1951 to 2007. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*. 2009; 50(2):101-108.

Vasquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. Clin Dermatol. 2012; 30(4):437-443.

Watanabe S, Kawasaki M, Mochizuki T, Ishizaki H. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi. 2004; 45:165-175.

Woods JP, Kersulyte D, Goldman WE, Berg DE. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. J Clin Microbiol. 1993; 31(2):463-464.

Yamada K, Zaitz C, Framil VM, Muramatu LH. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: a 24 year experience in São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2011; 53(2):89-93.

Yegneswaran PP, Sripathi H, Bairy I, Lonikar V, Rao R, Prabhu S. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. Int J Dermatol. 2009; 48:1198-1200.

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. 2013; 176:67-74

Zhang Z, Liu X, Lv X, Lin J. Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis. Mycopathologia. 2011; 172:439-446

Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, Feng P, Yang L, Chen M, Deng S, Li S, Liao W, Li R, Li F et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14,000 human and animal case reports. Persoonia. 2015; 1-20

Zhang Z, Liu X, Yang G, Gao X, Jin L, An L. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. Mycoses. 2006; 49:305-310.

Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, de Hoog GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. Fungal Diversity. 2014; 66:(1) 153-165.