



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

ANA CAROLINE DE SÁ MACHADO

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS DE
SPOROTHRIX BRASILIENSIS PROVENIENTES DE GATOS DO
RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2015

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS DE
SPOROTHRIX BRASILIENSIS PROVENIENTES DE GATOS DO
RIO DE JANEIRO**

ANA CAROLINE DE SÁ MACHADO

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

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

Rio de Janeiro

2015

ANA CAROLINE DE SÁ MACHADO

**SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE ISOLADOS DE
SPOROTHRIX BRASILIENSIS 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 Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dr. Sandro Antonio Pereira

Dr^a Tânia Maria Valente Pacheco

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Manoel Marques Evangelista de Oliveira
Doutor em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Fundação Oswaldo Cruz

Isabella Dib Ferreira Gremião
Doutora em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas
Fundação Oswaldo Cruz

Jeferson Carvalhaes de Oliveira
Doutor em Biologia Parasitária
Universidade Federal Fluminense

AGRADECIMENTO

Aos meus orientadores, Dr. Sandro Antonio Pereira e Dra. Tânia Maria Valente Pacheco pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Obrigado por estarem sempre presentes, me apoiando, aconselhando e principalmente, pelo carinho e compreensão nas horas mais difíceis.

Ao Dr. Rodrigo de Almeida Paes por ter me recebido no Laboratório de Micologia com todo seu apoio, por ter me ensinado com muita dedicação as técnicas do teste de susceptibilidade. Obrigado por estar sempre disposto a ajudar.

À equipe do Laboratório de Micologia, Fábio, Helena, Rowena e aos estagiários, sempre contribuindo com suas experiências. Obrigado pela atenção e por terem me ensinado além do que imaginava aprender.

À minha revisora Dra. Isabela Dib Ferreira Gremião por ter acompanhado e participado dessa jornada com sugestões, correções e principalmente, com dedicação, carinho e amizade. Muito obrigado!

À Prof. Dra. Raquel de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira pela colaboração na análise estatística.

À equipe do Lapclin-Dermzoo por serem essa grande família. Obrigado pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos, pelo incentivo e amizade. Sem o apoio de todos nos momentos difíceis este trabalho não existiria.

À Jéssica Boechat e Karoline por todo o auxílio e incentivo, pelo agradável trabalho em equipe e momentos de convívio.

Aos meus colegas de Mestrado e a todos os professores do curso de pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Infectologia, pelos bons momentos e dedicação.

À minha mãe por me incentivar, sendo meu apoio e exemplo de força. Obrigado por me fazer acreditar e me ajudar a seguir em frente.

À minha família e amigos por estarem sempre presentes com palavras de incentivo.

Ao meu noivo Leonardo Rabello pela compreensão e dedicação desde o início do mestrado.
Obrigado por lutar ao meu lado durante essa jornada.

À Fundação Oswaldo Cruz pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho.

Machado, ACS. **Susceptibilidade a antifúngicos de isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2015. 67f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] – Instituto Nacional de Infectologia.

RESUMO

Esporotricose é uma micose subcutânea causada por espécies que constituem o complexo *Sporothrix*, acometendo seres humanos e animais, principalmente os gatos. Na região metropolitana do Rio de Janeiro vem ocorrendo uma epidemia que até o ano de 2012, acometeu cerca de 4.000 seres humanos, 4.000 gatos e mais de 120 cães, diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fiocruz. A transmissão zoonótica que vem ocorrendo, principalmente através de arranhadura e mordedura de gatos doentes, tem sido relatada na maioria dos casos humanos assistidos na mesma instituição, demonstrando a dimensão do grave problema de saúde pública. No tratamento da esporotricose felina, o itraconazol é o fármaco de eleição. Entretanto, o cetoconazol, os iodetos, a terbinafina e a anfotericina B são outras opções de tratamento. No entanto, em uma parcela considerável de casos felinos provenientes dessa epidemia tratados com itraconazol e cetoconazol, tem sido observada a ocorrência de desfechos desfavoráveis, mas com um pequeno número de isolados analisados. Estudos sobre a susceptibilidade antifúngica de isolados de *Sporothrix* oriundos de casos humanos do Rio de Janeiro têm sido realizados. Porém, até o momento, apenas dois estudos foram conduzidos utilizando isolados de *Sporothrix* provenientes de gatos do Rio de Janeiro e os resultados sugeriram susceptibilidade à terbinafina e resistência ao itraconazol. Além disso, ainda não foram realizados estudos que associem a susceptibilidade antifúngica de isolados de gatos provenientes desta região, a apresentação clínica e ao desfecho do caso após tratamento antifúngico. O objetivo geral deste estudo foi avaliar os isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos da região epidêmica do Rio de Janeiro em relação à susceptibilidade antifúngica. Sendo os objetivos específicos: a) descrever e comparar a susceptibilidade *in vitro* de *Sporothrix brasiliensis* frente a fármacos antifúngicos e b) descrever a associação entre a susceptibilidade aos antifúngicos, as diferentes apresentações clínicas e o desfecho do caso após tratamento antifúngico com cetoconazol e itraconazol. Foram incluídos no estudo 47 isolados de *Sporothrix brasiliensis* de gatos provenientes de um ensaio clínico realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos do INI/Fiocruz. O teste de susceptibilidade *in vitro* para a fase filamentosa foi realizado utilizando o método de microdiluição em meio líquido de acordo com o protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Os agentes antifúngicos testados foram: anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e terbinafina. Os valores obtidos do perfil de susceptibilidade mostraram uma alta atividade *in vitro* da terbinafina, e uma moderada atividade da anfotericina B. Entre os azólicos, o cetoconazol apresentou melhor atividade *in vitro* que o itraconazol. Não houve associação entre as concentrações inibitórias mínimas encontradas com as diferentes apresentações clínicas e ao desfecho dos casos. Concluímos que, para os isolados felinos oriundos da região epidêmica do Rio de Janeiro, os azólicos apresentam moderada atividade *in vitro*, assim como a anfotericina B, sendo a terbinafina o antifúngico com a maior atividade *in vitro*.

Palavras-chave: 1. Susceptibilidade antifúngica 2 Fármacos antifúngicos 3 Aspectos clínicos e epidemiológicos 4 Esporotricose 5 Felinos

Machado, ACS. **Antifungal susceptibility of isolates of *Sporothrix brasiliensis* from cats from Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 2015. 67f. Thesis [Master Thesis in Clinical research on Infectious Diseases] – National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by *Sporothrix* species constituting the complex, affecting humans and animals, especially cats. In the metropolitan area of Rio de Janeiro has an epidemic occurring, and some 4,000 people, 4,000 cats and more than 120 dogs were diagnosed at the National Institute of Infectious Diseases (INI) / Fiocruz by the year 2012. The zoonotic transmission, which occurs mainly through scratching and biting from by sick cats, has been reported in most human cases seen in the same institution, demonstrating the scale of the severe public health problem. Itraconazole is the drug of choice in the treatment of feline sporotrichosis. Ketoconazole, iodides, terbinafine and amphotericin B are other treatment options. However, the occurrence of unfavorable outcomes has been observed in a considerable portion of felines cases from this epidemic treated with itraconazole and ketoconazole. Studies on the antifungal susceptibility of *Sporothrix* on isolates from human cases in Rio de Janeiro have been conducted. However, to date, only two studies were conducted using *Sporothrix* isolated from cats from Rio de Janeiro and the results suggested susceptibility to terbinafine and resistance to itraconazole. In addition, there were no studies linking the antifungal susceptibility of isolates of cats from this region, the clinical presentation and the outcome after antifungal treatment. The objectives of this study were to evaluate the clinical isolates of *Sporothrix brasiliensis* from cats from the epidemic region of Rio de Janeiro in relation to antifungal susceptibility. The specific objectives were: a) to describe and compare the *in vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* in front of antifungal drugs b) to describe the association between the susceptibility to antifungal agents, the different clinical presentations and the outcome after antifungal treatment with ketoconazole or itraconazole. The study included 47 isolates of *Sporothrix brasiliensis* of cats from a clinical trial conducted at the Clinical Research Laboratory in Dermatozoonoses in Domestic Animals/INI/Fiocruz. The *in vitro* susceptibility testing for filamentous phase was performed using the microdilution method in liquid medium in accordance with the protocol M38-A2 of the *Clinical and Laboratory Standards Institute*. The antifungal agents used in the test were: amphotericin B, ketoconazole, itraconazole and terbinafine. The values of the susceptibility profile showed a high *in vitro* activity of terbinafine, and a moderate activity of amphotericin B. Among the azoles, ketoconazole showed better *in vitro* activity than itraconazole. There was no association between the minimum inhibitory concentrations observed in the present study, the different clinical presentations and the outcome. We conclude that for the isolates from cats from the epidemic in the region of Rio de Janeiro, azoles showed moderate activity *in vitro*, as well as amphotericin B. Terbinafine is the antifungal with the greatest activity *in vitro*.

Keywords: 1. Antifungal Susceptibility 2. Antifungal Drugs 3 Clinical and epidemiological aspects 4. Sporotrichosis 5 Cats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1:** Colônias de *Sporothrix* consideradas viáveis após 7 dias de crescimento em meio PDA a 25°C.....23
- Figura 2:** Esquema de placa de 96 poços onde são distribuídas as diluições dos agentes antifúngicos com concentrações variando de 0,015-8µg/ml nas colunas de 2 a 11. CE= controle de esterilidade; CC= controle de crescimento.....24
- Figura 3:** Esquema de placa de 96 poços onde nas linhas de A a F são inoculados os isolados clínicos e nas linhas G e H as cepas para controle da ação dos antifúngicos (*A. flavus* e *A. fumigatus*).....25
- Figura 4:** Teste de susceptibilidade para a terbinafina de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= controle de esterilidade; Coluna 12= controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controles de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.....33
- Figura 5:** Teste de susceptibilidade para o cetoconazol de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= controle de esterilidade; Coluna 12= controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controles de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.....34
- Figura 6:** Teste de susceptibilidade para o itraconazol de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= controle de esterilidade; Coluna 12= controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controles de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.....34
- Figura 7:** Teste de susceptibilidade para a anfotericina B de cinco isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= controle de esterilidade; Coluna 12= controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controles de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.....35

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Valores das CIM de acordo com o antifúngico testado dos 48 isolados clínicos de <i>S. brasiliensis</i> provenientes de gatos com esporotricose diagnosticados no INI/FIOCRUZ, Rio de Janeiro(2006-2010).....	31
Quadro 2: CIM dos isolados de <i>S. brasiliensis</i> no teste de susceptibilidade para o cetoconazol de acordo com o desfecho do tratamento dos gatos tratados com o mesmo.....	37
Quadro 3: CIM dos isolados de <i>S. brasiliensis</i> no teste de susceptibilidade para o itraconazol de acordo com o desfecho do tratamento dos gatos tratados com o mesmo.....	38
Tabela 1: Distribuição das CIM dos antifúngicos em relação aos 48 isolados felinos de <i>S. brasiliensis</i>	32
Tabela 2: Perfil de susceptibilidade antifúngica de 48 isolados felinos de <i>S. brasiliensis</i> . Valores de MG, CIM 50% e CIM 90% para os fármacos testados.....	32
Tabela 3: Comparação entre os valores da CIM para o cetoconazol e o itraconazol segundo o antifúngico utilizado no tratamento.....	36
Tabela 4: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo o desfecho do tratamento antifúngico.....	36.
Tabela 5: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo a presença ou ausência de linfadenopatia.....	39
Tabela 6: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo o estado geral.....	39.
Tabela 7: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo a distribuição das lesões cutâneas.....	40.
Tabela 8: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo a ausência ou presença de sinais respiratórios.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnfB - Anfotericina B

BHI –*Brain heart infusion* (Infusão de cérebro e coração)

CC – Controle de crescimento

CE – Controle de esterilidade

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

CIM- Concentração inibitória mínima

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTZ – Cetoconazol

DMSO – Dimetilsulfóxido

EUCAST – *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

INI – Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ITZ – Itraconazol

LabMicol – Laboratório de Micologia

Lapclin-Dermzoo – Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos

MG – Média geométrica

PDA – *Potato Dextrose Agar* (Ágarbatata dextrose)

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

SPSS – *Statistical Package for Social Science*

TRB – Terbinafina

UFC – Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Complexo <i>Sporothrix</i>	1
1.2 Esporotricose	3
1.2.1 Aspectos epidemiológicos	3
1.2.2. Esporotricose Zoonótica	5
1.2.3 Esporotricose humana	6
1.3 Esporotricose felina	7
1.3.1. Aspectos clínicos	7
1.3.2. Diagnóstico laboratorial	8
1.3.3. Terapêutica	9
1.3.3.1. Anfotericina B	10
1.3.3.2. Azólicos	11
1.3.3.2.1 Cetoconazol	12
1.3.3.2.2 Itraconazol	12
1.3.3.3. Iodetos	13
1.3.3.4. Terbinafina	14
1.4 Testes de Susceptibilidade aos fármacos antifúngicos	15
2. JUSTIFICATIVA	19
3. OBJETIVO GERAL	20
3.1. Objetivos Específicos	20
4. MÉTODOS	21
4.1. Desenho do Estudo	21

4.2. Casuística	21
4.3 Análise de prontuários médicos	21
4.4. Materiais, Procedimentos e Técnicas	22
4.4.1 Isolados	22
4.4.1.1 Armazenamento dos isolados clínicos	22
4.4.2 Teste de Susceptibilidade aos antifúngicos	23
5. PLANO DE ANÁLISE	27
5.1 Variáveis	27
6. RESULTADOS	29
6.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos	29
6.2 Teste de Susceptibilidade	30
6.3 Correlações com o desfecho clínico	35
7. DISCUSSÃO	41
8. CONCLUSÃO	47
9. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Complexo *Sporothrix*

A esporotricose é uma micose subcutânea que acomete seres humanos e animais, sendo causada pelas espécies do complexo *Sporothrix schenckii* (López-Romero et al., 2011).

Em 1898, Benjamin Schenk realizou o isolamento fúngico de um paciente com lesões semelhantes ao que hoje se reconhece como sendo típico da esporotricose, sendo identificado esse fungo como pertencente ao gênero *Sporothrichum* (Schenk, 1898). Posteriormente, Hektoen e Perkins (1900), dois anos depois, classificaram este mesmo fungo como *Sporothrix schenckii*. Lutz e Splendore (1907) relataram os primeiros casos de esporotricose em seres humanos no estado de São Paulo.

Fungos do gênero *Sporothrix* são encontrados em plantas e matéria vegetal em decomposição, sendo, portanto, amplamente disperso no meio ambiente. A distribuição é universal, entretanto, apresenta predileção por climas temperados e tropicais, isto porque o crescimento do fungo na sua fase saprófita é influenciado pela temperatura atmosférica, pelo clima, e pela umidade relativa do ar (Rippon, 1988; Rivitti et al., 1999).

O dimorfismo foi demonstrado no início do século passado por Lutz e Splendore (1907). Na natureza ou em meio de cultura à 25°C, apresenta-se na forma filamentosa; enquanto que em parasitismo ou em meio de cultura à 37°C, encontra-se na forma leveduriforme (Kwon-Chung e Bennet, 1992).

As colônias filamentosas de *Sporothrix* spp. quando cultivadas em ágar Sabouraud glicose à 25°C, após três a cinco dias de crescimento, apresentam textura lisa e coloração branca acinzentada, porém, após alguns dias, algumas colônias tornam-se mais escurecidas do centro para a periferia. A micromorfologia da forma filamentosa apresenta hifas hialinas finas, associadas a conídios hialinos e demáceos, onde os hialinos surgem na porção apical dos conidióforos e os demáceos ocorrem lateralmente ao longo da hifa. Sendo ovóides e soltos, algumas vezes agrupados em conidióforos terminais, conferindo-lhes o aspecto de “margarida”. Em meio de infusão de cérebro e coração à 37°C, ocorre a conversão para forma

leveduriforme e observam-se colônias lisas e úmidas, de consistência cremosa e com superfície esbranquiçada. Microscopicamente, observam-se leveduras redondas, ovais ou em forma de naveta (Lacerda Filho et al., 1999; Ramos e Silva et al., 2007; Barros et al., 2011).

Estudos moleculares com base nas análises da sequência parcial dos genes de quitina sintase, β -tubulina e calmodulina demonstraram que o *Sporothrix schenckii* constitui um complexo de seis espécies, discriminadas filogeneticamente, como *S. schenckii strictu senso* (*s.str.*), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. luriei* (Marimon et al., 2006; Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008a; Oliveira et al., 2014).

Em relação a distribuição das espécies, *S. schenckii s. str.* é encontrado predominantemente nas Américas (Estados Unidos, Brasil, Peru, Argentina, Venezuela, Colômbia, Bolívia, Guatemala e México), Europa (França, Itália, e Reino Unido), Ásia (Japão) e África. *Sporothrix globosa* é encontrado na Europa (Reino Unido, Espanha e Itália), Ásia (China, Japão e Índia), tendo sido isolada também nas Américas (Brasil, Colômbia, Estados Unidos, México e Guatemala). Até o momento, *S. brasiliensis* foi isolado exclusivamente no Brasil (Rodrigues et al., 2013b; Sasaki et al., 2014), sendo o agente etiológico mais prevalente de esporotricose felina e humana neste país (Rodrigues et al., 2013b).

Sporothrix mexicana foi isolada em detritos vegetais no México, em solo na Austrália e em casos de infecção humana, uma em Portugal e outra no Brasil (Marimon et al., 2000; Dias et al., 2011; Rodrigues et al., 2013a; Rodrigues et al., 2013b). *Sporothrix pallida* é encontrado no ambiente e considerado não patogênico. Análises filogenéticas de isolados de *S. albicans*, *S. pallida* e *S. nivea* revelaram semelhanças significativas entre eles, propondo que estejam estreitamente relacionadas e foram classificadas todos como *S. pallida* (Meyer et al., 2008; Romeo et al., 2011). Já isolados clínicos de *S. luriei* já foram descritos na África, Índia e em um caso de esporotricose canina no Brasil (Rodrigues et al., 2013a).

Estudos recentes identificaram como espécies de relevância médica, *S. schenckii s. str.*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. brasiliensis*, sendo esta última a de maior virulência em modelo murino (Arrillaga-Moncrief et al., 2009; Rodrigues et al., 2013b; Rodrigues et al., 2014; Sasaki et al., 2014).

1.2 Esporotricose

1.2.1 Aspectos epidemiológicos

A esporotricose é classicamente definida como uma micose subcutânea, embora possa tornar-se disseminada (Kwon-Chung e Bennet, 1992), que acomete seres humanos e animais (Schubach et al., 2012). Dentre os animais acometidos, como chimpanzés, cachorros, porcos, ratos, camundongos, cavalos, mulas, bovinos, camelos, golfinho, cobras, galinhas, tatus e raposas (Costa et al., 1994; Crothers et al., 2009; Schubach et al., 2012), os gatos são a espécie com o maior número de casos relatados (Pereira et al., 2014).

Na natureza, o fungo pode ser encontrado como saprófita em matéria vegetal em decomposição, excreta de animais e no solo. A matéria orgânica presente no solo é fundamental para o seu desenvolvimento micelial, assim como a abundância de celulose. O pH ideal varia entre 3,5 a 9,4, a temperatura de 31°C e a umidade relativa de 92% (Barros et al., 2011).

A forma de transmissão clássica ocorre pela implantação traumática na pele através de plantas e matéria orgânica contaminada com o fungo. Atividades de lazer ou ocupacionais, como floricultura, agricultura, mineração e exploração de matas, estão associadas com a doença (Barros et al., 2011). Nos últimos anos, a transmissão zoonótica de *Sporothrix* tem sido relatada no Brasil ocorrendo através de mordidas, arranhões ou do contato direto com gatos doentes (Barros et al., 2011; Pereira et al., 2014).

A esporotricose apresenta distribuição geográfica universal, com predileção por áreas de clima tropical e temperado (Rippon, 1988; Zancopé-Oliveira, 2011). Sendo a micose subcutânea mais frequente na América Latina (Schubach et al., 2012).

Epidemias de esporotricose foram descritas em diferentes regiões do mundo. Uma das maiores ocorreu na África do Sul em meados do século passado, envolvendo cerca de 3.000 casos humanos (Helm e Berman, 1947). Na região metropolitana do Rio de Janeiro à partir de 1998, vem ocorrendo uma epidemia com transmissão zoonótica da esporotricose que até o ano de 2012, acometeu cerca de 4.000 seres humanos, 4.000 gatos e mais de 120 cães, diagnosticados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI)/Fundação

Oswaldo Cruz (Fiocruz) (Barros et al., 2010; Silva et al., 2012; Pereira et al., 2014; Gremião et al, 2015).

A esporotricose era considerada uma doença ocupacional de manipuladores de terra, ocorrendo predominantemente em pacientes do sexo masculino e de idade mais avançada (Lima, 1981). No entanto ocorre uma variação de acordo com a região geográfica. Em um estudo realizado no Rio de Janeiro identificou-se um perfil onde as mulheres em atividades domésticas, de idade adulta são as mais acometidas pela doença, indicando uma transmissão domiciliar. Além disso, observou-se que a doença não está relacionada à escolaridade, mas sim influenciada pelos hábitos e estilo de vida, às populações pobres que possuem casa com jardim, solo exposto, pavimentação incompleta e a presença do felino. Nesta última década, a esporotricose no Rio de Janeiro ficou evidenciada como uma doença urbana, não laborativa, ocorrendo em locais com baixa infraestrutura e saneamento (Barros et al, 2010; Silva et al., 2012).

A transmissão zoonótica descrita no Rio de Janeiro se caracteriza pela ocorrência em ambiente domiciliar, tendo como principal fonte de infecção o gato. O contato dos indivíduos com os gatos no ambiente domiciliar tem aumentando nos últimos anos, fato que contribui para o aumento da possibilidade de infecção da população (Schubach et al., 2002; Silva et al., 2012).

A epidemiologia da infecção fúngica pode ser influenciada por vários fatores, entre eles os fatores biológicos relacionados à virulência do fungo e a resistência do hospedeiro; fatores ecológicos, como temperatura, umidade atmosférica, radiação ultravioleta, condições geológicas e inter-relações com outros seres vivos; e fatores sócios econômicos, como saneamento, ocupação profissional, pobreza e hábitos de profilaxia. Na epidemia que ocorre no Rio de Janeiro, a combinação de um fungo altamente virulento e um hospedeiro susceptível, somado as baixas condições sanitárias, fez com que esta área se tornasse altamente endêmica para esporotricose entre humanos e animais (Rodrigues et al., 2013b).

1.2.2. Esporotricose Zoonótica

Os gatos são os principais animais envolvidos na transmissão de *Sporothrix* para o ser humano (Barros et al., 2008). Seu papel ganhou atenção desde 1980, quando um surto foi relatado envolvendo cinco pessoas expostas a um gato com esporotricose nos EUA (Read e Sperling, 1982). Desde então, casos ocorreram em diferentes regiões do mundo (Barros et al., 2011). Nas duas últimas décadas, a transmissão zoonótica da esporotricose vem sendo relatada no Brasil, especialmente na região metropolitana do Rio de Janeiro (Barros et al., 2001; Schubach et al., 2008; Madrid et al., 2009; Barros et al., 2010; Silva et al., 2012).

Alguns autores acreditam que os gatos são os animais que apresentam um importante potencial zoonótico em virtude da elevada quantidade de leveduras encontrada nas lesões (Schubach et al., 2012), além da presença do fungo nas unhas, secreções nasais e cavidade oral (Schubach et al., 2001; Souza et al., 2006; Rodrigues et al., 2013a). A presença do fungo nas garras dos felinos é uma importante fonte de transmissão, ao brigarem, morderem ou arranharem humanos e/ou outros animais, transmitem o fungo através do trauma (Larsson et al., 1989; Schubach et al., 2001, Borges et al., 2013).

Outro fator que torna o gato importante no ciclo de transmissão é a inoculação do fungo na sua fase leveduriforme, aumentando o aparecimento de formas mais severas da doença, tanto em humanos como em animais, já que a fase leveduriforme é considerada mais virulenta do que a fase filamentosa. Na transmissão tradicional, o fungo presente no solo e na matéria vegetal em decomposição se encontra na fase filamentosa (Rodrigues et al., 2013a).

O isolamento de fungos do gênero *Sporothrix* provenientes de diferentes amostras biológicas de gatos doentes (Schubach et al., 2012), associado aos relatos de casos humanos de esporotricose (Barros et al., 2004), ratificam a importância deste animal como fonte de infecção. Além disso, estudos moleculares descreveram a semelhança genética entre isolados felinos e humanos (Reis et al., 2009).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro no período de 1997 a 2007, de 1.848 casos de esporotricose humana, 65% possuíam contato com estes gatos e, dentre estes, 80,3% tiveram como fonte de infecção declarada o gato no ambiente domiciliar (Silva et al., 2012).

1.2.3 Esporotricose humana

A transmissão do *Sporothrix* spp. ocorre principalmente pela implantação traumática do fungo presente em matéria vegetal ou solo no tecido cutâneo (Rippon, 1988; Zancopé-Oliveira, 2011). A esporotricose humana, na região epidêmica do Rio de Janeiro, acomete ambos os sexos e todas as idades, diferenciando em relação à ocupação e a exposição ao fungo (Barros et al., 2011).

Conforme a localização das lesões pode-se classificar a esporotricose humana em linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada e extracutânea. As formas clínicas mais frequentes são a cutânea fixa e linfocutânea, acometendo principalmente indivíduos imunocompetentes. Na primeira pode ocorrer uma lesão única ou múltiplas lesões no local de inoculação do fungo, na maioria das vezes ulcerada, com bordas eritematosas. Já na segunda, as lesões primárias se localizam principalmente nas extremidades, iniciando com pápula ou pústula seguida da formação de nódulo subcutâneo, com a sua progressão lesões secundárias surgem ao longo do trajeto dos vasos linfáticos regionais. A forma cutânea disseminada, com ou sem envolvimento sistêmico, é caracterizada por múltiplas lesões em locais não contíguos, sendo menos frequente, afetando em geral pacientes imunodeprimidos. A forma extracutânea pode ocorrer em mucosa nasal ou conjuntival e alguns autores a consideram uma variação da forma cutânea. Já a forma extracutânea, assim como a cutânea disseminada, é menos frequente e de difícil diagnóstico. O tecido ósseo é o mais afetado, com lesões similares a osteomielite. Já a forma pulmonar e disseminada pode ser adquirida através da inalação de conídios, e são mais raras de ocorrer (Barros et al., 2011).

A forma clínica sob a qual a esporotricose acomete seres humanos depende de uma diversidade de fatores, como o tamanho do inóculo, a profundidade da inoculação traumática, a tolerância térmica da cepa e o estado imunológico do hospedeiro (Barros et al., 2010).

1.3 Esporotricose felina

O primeiro relato de esporotricose felina ocorreu nos Estados Unidos (Singer e Muncie, 1952). No entanto, até o fim do século passado, existiam poucos relatos da doença em gatos no Brasil (Freitas et al., 1956; Freitas et al., 1965; Larsson et al., 1989; Marques et al., 1993; Nobre et al., 2002). O primeiro caso de esporotricose felina no Rio de Janeiro foi descrito por Baroni e colaboradores (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). No período de 1998 a 2011 foram diagnosticados no INI/Fiocruz 3.804 casos de esporotricose felina, e entre janeiro e dezembro de 2012, 320 novos casos foram diagnosticados na mesma instituição, sendo o gato a espécie animal com o maior número de casos relatados na literatura mundial até o momento (Pereira et al., 2014; Gremião et al., 2015).

1.3.1. Aspectos clínicos

Geralmente, os gatos adquirem a esporotricose após brigas ou contato com outros gatos doentes, quando ocorre a inoculação de *Sporothrix* spp. através da pele. A infecção em gatos tem um amplo espectro clínico, podendo iniciar de forma subclínica e evoluir para lesões cutâneas únicas ou múltiplas, comprometimento sistêmico fatal, associado ou não a sinais extracutâneos, especialmente respiratórios. Os gatos podem apresentar mais de uma forma clínica da doença concomitantemente (Schubach et al. 2004a; Pereira et al., 2009; Pereira et al, 2014).

As lesões cutâneas mais frequentes são os nódulos, gomas e úlceras, recobertas ou não por crostas, podendo evoluir para necrose com exposição de ossos e músculos. A maioria das lesões está localizada na cabeça, nos membros e na cauda, sendo que em cerca de 40% dos casos, as lesões cutâneas são observadas 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 (Schubach et al., 2012).

A presença de sinais respiratórios é frequente, principalmente os espirros, ocorrendo em aproximadamente 40% dos casos, podendo estar associados a lesões localizadas na região nasal, inclusive em mucosa (Schubach et al., 2004a; Leme et al., 2007; Iachini, 2009; Crothers et al., 2009; Pereira et al., 2010). Estudos sugerem que a presença destes sinais, pode em alguns casos, preceder a observação de lesões cutâneas em gatos (Schubach et al., 2002; Schubach et al., 2004a). Além disso, Pereira e colaboradores (2010) observaram que os sinais respiratórios estão inversamente associados à cura clínica e diretamente associados ao desfecho óbito.

1.3.2. Diagnóstico laboratorial

Na esporotricose felina os sinais clínicos são inespecíficos e se faz necessário a realização de um diagnóstico diferencial para outras doenças. Deve-se levar em consideração além dos sinais clínicos, o histórico do paciente e os aspectos epidemiológicos (Schubach et al., 2012).

Nos gatos, os exames citológico e histopatológico são úteis no diagnóstico preliminar dessa micose (Pereira et al., 2011; Gremião et al., 2015). O exame citológico é realizado a partir do “imprint” das lesões cutâneas, podendo ser submetido às colorações de Gram, Wright ou do tipo Romanowsky. Observa-se o fungo em forma de levedura, arredondada a ovóide, ou em forma de “charuto” (Pereira et al., 2011; Schubach et al., 2012).

A histopatologia representa outro método de diagnóstico. Geralmente, observam-se estruturas leveduriformes pleomórficas, arredondadas a ovóides, por vezes em formato alongado, tanto no meio extracelular como no interior de macrófagos. As lesões cutâneas são caracterizadas por uma reação inflamatória piogranulomatosa, sendo a maioria dos casos caracterizados pela presença de granulomas mal formados, com predomínio de macrófagos e alta frequência de granulomas fúngicos, e mínima reação linfo-plasmocitária (Pereira et al., 2011; Miranda et al., 2013).

O diagnóstico definitivo da esporotricose é baseado no isolamento e identificação de *Sporothrix* spp. em meio de cultura. O isolamento é obtido pela cultura fúngica, inicialmente

em meio de ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e ciclohexamida e/ou ágar Mycosel. Após 5 a 7 dias, a 25°C, observa-se o crescimento de colônias hialinas filamentosas, podendo tornar-se de coloração castanha enegrecida. Por se tratar de um fungo dimórfico, é necessário para confirmação do diagnóstico realizar a sua conversão para fase leveduriforme por meio da inoculação em meio de infusão de cérebro e coração (BHI), a 37°C, durante 5 a 7 dias, no qual se observa colônia com aspecto cremoso e esbranquiçado (Rippon, 1988; Zancopé-Oliveira, 2011).

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., 2003b) e lavado broncoalveolar (Leme et al., 2007). Secreção nasal e exsudato de lesões cutâneas podem ser obtidos através de um *swab* estéril (Schubach et al., 2003a).

1.3.3. Terapêutica

Diferentes fármacos antifúngicos têm sido utilizados no tratamento da esporotricose em gatos (Schubach et al, 2012). Dentre esses, os azólicos itraconazol e cetoconazol são os antifúngicos mais relatados para tratamento da esporotricose felina (Pereira et al, 2010). O uso de iodetos, anfotericina B, termoterapia local, criocirurgia e remoção cirúrgica das lesões cutâneas, representam outras opções terapêuticas (Gremião et al, 2006; Pereira et al., 2009; Honse et al., 2010; Gremião et al., 2011). No entanto, a cura, a falência terapêutica, a recorrência e os efeitos adversos ocorrem independentemente do esquema terapêutico utilizado (Pereira et al., 2010; Gremião et al., 2015).

O tratamento da esporotricose felina, em muitos casos representa um desafio, pois o tempo de tratamento é longo, a administração dos fármacos por via oral é problemática, as opções terapêuticas são limitadas, e os fármacos antifúngicos podem ter efeitos adversos (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010; Gremião et al, 2015). Além disso, a adesão do responsável pelo gato ao tratamento é baixa (Schubach et al., 2004a). O abandono é mais frequente entre o segundo e o sexto mês após o início do tratamento, e ocorre principalmente no momento no qual o responsável pelo gato observa o início do processo cicatricial das lesões cutâneas (Schubach et al., 2004a; Chaves et al., 2013).

O tratamento deve ser mantido por no mínimo um mês após a remissão completa dos sinais clínicos, o que pode levar vários meses, independentemente do regime de tratamento (Pereira et al., 2010).

Algumas micoses subcutâneas graves são de difícil resolução, podendo apresentar uma progressão ao longo da terapia antifúngica ou até mesmo a recorrência das lesões, além de problemas de intolerância aos fármacos antifúngicos (Koga et al., 2003; Gremião et al., 2006). Outra causa que pode levar a recorrência da doença é a irregularidade do tratamento, impondo dificuldades no processo de cura e representando um obstáculo para o controle da esporotricose (Chaves et al., 2013).

1.3.3.1. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo poliênico que atua se ligando ao ergosterol, constituinte da membrana plasmática fúngica. Essa ligação leva a formação de canais tornando a membrana mais permeável e com isso acarretando na perda de íons e moléculas, provocando assim a morte celular, além de se unir a esteróis intracelulares, causando danos na célula (Cuenca-Estrella, 2010). Em baixas concentrações essa ligação é reversível, já em concentrações elevadas é irreversível, causando lesão oxidativa na célula fúngica (Warnock, 1991) ou rompimento das enzimas celulares fúngicas, ocasionando a morte celular (Papich et al., 2003; Pereira et al., 2009). A anfotericina B possui ainda um efeito imunomodulador em humanos, aumentando a resistência do hospedeiro à infecção (Pereira et al., 2009; Cuenca-Estrella, 2010).

Sua formulação convencional é associada ao desoxicolato de sódio (Filippin e Souza, 2006). O efeito adverso mais importante associado ao tratamento com a anfotericina B é a nefrotoxicidade. Devido a sua ligação ao esteróide principal da membrana celular das células dos mamíferos, o colesterol, levando assim a uma lesão tubular direta ao se ligar ao colesterol nas células tubulares, resultando em extravasamento eletrolítico da célula e acidose tubular renal (Papich et al., 2003). Essa nefrotoxicidade é dose-dependente, em geral a azotemia é reversível e a função renal retorna ao normal após a interrupção da terapia (Taboada, 2000). No intuito de diminuir sua toxicidade, foram desenvolvidas formulações lipídicas: a lipossomal, dispersão coloidal e complexo lipídico (Schubach et al., 2012).

O uso da anfotericina B é recomendado nas formas extracutânea e sistêmica da esporotricose humana (Kauffman et al., 2007). Já na esporotricose felina é recomendada para as formas disseminadas da doença (Peaston, 1993). Sua dose recomendada na literatura veterinária varia, e poucos são os estudos que utilizam a anfotericina B para o tratamento da esporotricose felina (Gremião et al., 2009; Pereira et al., 2009).

Sua administração por via intravenosa para tratamento da esporotricose felina não é satisfatório devido aos seus efeitos adversos, entre eles o óbito (Dustan et al., 1986). Em casos de esporotricose felina com falência terapêutica ao itraconazol, a associação de anfotericina B desoxicolato, por via subcutânea ou intralesional, pode ser uma alternativa (Pereira et al., 2009).

A associação de itraconazol oral (100 mg/dia) e anfotericina B subcutânea (0,5 mg/kg), foi utilizada no tratamento de 17 gatos com esporotricose refratária ao tratamento com azólicos. A cura clínica ocorreu em 35,3% dos casos e a formação de abscesso estéril local ocorreu em 23,5%, o que inviabilizou a continuidade da administração da anfotericina B (Rodrigues et al., 2009). O tratamento com anfotericina B intralesional e itraconazol oral foi descrito em 26 gatos com esporotricose refratária ao itraconazol, apresentando lesões cutâneas localizadas residuais, com o percentual de cura clínica de 72,7% (Gremião et al., 2011).

1.3.3.2. Azólicos

Os fármacos antifúngicos azólicos são agentes antifúngicos de amplo espectro (Papich et al., 2003).

O cetoconazol e o itraconazol atuam ligando ao grupamento heme que constitui parte de muitas das enzimas implicadas na síntese do ergosterol, principalmente a lanosterol-14-alfa demetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, bloqueando a síntese de ergosterol e acumulando 14-alfa metil esteróis. A inibição da enzima P-450 ocorre via ligação do nitrogênio ao átomo de ferro da heme do citocromo P-450 férrico, evitando a formação de complexo superóxido Fe^{3+} , necessário para hidroxilação dos metil-esteróis, e com isso uma incapacidade de desmetilar os esteróis C14-metil e de reduzir a síntese do ergosterol, inibindo o crescimento da célula fúngica e levando a alterações morfológicas que resultam em necrose celular (Papich et al., 2003; Cuenca-Estrella, 2010).

1.3.3.2.1 Cetoconazol

O cetoconazol utilizado no tratamento da esporotricose felina é encontrado no Brasil na forma de comprimidos de 200mg. Sua ação é fungistática, podendo ser fungicida em doses elevadas (Nobre et al., 2001). Para que sua absorção oral seja máxima, é necessário um pH ácido (Pereira et al, 2009).

O fármaco distribui-se por toda a pele e tecido subcutâneo, o que o torna eficaz para tratamento de infecções cutâneas fúngicas superficiais e sistêmicas, podendo ser utilizado na esporotricose felina, porém frequentemente está associado à ocorrência de efeitos adversos como hiporexia, anorexia, vômito, diarreia e aumento das enzimas hepáticas (Pereira et al., 2009; Gremião et al., 2015), sendo geralmente dose-dependente, devido ao cetoconazol ser um potente inibidor do citocromo P-450 fúngico dos mamíferos (Papich et al., 2003).

Pereira e colaboradores (2010) avaliaram a efetividade do cetoconazol em um estudo com 598 felinos com esporotricose e 28,6% obtiveram cura clínica recebendo uma dose de 13,5 a 27,0 mg/Kg/dia. Sendo observados desfechos desfavoráveis e efeitos adversos, dentre esses o mais comum forma a hiporexia, seguido de vômito e/ou diarreia.

1.3.3.2.2 Itraconazol

O itraconazol possui ação fungistática, mas dependendo da sua concentração e da susceptibilidade do fungo, pode ter ação fungicida (Pereira et al., 2009).

No Brasil é encontrado na forma de cápsulas de 10mg, 25mg, 50mg e 100mg (Pereira et al., 2009). Assim como o cetoconazol, a absorção do itraconazol ocorre em pH ácido, não devendo ser administrado com antiácidos, bloqueadores H₂ ou omeprazol (Papich et al., 2003). A administração desse fármaco é recomendada junto com alimentos, visando o aumento da biodisponibilidade (Taboada, 2000).

Esse fármaco apresenta afinidade lipofílica e proteica, levando à sua ampla distribuição na maioria dos tecidos orgânicos, em que as concentrações são superiores às encontradas no plasma, explicando a sua eficácia no tratamento de diferentes micoses (Catalán e Montejo, 2006). Possui alta afinidade e seletividade pela enzima citocromo P-450

fúngica, sendo mais bem tolerado que o cetoconazol (Papich et al., 2003). Os principais efeitos adversos relatados com o uso desse fármaco estão relacionados ao trato gastrointestinal como hiporexia, vômito, anorexia, perda de peso, diarreia, além da elevação das enzimas hepáticas (Pereira et al., 2009). Sendo considerado o fármaco de eleição nos casos de esporotricose humana (Kauffman et al., 2007) e felina devido à sua eficácia e segurança em comparação aos demais antifúngicos (Pereira et al., 2010).

Recomenda-se a dose de 5-27,7mg/Kg a cada 12-24h para o tratamento da esporotricose felina. O tempo de tratamento é prolongado e a administração do mesmo deve ser mantida no mínimo um mês após a cura clínica (Schubach et al., 2012).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro para avaliar a efetividade do itraconazol no tratamento da esporotricose felina, 175 gatos receberam este antifúngico na dose de 8,3 a 27,7 mg/Kg/dia a cada 24 horas. A cura clínica ocorreu em 38,3% dos gatos, com um tempo mediano de tratamento de 26 semanas. Ao se comparar a resposta ao tratamento e a presença dos efeitos adversos, o itraconazol apresentou maior efetividade e segurança quando comparado ao cetoconazol (Pereira et al., 2010).

1.3.3.3. Iodetos

O iodeto de potássio vem sendo utilizado no tratamento da esporotricose humana desde o início do século XX (Torres-Mendonza et al., 1997). Seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, acredita-se que ele atue através da modulação da reação inflamatória e na resposta imune, porém estudos *in vitro* sugerem que a conversão do iodeto de potássio em iodo promoveria danos às células leveduriformes (Torres-Mendonza et al., 1997; Reis et al., 2012). Sendo atualmente utilizado no tratamento da esporotricose humana e felina devido a sua efetividade e ao seu baixo custo quando comparado ao itraconazol (Sterling e Heymann, 2000; Reis et al., 2012).

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro com 48 gatos com esporotricose, o iodeto de potássio em cápsulas (2,5-20 mg/kg/dia) foi efetivo em 47,9% dos animais. A taxa de cura clínica foi similar a encontrada em estudos com o itraconazol, sugerindo que este seja uma alternativa ao tratamento da esporotricose felina (Reis et al., 2012), obtendo uma relação custo-efetividade com menor dispensa de recursos. Os gatos são sensíveis ao iodeto, sendo

comum a apatia, anorexia, vômito, espasmos musculares, hipotermia, entre outros (Pereira et al., 2009).

1.3.3.4. Terbinafina

A terbinafina, pertencente à classe das alilaminas, possui ação fungicida (Diogo et al., 2010). Seu mecanismo de ação é através da inibição da esqualeno epoxidase, diminuindo a síntese do ergosterol, e assim levando ao rompimento da membrana celular, resultando na morte da célula fúngica (Balfour e Faulds, 1992). É um fármaco mais seletivo para célula fúngica, pois não se liga às enzimas do citocromo P-450, não causando interação de fármacos ou inibição da síntese de esteróides nos animais (Papich et al., 2003).

No Brasil é encontrada na forma de comprimidos de 125mg e 250mg. Possui boa absorção por via oral e a ingestão de alimentos pode aumentar a sua absorção (Pereira et al., 2009).

Apresenta alta efetividade no tratamento das dermatofitoses e de infecções superficiais causadas por leveduras em cães e gatos (Greene, 2012). Desde 1990, estudos têm descrito uma boa resposta ao tratamento com terbinafina nos pacientes humanos apresentando a forma cutânea e linfocutânea da esporotricose (Francesconi et al., 2009; Song et al., 2010; Francesconi et al., 2011). Entretanto, o uso deste fármaco isoladamente ou associado ao itraconazol demonstrou baixa efetividade no tratamento de gatos com esporotricose em estudo de Schubach e colaboradores (2004a).

1.4 Testes de Susceptibilidade aos fármacos antifúngicos

Os testes de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos antifúngicos foram desenvolvidos devido ao surgimento de espécies resistentes, novos fármacos e da ocorrência de falha terapêutica. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é importante para a orientação ao tratamento e na avaliação de novos agentes antifúngicos (Schreiber, 2007).

Em 1982, o *National Commitee for Clinical of Laboratory Standards* (NCCLS), atualmente *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), órgão internacional que padroniza e controla a realização de testes de sensibilidade, organizaram um subcomitê para padronização do teste de susceptibilidade à antifúngicos para leveduras, pelo método de microdiluição em caldo. Fatores pré-analíticos mais relevantes foram estudados e adaptações foram feitas, resultando em documentos como M27-P, M27-T, M27-A, e apenas em 1998 foi editado o M38-P, específico para formas de conídios de fungos filamentosos. Atualmente, o documento de referência utilizado para o teste de susceptibilidade para fungos filamentosos é o M38-A2 (Schreiber, 2007; CLSI, 2008).

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos em sua maioria empregam técnicas de diluição em caldo que estão baseadas no cálculo da CIM estimada pelo percentual de inibição em relação a um controle de crescimento (Cuenca-Estrella e Rodriguez-Tudela, 2002).

Atualmente dois métodos padronizados estão disponíveis para realização do teste de susceptibilidade antifúngica com *Sporothrix* spp.. O CLSI propõe um teste de microdiluição onde o inóculo utilizado é $0,4 - 5,0 \times 10^4$ UFC/mL, obtido a partir de uma colônia filamentosa com sete dias de incubação em ágar batata dextrose (PDA), 37°C, inoculado em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) – 1640, para a realização da diluição seriada dos antifúngicos. Transcorridos 46 a 50 horas de incubação a 35°C, sem agitação, a CIM é determinada, sendo esta a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede crescimento visível de um microorganismo no teste de susceptibilidade (CLSI, 2008).

O outro protocolo foi padronizado pelo European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), o qual utiliza um inóculo final de $1-2,5 \times 10^5$ UFC/mL obtido a partir de uma colônia de dois a cinco dias de crescimento, inoculado em meio RPMI – 1640 suplementado com glicose 2% acondicionado em microplacas. O ponto de corte é lido visualmente após 48 horas de incubação a 35 – 42°C.

O ponto de corte para fungos filamentosos, incluindo *Sporothrix* spp, não foi estabelecido até o momento. Baseado em estudos prévios de susceptibilidade antifúngica realizados com outros fungos filamentosos, a CIM pode ser agrupada para fins analíticos como susceptível ($CIM \leq 1 \mu\text{g/ mL}$), intermediária ($CIM = 2 \mu\text{g/ mL}$) ou resistente ($CIM \geq 4 \mu\text{g/ mL}$). Pontos de corte com relevância clínica comprovada ainda não foram determinados pelas agências regulatórias (CLSI, 2008).

Estudos *in vitro* demonstraram uma variedade de resultados entre os isolados testados, e alguns autores concluíram que a susceptibilidade antifúngica é cepa dependente. Isso pode ser explicado porque *Sporothrix* spp. não é representado por uma única espécie (Marimon et al., 2008b; Barros et al., 2011; Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2014).

A distribuição geográfica dos isolados do gênero *Sporothrix* parece ter um papel relevante na susceptibilidade antifúngica. Isolados humanos provenientes da área epidêmica do Rio de Janeiro são mais susceptíveis ao itraconazol e a terbinafina que isolados provenientes de outras regiões. Esse comportamento pode estar relacionado às diferenças na susceptibilidade das novas espécies descritas a partir do complexo *Sporothrix* (Barros et al., 2011).

Estudos sobre a susceptibilidade antifúngica de isolados de *Sporothrix* oriundas de casos humanos do Rio de Janeiro são diversos (Kohler et al., 2004; Trilles et al., 2005; Gutierrez-Galhardo et al., 2010; Zhang et al., 2011; Borba-Santos et al., 2015; Rodrigues et al., 2014; Stopiglia et al., 2014). Os achados *in vitro* demonstraram susceptibilidade para o itraconazol, sugerindo este como tratamento de escolha para casos de esporotricose humana (Alvarado-Ramirez e Torres-Rodriguez, 2007 ; Meirnez et al., 2007). Já a anfotericina B apresenta altos valores de CIM, representando uma baixa atividade *in vitro* deste fármaco para o *Sporothrix* (Alvarado-Ramirez e Torres-Rodriguez, 2007; Gutierrez-Galhardo et al., 2008; Rodrigues et al., 2014; Stopiglia et al., 2014 ; Borba-Santos et al., 2015). No entanto, em um estudo observou-se valores abrangentes de CIM (0,06- 16 $\mu\text{g/ml}$), sugerindo que a susceptibilidade do *Sporothrix* para a anfotericina B seria cepa dependente (Alvarado-Ramirez e Torres-Rodriguez, 2007).

Já a terbinafina é o fármaco que apresenta melhor atividade *in vitro* frente a isolados humanos, com baixos valores de CIM (Gutierrez-Galhardo et al., 2008; Silveira et al., 2011; Zhang et al., 2011), seguido do cetoconazol (Stopiglia et al., 2014).

Esses achados dos testes de susceptibilidade *in vitro* para que possam ser relacionados com os achados clínicos *in vivo*, alguns estudos já foram realizados com isolados de pacientes humanos. Os isolados na fase leveduriforme de pacientes com lesões disseminadas

apresentaram menor susceptibilidade ao itraconazol que os isolados daqueles com formas cutâneas e linfocutâneas (Trilles et al., 2005). No entanto, Gutierrez-Galhardo e colaboradores (2008) não encontraram diferença significativa em relação aos valores de CIM de isolados humanos oriundos de pacientes com diferentes apresentações clínicas da doença, assim como à resposta clínica destes pacientes.

Poucos estudos sobre susceptibilidade antifúngica de isolados felinos foram realizados, quando comparados aos estudos com isolados humanos. Kohler e colaboradores (2004) realizaram um estudo de susceptibilidade com nove isolados de *S. schenckii* provenientes de gatos do Rio de Janeiro e os resultados sugeriram resistência ao itraconazol. No entanto, Alvarado-Meirnez e Torres-Rodriguez (2007) utilizando seis isolados felinos e um canino, observaram susceptibilidade ao itraconazol para três isolados felinos, e resistência para os demais isolados, inclusive o canino. Enquanto que para terbinafina, todos os isolados demonstraram uma intensa atividade *in vitro*. Em um estudo realizado no Rio Grande do Sul, observou-se que a proporção de espécies de *Sporothrix* resistentes ao itraconazol foi maior nos isolados animais quando comparado aos isolados humanos (Oliveira et al., 2011).

Por se tratar de um complexo composto por espécies crípticas, acredita-se que ocorra uma variação na susceptibilidade antifúngica entre as espécies. Diante de tal hipótese, um estudo com isolados provenientes de animais foi realizado, demonstrando que o isolado felino de *S. albicans* e o isolado canino de *S. luriei*, apresentaram resistência ao itraconazol quando comparados aos demais isolados felinos de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. Já para anfotericina B e terbinafina, não houve diferença entre as espécies, sendo a terbinafina o fármaco com melhor atividade contra todos os isolados (Oliveira et al., 2011).

Estudo realizado por Rodrigues e colaboradores (2014), comparando a susceptibilidade antifúngica de diferentes espécies que fazem parte do complexo *Sporothrix*, observou-se que o itraconazol apresenta melhor atividade *in vitro* contra as cepas de *S. brasiliensis*, quando comparado ao *S. schenckii* e *S. mexicana*, no entanto ainda sendo considerada sua atividade moderada. Enquanto que anfotericina B apresenta moderada atividade contra *S. brasiliensis* e altos valores de CIM para *S. schenckii s. str.* (Rodrigues et al., 2014).

Os testes de susceptibilidade a antifúngicos pode ser influenciado pela fase de crescimento do fungo, a qual teria influência sobre as CIM (Zhang et al., 2011). Devido às características morfológicas do *Sporothrix*, no ambiente e no paciente, existem questionamentos sobre se a forma conidial seria a mais adequada para esta avaliação, já que os conídios são formas de resistência dos fungos filamentosos (Schreiber, 2007). Diferenças

estatísticas significantes nos valores de CIM para itraconazol e terbinafina foram encontradas quando comparadas as duas fases de crescimento do fungo, indicando que a fase de crescimento teria influência na susceptibilidade do fármaco (Zhang et al., 2011). Ao comparar as duas fases de crescimento fúngico com isolados felinos, humanos e do ambiente, observou-se que a terbinafina apresentou melhor atividade *in vitro*, com baixos valores de CIM, em relação a todos os isolados em ambas as fases de crescimento, enquanto que itraconazol apresentou altos valores de CIM para ambas as fases. Já a anfotericina B obteve valores mais altos de CIM para fase filamentosa (Borba-Santos et al., 2015).

2. JUSTIFICATIVA

A esporotricose é um problema de saúde pública que ocorre na região metropolitana do Rio de Janeiro desde 1998. Ao longo dos últimos 17 anos mais de 8.000 casos entre humanos e felinos foram diagnosticados somente no INI/Fiocruz, demonstrando a gravidade da situação epidemiológica nesta região.

Nessa epidemia o gato é a principal fonte de infecção de *Sporothrix* para o ser humano e outros animais. Alguns autores acreditam que para fins de saúde pública e de controle da doença, é necessário, dentre outras medidas, o tratamento da população felina acometida pela doença (Schubach et al., 2004a; Barros et al., 2010). Diferentes estudos demonstraram a susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de humanos frente a antifúngicos. Entretanto, existem poucos estudos desta natureza utilizando os isolados felinos, sendo que em nenhum deles houve a associação com a apresentação clínica e a resposta terapêutica.

O estudo dos isolados clínicos de *S. brasiliensis* de gatos provenientes de um ensaio clínico realizado numa região epidêmica constitui uma oportunidade única para o conhecimento do perfil de susceptibilidade antifúngica, visando estabelecer uma possível associação entre os resultados dos testes *in vitro*, as características clínicas e o desfecho do tratamento antifúngico realizado com itraconazol e cetoconazol.

3. OBJETIVO GERAL

Estudar os isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos da região epidêmica do Rio de Janeiro em relação à susceptibilidade antifúngica.

3.1. Objetivos Específicos

- a) Descrever e comparar a susceptibilidade *in vitro* de *Sporothrix brasiliensis* isolados de gatos no Rio de Janeiro frente a fármacos antifúngicos;
- b) Descrever a associação entre a susceptibilidade antifúngica, as diferentes apresentações clínicas e o desfecho do caso após tratamento antifúngico com os derivados azólicos, cetoconazol e itraconazol.

4. MÉTODOS

4.1. Desenho do Estudo

Estudo transversal retrospectivo da susceptibilidade antifúngica de isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos.

4.2. Casuística

Utilizada uma amostra de conveniência composta por 47 isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos incluídos em um ensaio clínico fase IV, randomizado, duplo-cego e controlado de duas diferentes doses de cetoconazol e itraconazol, realizado no Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos (Lapclin-Dermzoo) do INI/Fiocruz (Licença CEUA/Fiocruz L-041/06), no período de 2006 a 2010.

4.3 Análise de prontuários médicos

A revisão dos prontuários médicos, sob a guarda do Lapclin-Dermzoo/INI/Fiocruz, foi realizada para a coleta das variáveis clínicas (distribuição das lesões cutâneas, ocorrência de linfadenopatia, presença de sinais respiratórios e estado clínico geral), epidemiológicas

(dado sócio demográfico) e terapêuticas (tratamento antifúngico empregado e desfecho do caso) dos gatos dos quais os isolados de *Sporothrix brasiliensis* foram provenientes.

As informações foram obtidas por meio de um banco de dados do ensaio clínico construído no *software Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 16.0.

4.4. Materiais, Procedimentos e Técnicas

4.4.1 Isolados

Os isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* utilizados no estudo foram obtidos dos gatos antes da instituição do tratamento antifúngico, e estavam sob a guarda do Laboratório de Micologia (LabMicol)/ INI/ Fiocruz. Os mesmos foram identificados a nível de espécie e caracterizados pela técnica molecular T3B *fingerprinting* (Boechat, 2015).

4.4.1.1 Viabilidade e Armazenamento dos isolados clínicos

Os isolados considerados viáveis, foram armazenados a partir do método de conservação em Skim Milk (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Switzerland), a -20°C, sendo considerados viáveis após o crescimento em meio PDA e posterior identificação morfológica por meio dos aspectos macroscópicos (Figura 1) e microscópicos de suas colônias.

No protocolo de armazenamento utilizado, as amostras foram semeadas em meio PDA e incubadas durante sete dias a temperatura ambiente, em tubos de 20 x 200 mm, para o crescimento de boa quantidade de massa celular. Após o crescimento foi adicionado 4 mL de Skim Milk a 20% no tubo contendo o fungo no meio, e com a ajuda de uma pipeta graduada de 5 mL foi realizada a fricção na superfície das colônias a fim de que os conídios fossem então liberados. A homogeneização e a suspensão dos conídios foi efetuada por meio da pipetagem. Alíquotas de 1 mL foram depositadas em criotubos e armazenadas a -20°C.



Figura 1: Colônias de *Sporothrix brasiliensis* consideradas viáveis após 7 dias de crescimento em PDA a 25°C.

4.4.2 Teste de Susceptibilidade aos antifúngicos

O teste de susceptibilidade *in vitro* para a fase filamentosa foi realizado no LabMicol/INI/Fiocruz, foi utilizado o método de microdiluição em meio líquido de acordo com o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008).

Os agentes antifúngicos testados foram a anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e a terbinafina (Sigma Chemical Corporation, St Louis, MO, USA). Esses fármacos foram diluídos de forma seriada em dimetilsulfóxido (DMSO) (AudazBrasil, Lote 1304936) de qualidade analítica, de acordo com o CLSI, adicionado de glicose a 20%, com o intuito de facilitar o crescimento fúngico. Sendo recomendado realizar o preparo de uma série de diluições da solução padrão do antifúngico, a 100 vezes a concentração final, devido ao uso do DMSO.

Após a diluição do agente antifúngico em DMSO, foi realizada uma nova diluição de 1:50 em RPMI-1640, sendo a mesma distribuída em placas de 96 poços, cujas concentrações finais dos fármacos variaram de 0,015 a 8,0 µg/mL (Figura 2).

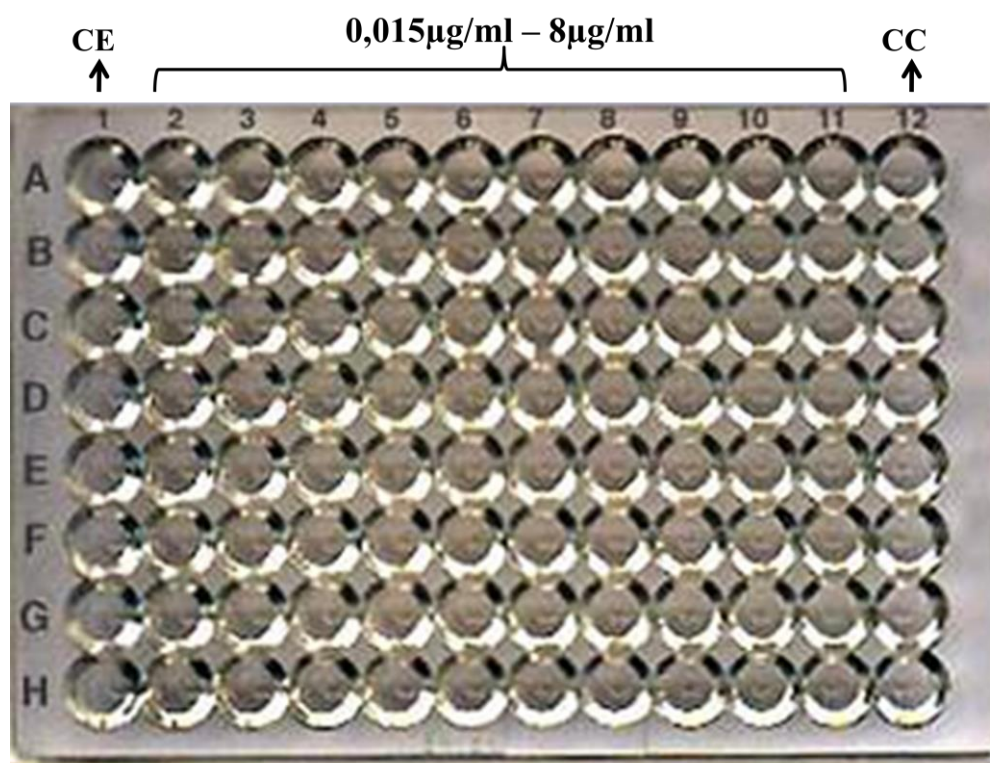


Figura 2: Esquema de uma placa de 96 poços. Distribuição das diluições dos agentes antifúngicos, com concentrações variando de 0,015-8µg/mL nas colunas de 2 a 11.

CE= Controle de esterilidade; CC= controle de crescimento;

Os conídios dos isolados de *S. brasiliensis* cultivados em meio PDA a 37°C por sete dias foram suspensos em solução salina estéril, e as densidades das suspensões foram lidas e ajustadas para uma densidade óptica que variou de 0,09 a 0,11; posteriormente foi realizada uma diluição de 1:50 em meio RPMI 1640 e incubados a 37°C nas placas de fundo chato de 96 poços com as diferentes concentrações dos fármacos numa densidade final de 1 a 5×10^4 UFC/mL. Como controle da ação dos antifúngicos em cada placa foram utilizadas cepas dos fungos *Aspergillus fumigatus* ATCC 204305 e *Aspergillus flavus* ATCC 204304, conforme recomendado pelo CLSI (2008) (Figura 3).

As placas foram incubadas por 72 horas e realizada a leitura dos testes pela inspeção visual no fundo da placa, verificando os poços e as respectivas concentrações dos fármacos capazes de inibirem o crescimento fúngico, sendo assim determinada a CIM. A leitura dos resultados foi feita através da comparação do crescimento em cada poço com o do controle de crescimento, com o auxílio do espelho de leitura.

Os experimentos foram realizados em duplicata, a fim de se determinar a concordância essencial entre as leituras. Os resultados dos dois experimentos foram considerados concordantes quando as CIM determinadas nos diferentes experimentos não apresentaram variação em mais de duas diluições. Essa leitura foi realizada somente após 72 horas da inoculação devido à dificuldade de visualização do crescimento fúngico em tempo inferior como protocolado pelo CSLI (46-50 horas).

As CIM dos controles foram estabelecidas e os resultados foram validados por meio da utilização das cepas de referência, cujos valores estavam dentro da faixa de CIM recomendada pelo protocolo.

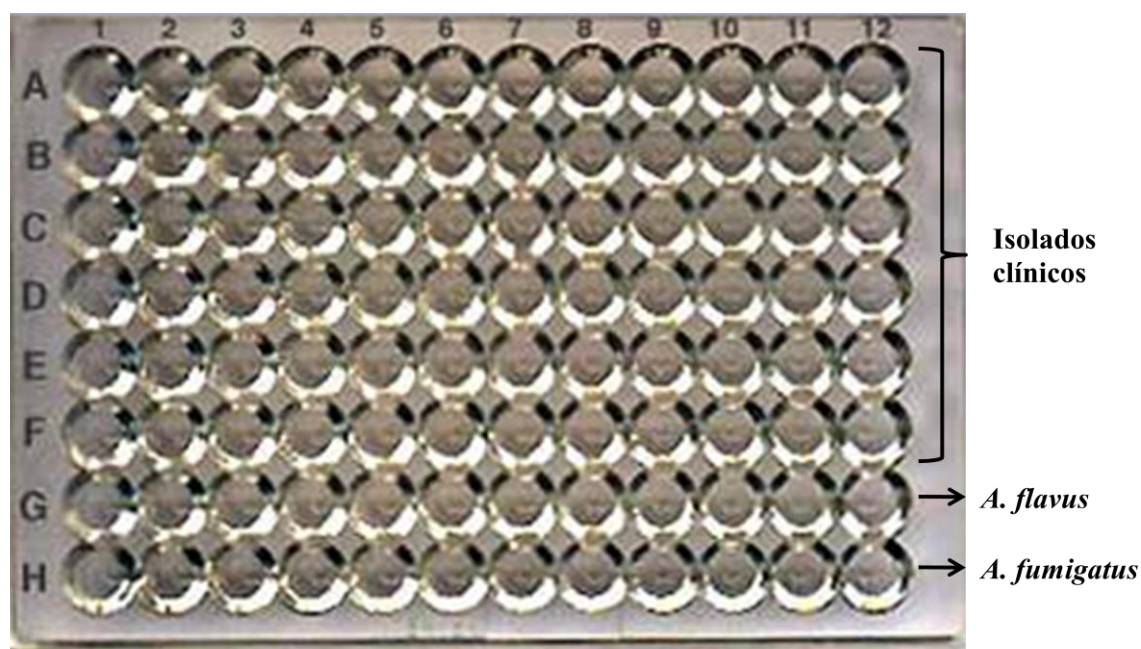


Figura 3: Esquema de placa de 96 poços. Nas linhas de A a F são inoculados os isolados clínicos e, nas linhas G e H as cepas para controle da ação dos antifúngicos (*A. flavus* e *A. fumigatus*).

A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento fúngico em 100% para a anfotericina B e para o itraconazol, 80% do crescimento fúngico para a terbinafina e 50% do crescimento fúngico para o cetoconazol.

Determinada a CIM, foram calculadas as médias geométricas (MG), as variações dos valores máximos e mínimos, assim como os valores de CIM 50% e 90%, que são as CIM capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% dos isolados fúngicos para cada antifúngico.

Os resultados do teste de susceptibilidade antifúngica (expressos por meio da MG dos valores de CIM determinados em pelo menos dois experimentos distintos) foram comparados com a apresentação clínica inicial e o desfecho do caso segundo o tratamento antifúngico realizado com itraconazol e cetoconazol.

5. PLANO DE ANÁLISE

A análise exploratória de dados foi realizada pela descrição de frequências das variáveis qualitativas (distribuição das lesões cutâneas, ocorrência de linfadenopatia, presença de sinais respiratórios, estado clínico geral, dado sócio demográfico, antifúngico utilizado e desfecho) e medidas-resumo (média, mediana desvio-padrão e intervalo interquartil) das variáveis quantitativas. Adicionalmente, foram descritas as CIM para cada antifúngico testado (mínimo, máximo, 50%, 90% e MG).

Na verificação de associação entre variáveis categóricas, foi empregado o teste qui-quadrado de Pearson. No caso de células com contagens abaixo de cinco ou tabelas formadas por duas linhas e duas colunas (2x2), foi utilizado o teste exato de Fisher.

Já para a verificação da normalidade de variáveis contínuas foi empregado o teste de Kolmogorov-Smirnov, que indicou a utilização de testes não paramétricos. Na comparação dos valores de variáveis contínuas entre dois grupos (antifúngico, estado geral, presença de linfadenopatia e sinais respiratórios) foi empregado o teste de Mann-Whitney, e para dois ou mais grupos (desfecho e distribuição das lesões cutâneas) o teste de Kruskal-Wallis.

P-valores $< 0,05$ indicaram testes estatisticamente significativos.

5.1 Variáveis

As variáveis analisadas estão definidas abaixo:

- Presença de linfadenopatia: aumento de linfonodo em um ou mais sítios anatômicos.
- Presença de sinais respiratórios: espirros, rinorréia, dispnéia e tosse.

- Distribuição das lesões cutâneas: os gatos foram agrupados em 3 grupos: L1, gatos com lesões em apenas um local; L2, gatos com lesões em 2 locais não contíguos; e L3, gatos com lesões em 3 ou mais locais não contíguos (Schubach et al.,2004a).

- Estado geral dos gatos foi classificado em 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) e ruim (magreza ou caquexia, hipo ou anorexia, distúrbios gastrintestinais ou urinários, desidratação severa, temperatura corporal alterada, estado de alerta alterado).

Os gatos foram submetidos aos seguintes esquemas terapêuticos: itraconazol (50 ou 100 mg/gato/dia) ou cetoconazol (50 ou 100 mg/gato/dia). A variável desfecho foi definida como: favorável (cura clínica), desfavorável (falência terapêutica e óbito relacionado à esporotricose) e outros (óbito não relacionado à esporotricose, perda de seguimento e exclusão do ensaio clínico).

6. RESULTADOS

6.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Os dados clínicos e epidemiológicos de 47 gatos foram analisados, dos quais foram provenientes os isolados. Destes, 35 residiam no município do Rio de Janeiro, sete em Nova Iguaçu, três em São João de Meriti e dois em Duque de Caxias. A população felina era constituída majoritariamente por machos (74,5%), não castrados (59,6%) e que tinham acesso à rua (85,1%). A média das idades foi 35,5 meses. Em 60% dos casos, os responsáveis pelos animais relataram que havia a presença de pelo menos mais um gato no domicílio, e que 68,1% tinham o hábito de brigar com outros gatos.

Em relação ao estado geral dos animais, 42 (89,4%) apresentava bom estado geral e cinco (10,6%) estado geral regular. A linfadenopatia estava presente em 42 (89,4%) animais. Em relação à distribuição das lesões cutâneas, 15 (31,9%) animais eram do grupo L1, 16 (34%) do grupo L2 e 16 (34%) do grupo L3. Do total de gatos (47), 46 apresentaram lesões cutâneas ulceradas. Destes, 18 apresentaram lesão em mucosa. Em um caso foi observada somente lesão em mucosa nasal.

Os sinais respiratórios estavam presentes em 27 (57,4%) gatos, principalmente espirro (51%) e rinorréia (48,9%).

Em relação ao tratamento antifúngico empregado, 25 (53,2%) foram tratados com itraconazol e 22 (46,8%) com cetoconazol. A cura clínica ocorreu em 17 (36,2%) gatos. Desfechos desfavoráveis foram observados em 16 (34%), sendo 10 devido à falência terapêutica e seis por óbito em consequência da esporotricose. Em 14 gatos (29,8%), ocorreram dois óbitos por outra causa não relacionada à esporotricose, em 10 houve abandono do tratamento e dois foram retirados do ensaio clínico devido a critérios de elegibilidade pré-estabelecidos.

6.2 Teste de Susceptibilidade

De acordo com as CIM encontradas (Quadro 1), foram determinadas as MG, as variações dos valores máximos e mínimos, e os valores de CIM50% e 90%.

Os valores das CIM para as cepas de referência *A. flavus* e *A. fumigatus* estavam dentro dos valores descritos para a anfotericina B (0,5 - 4 μ g/mL e 0.5 - 2 μ g/mL, respectivamente) e para o itraconazol (0.2 - 0.5 μ g/mL e 0.12 - 1.0 μ g/mL, respectivamente). Os demais fármacos testados não possuem valores de CIM pré-estabelecidos com estas cepas, mas os mesmos se mantiveram uniformes durante o estudo.

Quadro 1: Valores das CIM de acordo com o antifúngico testado dos 47 isolados clínicos de *S. brasiliensis* provenientes de gatos com esporotricose diagnosticados no INI/Fiocruz, Rio de Janeiro (2006-2010).

Isolados	CIM (µg/mL)			
	AnfB	CTZ	ITZ	TRB
1(8440)	0,50	1,00	0,50	0,03
2(8491)	1,00	0,50	1,00	0,06
3(8509)	1,00	1,00	1,00	0,06
4(8488)	0,25	0,25	0,50	0,06
5(8547)	0,25	0,50	0,50	0,03
6(8584)	0,50	0,50	0,50	0,03
7(8607)	2,00	0,50	1,00	0,06
8(8612)	1,00	0,50	1,00	0,06
9(8639)	2,00	1,00	1,00	0,03
10(8648)	2,00	1,00	1,00	0,03
11(8678)	1,00	0,50	1,00	0,03
12(8671)	0,50	0,25	1,00	0,03
13(8688)	1,00	0,25	1,00	0,06
14(8664)	1,00	0,12	1,00	0,06
15(8695)	2,00	0,50	1,00	0,06
16(8723)	1,00	1,00	1,00	0,06
17(8718)	2,00	0,50	1,00	0,06
18(8726)	1,00	0,50	0,50	0,03
19(8761)	2,00	0,50	1,00	0,03
20(8756)	1,00	1,00	1,00	0,03
21(8775)	1,00	1,00	2,00	0,03
22(8729)	1,00	2,00	2,00	0,06
23(8862)	1,00	1,00	1,00	0,03
24(8854)	1,00	0,50	1,00	0,06
25(8881)	1,00	0,50	1,00	0,12
26(8912)	2,00	1,00	1,00	0,03
27(8908)	1,00	0,50	1,00	0,06
28(8904)	2,00	1,00	1,00	0,12
29(8887)	2,00	1,00	1,00	0,06
30(8902)	2,00	1,00	2,00	0,06
31(8986)	1,00	0,50	1,00	0,03
32(9042)	2,00	1,00	2,00	0,015
33(9032)	2,00	1,00	1,00	0,06
34(9020)	2,00	1,00	2,00	0,03
35(9062)	2,00	1,00	2,00	0,03
36(9056)	2,00	1,00	2,00	0,03
37(9050)	2,00	1,00	1,00	0,03
38(9090)	1,00	1,00	1,00	0,03
49(9099)	1,00	0,50	1,00	0,06
40(9101)	2,00	1,00	2,00	0,03
41(9115)	2,00	0,50	1,00	0,03
42(9203)	1,00	0,50	1,00	0,03
43(9236)	2,00	1,00	2,00	0,03
44(9260)	1,00	1,00	2,00	0,03
45(9345)	2,00	0,50	1,00	0,03
46(9362)	2,00	0,50	1,00	0,06
47(9409)	2,00	1,00	2,00	0,06

CIM=Concentração inibitória mínima; AnfB= anfotericinaB;
CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina

A Tabela 1 mostra a distribuição das CIM para os quatro fármacos testados, dos 47 isolados felinos de *S. brasiliensis*. Já o perfil de susceptibilidade antifúngica dos isolados de acordo com a MG, a CIM50% e a CIM90% para cada fármaco testado estão descritos na Tabela 2.

Tabela 1: Distribuição das CIM dos antifúngicos em relação aos 47 isolados felinos de *S. brasiliensis*.

Fármaco testado	N° de isolados de acordo com a CIM (µg/ml)							
	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2
AnfB	-	-	-	-	2	3	20	22
CTZ	-	-	-	1	3	19	23	1
ITZ	-	-	-	-	-	5	31	11
TRB	1	25	19	2	-	-	-	-

CIM= Concentração inibitória mínima; AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina

Tabela 2: Perfil de susceptibilidade antifúngica de 47 isolados felinos de *S. brasiliensis*. Valores de MG, CIM50% e CIM90% para os fármacos testados.

Médias	Fármacos testados			
	Anfotericina B	Cetoconazol	Itraconazol	Terbinafina
MG	1,24	0,6	1,09	0,04
CIM 50	1	0,5	1	0,03
CIM 90	2	1	2	0,06

MG= média geométrica; CIM= concentração inibitória mínima

A terbinafina foi o antifúngico com os menores valores de CIM obtidos (Figura 4), com uma variação de 0,015-0,12 μ g/mL e valores de CIM50% e CIM90% de 0,03 μ g/mL e 0,06 μ g/mL, respectivamente, demonstrando uma alta atividade *in vitro* frente aos isolados testados.

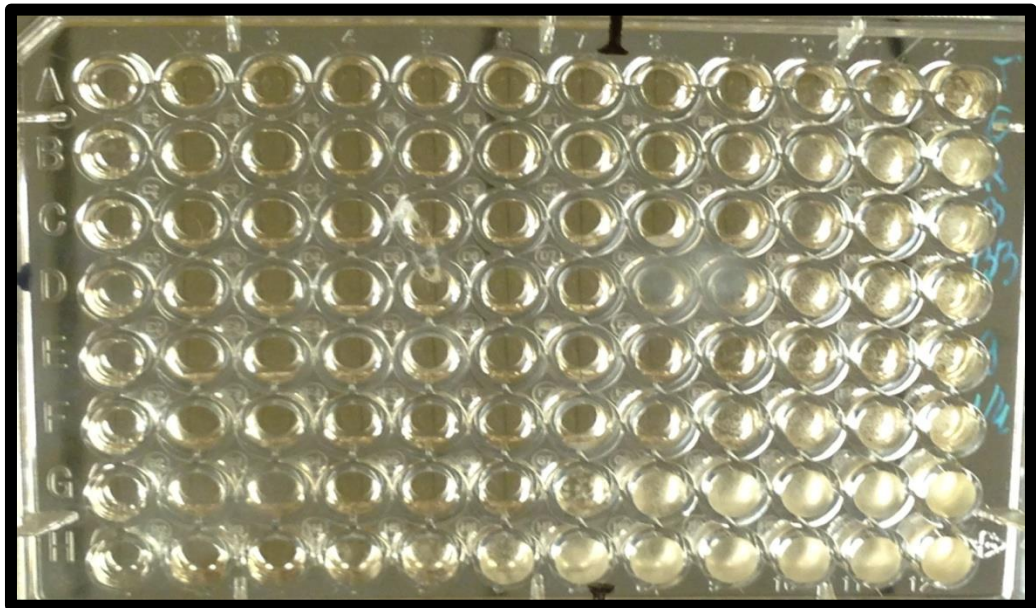


Figura 4: Teste de susceptibilidade para terbinafina de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= Controle de esterilidade; Coluna 12= Controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controle de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

Entre os azólicos, cetoconazol apresentou valores de CIM que variaram de 0,12 μ g/mL à 2 μ g/mL (Figura 5), e o itraconazol CIM variando de 0,50 μ g/mL à 2 μ g/mL (Figura 6). Ao compararmos a CIM50% e a CIM90%, o cetoconazol apresentou valores de 0,5 μ g/mL e 1 μ g/mL, enquanto que o itraconazol 1 μ g/mL e 2 μ g/mL, respectivamente.

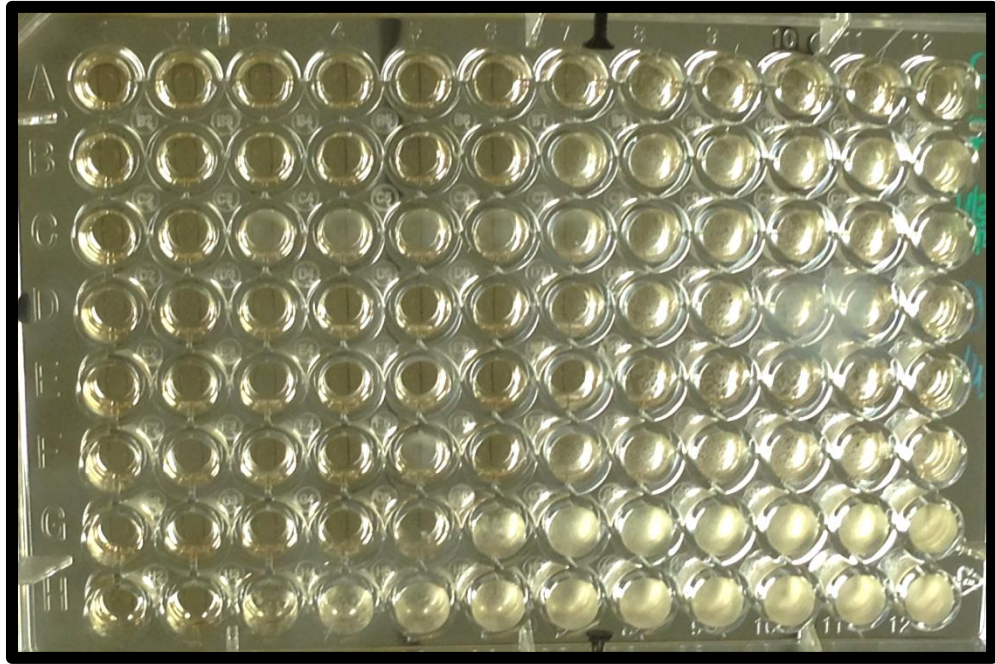


Figura 5: Teste de susceptibilidade para o cetoconazol de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= Controle de esterilidade; Coluna 12= Controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controle de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

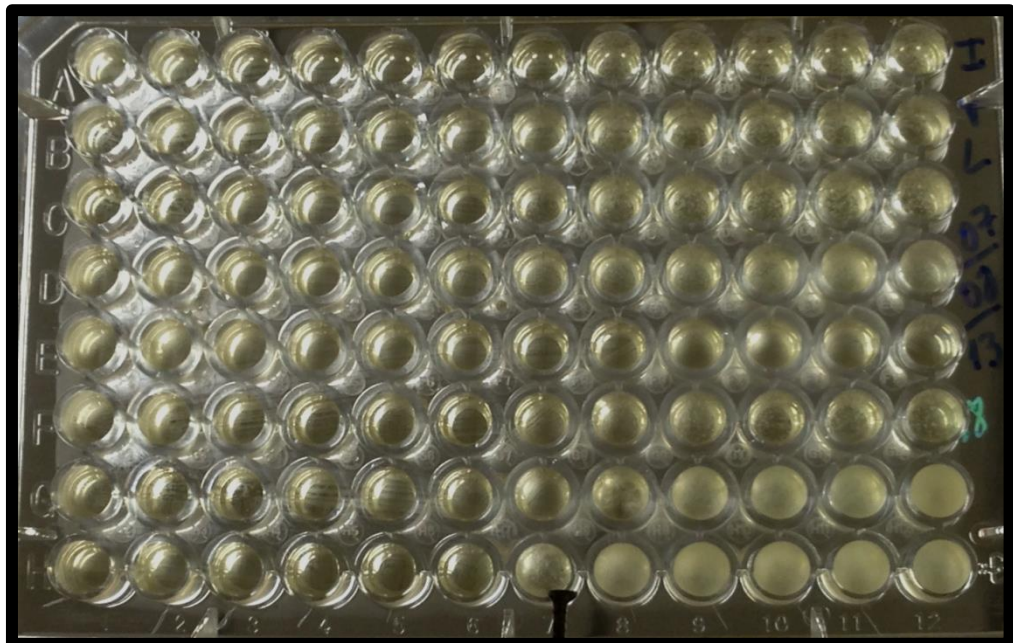


Figura 6: Teste de susceptibilidade para o itraconazol de seis isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= Controle de esterilidade; Coluna 12= Controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controle de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

A anfotericina B apresentou a CIM variando de 0,25–2 μ g/mL (Figura 7). No entanto este fármaco foi o que obteve maior MG (1,24 μ g/mL).

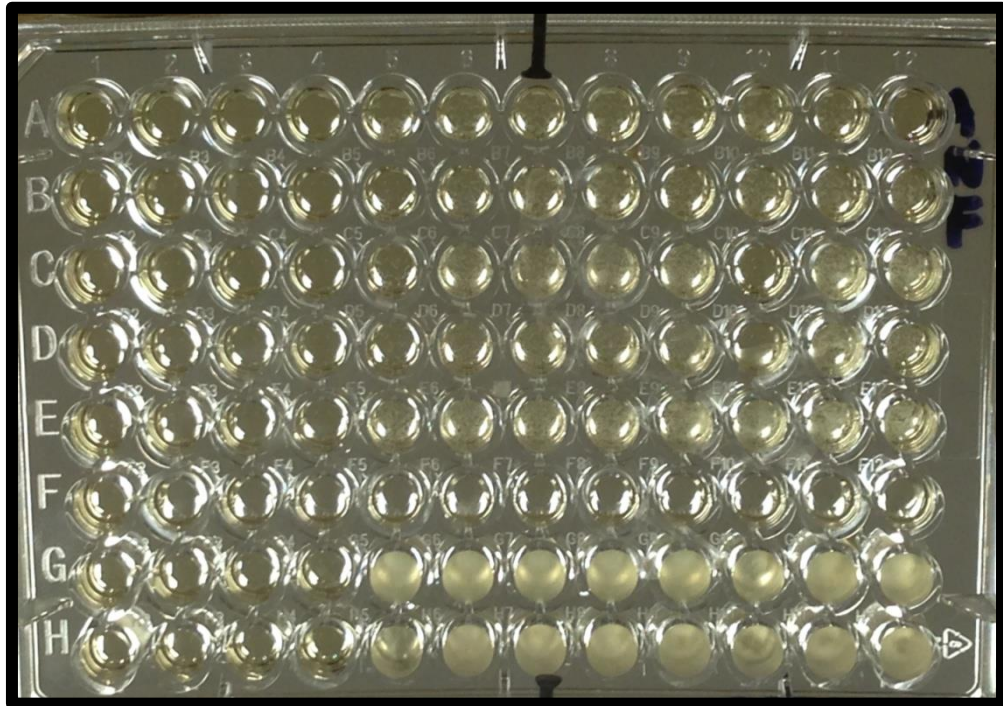


Figura 7: Teste de susceptibilidade para a anfotericina B de cinco isolados clínicos de *S. brasiliensis*. Coluna 1= Controle de esterilidade; Coluna 12= Controle de crescimento; Linhas G e H= cepas controle de *A. flavus* e *A. fumigatus*, respectivamente.

6.3 Correlações com o desfecho clínico

A comparação entre os valores da CIM para itraconazol e cetoconazol *in vitro* e o tratamento antifúngico realizado nos animais dos quais os isolados de *S. brasiliensis* foram provenientes não apresentou diferença estatisticamente significativa (Tabela 3). Assim como a comparação das CIM segundo o desfecho do tratamento (Tabela 4).

Tabela 3: Comparação entre os valores da CIM para o cetoconazol e o itraconazol segundo o antifúngico utilizado no tratamento dos gatos com esporotricose.

Fármaco testado	Fármaco utilizado	
	Itraconazol Mediana(Min-Max)	Cetoconazol Mediana(Min-Max)
Cetoconazol	1,00 (0,12-1,00)	0,50 (0,25-2,00)
Itraconazol	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)

Min=Minimo, Max=Maximo.

Tabela 4: Comparação entre os valores da CIM segundo o desfecho do tratamento antifúngico dos gatos com esporotricose.

Fármaco testado	Desfecho			p-valor (p<0,05)
	Favorável (n=18) Mediana(Min-Max)	Desfavorável (n=16) Mediana(Min-Max)	Outros (n=14) Mediana(Min-Max)	
CTZ	0,50 (0,12-1,00)	1,00 (0,25-2,00)	1,00 (0,25-1,00)	0,510
ITZ	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	0,262

AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina; Min= mínimo; Max= máximo.p-valor= p-valor no teste de Kruskal-Wallis.

No Quadro 2 e 3 podemos observar as CIM para o cetoconazol e itraconazol, respectivamente, dos isolados de *S. brasiliensis* obtidos dos gatos tratados com os mesmos, e seus respectivos desfechos do tratamento (não agrupados).

Quadro 2: CIM dos isolados de *S. brasiliensis* no teste de susceptibilidade para o cetoconazol de acordo com o desfecho do tratamento dos gatos com o mesmo.

Isolado	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Desfecho
8881	0,50	Abandono
9115	0,50	Abandono
9050	1,00	Abandono
9090	1,00	Abandono
8584	0,50	Cura
8986	0,50	Cura
8607	0,50	Cura
8612	0,50	Cura
8775	1,00	Cura
8887	1,00	Cura
9099	0,50	Eutanásia
9409	1,00	Eutanásia
8695	0,50	Falência Terapêutica
8726	0,50	Falência Terapêutica
8723	1,00	Falência Terapêutica
8729	2,00	Falência Terapêutica
8488	0,25	Óbito
8678	0,50	Óbito
8491	0,50	Óbito Esporotricose
8718	0,50	Óbito Esporotricose
8902	1,00	Óbito Esporotricose
9042	1,00	Óbito Esporotricose

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Quadro 3: CIM dos isolados de *S. brasiliensis* no teste de susceptibilidade para o itraconazol de acordo com o desfecho do tratamento dos gatos com o mesmo.

Isolado	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Desfecho
8509	1,00	Abandono
8756	1,00	Abandono
8862	1,00	Abandono
8854	1,00	Abandono
9032	1,00	Abandono
9236	2,00	Abandono
8440	0,50	Cura
8547	0,50	Cura
8648	1,00	Cura
8688	1,00	Cura
8664	1,00	Cura
8761	1,00	Cura
8904	1,00	Cura
9362	1,00	Cura
9203	1,00	Cura
9056	2,00	Cura
9260	2,00	Cura
8639	1,00	Óbito Esporotricose
9020	2,00	Óbito Esporotricose
8671	1,00	Falência Terapêutica
8912	1,00	Falência Terapêutica
8908	1,00	Falência Terapêutica
9345	1,00	Falência Terapêutica
9062	2,00	Falência Terapêutica
9101	2,00	Falência Terapêutica

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Correlacionando a presença de linfadenopatia (Tabela 5), o estado geral (Tabela 6), distribuição das lesões cutâneas (Tabela 7) e a presença de sinais respiratórios (Tabela 8), com os valores encontrados das CIM também não observamos diferenças significativas.

Tabela 5: Comparação entre os valores da CIM para cada fármaco testado segundo a presença ou ausência de linfadenopatia nos gatos.

Fármaco testado	Linfadenopatia		p-valor (p<0,05)
	Presença Mediana(Min-Max)	Ausência Mediana(Min-Max)	
AnfB	1,00 (0,25-2,00)	2,00 (0,50-2,00)	0,319
CTZ	0,75 (0,12-2,00)	1,00 (0,50-1,00)	0,675
ITZ	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	0,776
TRB	0,03 (0,01-0,12)	0,03 (0,03-0,06)	0,854

AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina; Min= mínimo; Max= máximo. p-valor= p-valor no teste de Mann-Whitney.

Tabela 6: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo o estado clínico geral dos gatos com esporotricose.

Fármaco testado	Estado Geral		p-valor (p<0,05)
	Bom Mediana(Min-Max)	Regular Mediana(Min-Max)	
AnfB	1,00 (0,25-2,00)	2,00 (1,00-2,00)	0,491
CTZ	0,75 (0,12-1,00)	1,00 (0,50-2,00)	0,409
ITZ	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (1,00-2,00)	0,372
TRB	0,03 (0,01-0,12)	0,06 (0,03-0,06)	0,603

AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina; Min= mínimo; Max= máximo. p-valor= p-valor no teste de Mann-Whitney.

Tabela 7: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo a distribuição das lesões cutâneas dos gatos com esporotricose.

Fármaco testado	Distribuição das Lesões Cutâneas			p-valor (p<0,05)
	L1 Mediana(Min-Max)	L2 Mediana(Min-Max)	L3 Mediana(Min-Max)	
AnfB	1,00 (0,25-2,00)	1,00 (0,25-2,00)	2,00 (0,50-2,00)	0,281
CTZ	1,00 (0,25-1,00)	0,50 (0,25-2,00)	1,00 (0,12-1,00)	0,956
ITZ	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	0,500
TRB	0,06 (0,03-0,12)	0,04 (0,03-0,06)	0,03 (0,01-0,06)	0,248

AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina; Min=Minimo; Max=Maximo; L1= lesões em apenas um local; L2= Lesões em dois locais não contíguos; L3= Lesões em 3 ou mais locais não contíguos.p-valor= p-valor no teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 8: Comparação entre os valores da CIM para cada antifúngico testado segundo a ausência ou presença de sinais respiratórios em gatos com esporotricose.

Fármaco testado	Sinais Respiratórios		p-valor (p<0,05)
	Presentes Mediana(Min-Max)	Ausentes Mediana(Min-Max)	
AnfB	1,00 (0,25-2,00)	1,00 (0,25-2,00)	0,483
CTZ	0,50 (0,12-2,00)	1,00 (0,25-1,00)	0,225
ITZ	1,00 (0,50-2,00)	1,00 (0,50-2,00)	0,817
TRB	0,06 (0,01-0,12)	0,03 (0,03-0,12)	0,388

AnfB= anfotericina B; CTZ= cetoconazol; ITZ= itraconazol; TRB= terbinafina; Min= mínimo; Max= máximo. p-valor= p-valor no teste de Mann-Whitney.

7. DISCUSSÃO

Apesar de descrita em vários países, a esporotricose no Brasil tem como característica principal a ocorrência da transmissão zoonótica, na qual o gato infectado atua como a principal fonte de infecção de *Sporothrix* spp. (Barros et al., 2011), principalmente por apresentar alta carga fúngica em suas lesões cutâneas (Miranda et al., 2013; Pereira et al., 2014). Nas duas últimas décadas, a esporotricose felina tem sido descrita no Brasil nos estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e principalmente no Rio de Janeiro, o qual possui a maior casuística mundial dessa micose (Madrid et al., 2012; Montenegro et al., 2014; Pereira et al., 2014; Gremião et al., 2015).

O perfil epidemiológico da população felina com esporotricose proveniente da região epidêmica do Rio de Janeiro acometendo principalmente machos, sem raça definida, não castrados e com idade mediana de 24 meses, foi descrito por Pereira e colaboradores (2014). Nosso estudo apresentou perfil similar, ocorrendo principalmente em machos adultos em idade reprodutiva, o que pode ser explicado pelo estudo ter sido realizado no mesmo cenário epidemiológico.

Outra característica epidemiológica observada neste estudo foi que a maioria dos isolados de *S. brasiliensis* foram provenientes de gatos que tinham acesso à rua e o hábito de brigar com outros gatos. Tais características são frequentes entre os gatos acometidos pela doença, pois os machos não castrados e com livre acesso à rua possuem o hábito de se envolver em brigas com outros gatos por domínio de território ou por fêmea para reprodução, contribuindo na transmissão do agente para outros animais (Schubach et al., 2004a).

Avaliando as apresentações clínicas da esporotricose felina, a maioria dos gatos dos quais os isolados de *S. brasiliensis* foram obtidos apresentavam bom estado geral e lesões cutâneas, principalmente úlceras. Esses achados já foram descritos em outros estudos com gatos da mesma região epidêmica do Rio de Janeiro (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2010).

Em relação à distribuição das lesões cutâneas encontradas nos animais, no presente estudo, nos grupos L1, L2 e L3 foi similar. Em estudos anteriores realizados na mesma região

e que utilizaram a mesma classificação observou-se a predominância de gatos no grupo L3 (Pereira et al., 2010; Pereira et al., 2014), entretanto, tais estudos incluíram um número amostral superior, o que pode explicar parcialmente esta diferença.

No presente estudo, a linfadenopatia foi o sinal extracutâneo mais frequente, seguido dos sinais respiratórios, conforme observado por outros autores (Pereira et al., 2010; Schubach et al., 2012; Gremião et al., 2015).

O controle da epidemia de esporotricose zoonótica que ocorre na região metropolitana do Rio de Janeiro, é consenso a necessidade de um tratamento antifúngico efetivo dos gatos doentes (Barros et al., 2010), o que poderia levar a uma diminuição do número de pessoas e animais infectados. No entanto o tratamento nos gatos, diferente dos casos humanos, representa um desafio, pois além das limitações nas opções terapêuticas e os efeitos adversos dos fármacos utilizados (Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2010; Gremião et al., 2011; Gremião et al., 2015), o tempo de tratamento nos gatos é maior que nos seres humanos e a administração dos fármacos por via oral é difícil (Schubach et al., 2004a; Pereira et al., 2009).

Fatores como as limitações na efetividade do tratamento, toxicidade aos fármacos antifúngicos, resistência clínica à terapia em uso e falhas no tratamento, fazem com que os estudos de susceptibilidade antifúngica sejam importantes. A partir do conhecimento do perfil de sensibilidade de cepas clínicas e do espectro de ação dos antifúngicos, é possível eleger uma alternativa terapêutica que seja mais efetiva e a detecção de cepas resistentes (Schreiber, 2007). Além disso, a falência terapêutica das infecções fúngicas pode estar relacionada à resistência clínica ou microbiológica, e a determinação da correlação entre ambas as resistências ainda é limitada, o que aumenta a importância de estudos para conhecer o perfil de susceptibilidade de isolados clínicos (Cury et al., 2006), principalmente oriundos de felinos.

A correlação entre as CIM dos azólicos, o cetoconazol demonstrou melhor atividade *in vitro*, com uma MG de 0,6µg/mL. Tal resultado já foi observado por Oliveira e colaboradores (2011) em isolados de felinos e caninos, onde este fármaco apresentou uma boa atividade *in vitro* quando comparado ao itraconazol, sendo estes isolados menos sensíveis aos azólicos quando comparados aos isolados humanos. Stopiglia e colaboradores (2014) apresentaram resultados similares nos testes de susceptibilidade com anfotericina B, cetoconazol, itraconazol e terbinafina, onde o cetoconazol foi o segundo antifúngico com melhor atividade *in vitro* frente a isolados humanos de *S. brasiliensis*, após a terbinafina.

Apesar dos bons resultados do cetoconazol *in vitro*, poucos são os estudos que relatam o sucesso no tratamento com este fármaco na esporotricose felina (Burke et al., 1982; Schubach et al., 2004a). Pereira e colaboradores (2010), utilizando cetoconazol na dose de 50 ou 100 mg/gato/dia observaram a cura clínica em 28,6% dos gatos tratados, além de uma alta frequência de efeitos adversos gastrointestinais.

Apesar de não haver ponto de corte definido para o itraconazol, autores observaram resistência frente a isolados felinos de *Sporothrix* spp. para este fármaco (Kohler et al., 2004; Meinerz et al., 2007; Oliveira et al., 2011; Borba-Santos et al., 2015). No nosso estudo os valores de CIM para o itraconazol não ultrapassaram 2µg/mL, indicando uma moderada atividade desse fármaco frente aos isolados felinos de *S. brasiliensis*. No entanto, Gutierrez-Galhardo e colaboradores (2008), ao compararem as CIM dos isolados humanos do Rio de Janeiro coletados durante a epidemia, entre 1999 e 2004, com isolados controles oriundos do Rio de Janeiro (coletados antes da epidemia) de São Paulo e da Espanha, observaram que os valores de CIM para o itraconazol dos isolados obtidos durante a epidemia foram menores. Além disso, outros autores observaram que os valores de CIM para o itraconazol foram menores para isolados humanos de *S. brasiliensis* quando comparado a outras espécies que fazem parte do complexo *Sporothrix* (Rodrigues et al., 2014). Considerando *S. brasiliensis* o agente predominante na epidemia de esporotricose que ocorre no Rio de Janeiro (Oliveira et al., 2011; Rodrigues et al., 2013b), e que no presente estudo todos os isolados clínicos felinos eram *S. brasiliensis*, o fato de não observarmos uma possível resistência é amparada nestes estudos. Sua moderada atividade *in vitro* pode ser constatada nos estudos terapêuticos *in vivo*, onde o tratamento de gatos com esporotricose utilizando esse fármaco obtiveram êxito (Schubach et al., 2004a; Madrid et al., 2009; Pereira et al., 2010).

Os valores de CIM encontrados para anfotericina B não ultrapassaram 2µg/mL, diferente dos achados de Rodrigues e colaboradores (2014) com isolados humanos de *S. brasiliensis*, onde foram descritos valores de CIM de até 8µg/mL. No entanto, ao comparar isolados da região epidêmica do Rio de Janeiro coletados entre 2011 e 2012 com isolados coletados antes de 2004, nas duas fases de crescimento do fungo, Borba-Santos e colaboradores (2015), observaram que a anfotericina B foi mais ativa para os isolados mais recentes na forma filamentosa do que para os isolados antigos, obtendo uma MG de 1,2µg/mL, similar a observada em nosso estudo.

Relatos do uso da anfotericina B para o tratamento da esporotricose felina são escassos. No entanto, apesar de apresentar moderada atividade *in vitro*, estudos descreveram

sucesso no tratamento de gatos refratários ao itraconazol utilizando a anfotericina B intralesional associada ao triazólico por via oral (Gremião et al., 2009; Gremião et al., 2011), assim como com sua formulação lipossomal (Gremião et al., 2015).

Entre os fármacos antifúngicos testados, a terbinafina obteve os melhores resultados no teste de susceptibilidade, com baixos valores de CIM, MG, CIM50% e 90%, indicando uma alta atividade *in vitro* contra os isolados felinos. Estudos que utilizaram isolados na fase leveduriforme obtiveram achados semelhantes, com valores indicando intensa atividade *in vitro*, sugerindo a susceptibilidade dos isolados felinos à terbinafina (Kohler et al., 2004; Meinerz et al., 2007). Ao comparar a susceptibilidade de isolados de *S. brasiliensis* à terbinafina em ambas as fases do fungo, autores descreveram que este fármaco foi o mais efetivo entre os antifúngicos testados nas duas fases de crescimento (Borba-Santos et al., 2015).

Apesar de baixos valores de CIM no teste, que denota uma ótima atividade *in vitro* da terbinafina frente aos isolados de *S. brasiliensis*, os resultados quanto a sua utilização no tratamento da esporotricose felina são inconclusivos (Gremião et al., 2015). No entanto na doença felina a forma disseminada é frequente, o que pode estar relacionado à sua baixa efetividade no tratamento (Schubach et al., 2004a). Apesar disso, os valores encontrados em nosso estudo sugerem a necessidade da realização de estudos terapêuticos com esse fármaco para verificação da correspondência dos resultados *in vitro e in vivo* nos casos de esporotricose felina. Fato esse já observado na esporotricose humana, onde a terbinafina é utilizada nos casos cutâneos e linfocutâneos (Kaufman et al., 2007), demonstrando excelentes resultados no tratamento (Francesconi et al., 2011).

Apesar de estudos sobre o perfil de susceptibilidade antifúngica para isolados de *Sporothrix* spp. (Kohler et al., 2004; Meinerz et al., 2007; Marimon et al., 2008b; Silveira et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Zhang et al., 2011; Rodrigues et al., 2014; Stopiglia et al., 2014; Borba-Santos et al., 2015), poucos estudos utilizaram isolados clínicos de gatos oriundos da epidemia do Rio de Janeiro, e nenhum deles correlacionou os resultados do teste de susceptibilidade antifúngica com as características clínicas dos mesmos.

Com o número amostral utilizado não foi possível estabelecer uma correlação entre os resultados do teste *in vitro* com o desfecho do tratamento antifúngico. Outra limitação é a ausência de um ponto de corte para *Sporothrix* spp. dificultando a classificação quanto à resistência ou sensibilidade dos isolados aos antifúngicos testados. No entanto, sabe-se que, embora a resistência *in vitro* frequentemente esteja relacionada à falha clínica, a sensibilidade

in vitro nem sempre pode ser associada a um sucesso na terapia (Schreiber, 2007), e nos casos de esporotricose felina, outros fatores podem estar relacionados à falha no tratamento. Sendo a irregularidade no tratamento um deles, pois devido às dificuldades encontradas, muitos gatos têm o tratamento interrompido pelos seus responsáveis antes da cura clínica. Além disso, acredita-se que a absorção do itraconazol e fatores relacionados à resposta imunológica do gato, poderiam ter alguma influência na resposta terapêutica, independentemente de uma moderada resposta *in vitro* no teste.

Ao compararmos os valores da CIM para cetoconazol e itraconazol, os quais foram os fármacos utilizados no tratamento dos gatos com esporotricose do estudo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, indicando que antes do tratamento realizado com tais antifúngicos, estes isolados não apresentavam diferenças no perfil de susceptibilidade antifúngica, já que estes isolados foram coletados antes do início do tratamento.

Na análise dos desfechos do tratamento antifúngico dos gatos, em relação às CIM obtidas para cetoconazol e itraconazol, não foi observada diferença significativa, sugerindo não haver correlação entre os achados *in vitro* e *in vivo*. Esse resultado pode estar relacionado ao número de isolados estudados, e destes terem sido coletados em um único momento, antes do início da terapia, não nos possibilitando ter conhecimento se esse perfil se modificou ao longo do tratamento.

Quando realizamos a correlação das características clínicas dos gatos analisadas, também não foi observada diferença significativa dos valores de CIM encontradas para os quatro antifúngicos testados. Considerando os diferentes sinais clínicos avaliados, os valores encontrados no teste não demonstraram haver correlação quanto à susceptibilidade dos isolados de *S. brasiliensis*. Nossos achados corroboram com um estudo de Gutierrez-Galhardo e colaboradores (2208), uma vez que a ausência da correlação entre as características clínicas dos pacientes e o desfecho do tratamento antifúngico com os valores obtidos no teste de susceptibilidade foi descrito anteriormente com isolados humanos provenientes da região epidêmica do Rio de Janeiro também foi observado. Porém mais estudos são necessários utilizando um número maior de isolados oriundos de gatos de diferentes regiões geográficas.

Por se tratar do primeiro estudo que associou os resultados do teste de susceptibilidade antifúngica com as características clínicas e o desfecho do tratamento dos gatos oriundos do Rio de Janeiro, ressaltamos a importância da realização de novos estudos utilizando um maior número de isolados felinos, além da avaliação do perfil de susceptibilidade antifúngica de

outros fármacos que poderão representar novas opções terapêuticas no tratamento da esporotricose felina.

8. CONCLUSÃO

1. Terbinafina foi o antifúngico com os menores valores de CIM, ressaltando a importância da realização de estudos terapêuticos para sua avaliação *in vivo*;
2. Cetoconazol e itraconazol apresentaram moderada atividade *in vitro* frente a isolados felinos de *S. brasiliensis* provenientes da região epidêmica do Rio de Janeiro, no entanto cetoconazol apresentou uma MG menor;
3. Apesar dos testes *in vitro* apresentarem valores de CIM do cetoconazol e do itraconazol semelhantes, o cetoconazol foi menos efetivo *in vivo*;
4. Anfotericina B apresentou valores de CIM de moderada atividade, mas com a maior MG entre os antifúngicos testados;
5. A correlação entre os resultados dos testes de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *S. brasiliensis*, as características clínicas dos gatos, e o desfecho do tratamento antifúngico não foram observadas, sugerindo que outros fatores relacionados ao hospedeiro possuem um papel importante na esporotricose felina.

9. REFERÊNCIAS

- Alvarado-Ramírez E, Torres-Rodríguez JM. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob. Agent. And Chemother.* 2007; 51(7):2420-2423.
- Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Mayayo E, Marimon R, Mariné M, Gené J, et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:651-55.
- Balfour JA, Faulds D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. *Drugs.* 1992;43(5):259-284.
- Baroni FA, Campos SG, Direito GM. A cat sporotrichosis case. *Rev Bras Med Vet.* 1998;20(1):25-27.
- Barros MB, Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):633-654.
- 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):529-35.
- 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. *Epidemiol Infect.* 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):455-60.
- Barros MBL, Schubach TMP, Gutierrez-Galhardo MC, Schubach AO, Monteiro PCF, Reis RS, et al. Sporotrichosis: na emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001; 96:777-779.
- Boechat JS. Caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de *Sporothrix* spp. provenientes de gatos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. Tese [Mestrado] - Instituto Oswaldo Cruz, Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas; 2015.
- Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, Fernandes GF, Castro R, Camargo ZP, et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med. Micol.* 2015; 53(2):178-188.
- Borges TS, Rossi CN, Fedullo JDL, Taborda JP, Larsson CE. Isolation of *Sporothrix schenckii* From the Claws of Domestic Cats (Indoor and Outdoor) and in Captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathologia.* 2013;176:129-137.

Burke M, Grauer G, Macy D. Successful treatment of cutaneolymphatic sporotrichosis in cat with ketoconazole and sodium iodine. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1982; 19:542-547.

Catalán M, Montejo JC. Systemic antifungals. Pharmacodynamics and pharmacokinetics. *Rev Iberoam Micol*. 2006;23(1):39-49.

Chaves AR, Campos MP, Barros MBL, Carmo CN, Gremião IDF, Pereira AS, et al. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis - Study of 147 Cases. *Zoon Pub Health*. 2013;60(2):149-153.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. CLSI document M-28 A. 2nd ed. Wayne; 2008.

Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals, Sao 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 Dermat* 2009; 20(4):249-259.

Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: Importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter* 2010;23(4):169-176.

Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. [Should antifungal treatments be based upon results of antifungal susceptibility testing. *Rev Iberoam Micol*. 2002; 19(3):133-138.

Cury AE, Paula CR, Melhem MSC, Silva MMR, Giannini MJSM. Minuta de consenso sobre testes de suscetibilidade a antifungos. In; 2006: Sociedade Brasileira de Microbiologia; 2006.

Dias NM, Oliveira MM, Santos C, Zancoppe-Oliveira RM, Lima N. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17(10):1975-1976.

Diogo HC, Melhem M, Sarpierre A, Pires MC. Evaluation of the disk-diffusion method to determine the in vitro efficacy of terbinafine against subcutaneous and superficial mycoses agents. *An Bras Dermatol*. 2010; 85(3): 324-30.

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

Francesconi G, Francesconi do valle AC, Passos SL, Lima Barros MB, Almeida Paes R, Curi AL, et al. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2011; 171(5):349-354.

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

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

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

Freitas DF, Valle AC, Paes RA, Bastos FI, Galhardo MC. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. Clin Infect Dis. 2010;50(3):453.

Filippin FB, Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. Rev Bras Ciênc farm. 2006;42(2):167-194.

Greene CE. Antifungal chemotherapy. In: Greene (Eds). Infectious Diseases of the Dog and Cat. 4th ed: Saunders Elsevier. 2012:579-588.

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

Gremião I.D.F., Pereira S.A., Rodrigues A.M., Figueiredo F.B, Nascimento Jr. A., Santos I.B.& Schubach T.M.P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. Act Scient Vet. 2006;34:221-223.

Gremiao ID, Schubach TM, Pereira SA, Rodrigues AM, Chaves AR, Barros MB. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. J Fel Med Surg. 2009;11(8):720-3.

Gremiao I, 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):346-51.

Gutierrez-Galhardo MC, Oliveira RMZ, Valle ACF, Almeida Paes R, Silvatavares PM, Monzon A, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. Med. Mycol. 2008; 46: 141-151.

Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Antifungal susceptibility profile in vitro of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. Mycoses. 2010;53(3):227-31.

Hektoen L, Peerkins CF. Refractory sub-cutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. J Exp Med. 1900;5:77-90

Helm M, Berman C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of sporotrichosis infection of the mines. In: Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand; 1947; Johannesburg: The Transvaal Chamber of Mines; 1947. p. 59-74.

Honse CD, Rodrigues AM, Gremião IDF, Pereira AS, Schubach TMP. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. Vet Records. 2010;166(7):208-209.

- Iachini R. Sporotrichosis in a domestic cat. *Rev Argent Microbiol.* 2009;41(1):27.
- 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):1255-65.
- Koga T., Matsuda T., Matsumoto T. & Furue M. Therapeutic approaches to subcutaneous mycoses. *Am. J. Clin. Dermat.* 2003;4:537-543
- Kohler LM, Monteiro PC, Hahn RC, Hamdan JS. In vitro susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. *J Clin Microbiol.* 2004;42(9):4319-20.
- Kwon-Chung K, Bennet J. Sporotrichosis. In: Kwon-Chung K, Bennet J, editors. *Medical Mycology*. 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1992. p. 707-729.
- Lacerda Filho AM, Bandeira V, Sidrim JJC. Micose subcutânea. In: Sidrim JJC, Moreira JLB, editors. *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 287.
- Larsson CE. Esporotricose. *Braz J Vet Res Anim Scienc.* 2011;48(3):250-259.
- 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.
- 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):210-4.
- Lima LB, Pereira Jr AC. Esporotricose: inquérito epidemiológico. Importância como doença profissional. *An Bras dermatol.* 1981;56:243-248.
- López-Romero E, Reyes-Montes Mdel R, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, et al. *Sporothrix schenckii* complex and Sporotrichosis, an emergency 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.
- 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):218-22.
- Madrid IM, Mattei A, Fernandes CG, Nobre Mde, 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.
- 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):3198-206.

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):3251-6.

Marimon R, Gene J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. Med Mycol. 2008a;46(6):621-5.

Marimon R, Serena C, Gene J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. Antimicrob Agents Chemother. 2008b;52(2):732-4.

Marques SA, Franco SR, de Camargo RM, Dias LD, Haddad Junior V, Fabris VE. Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1993;35(4):327-30.

Meinerz AR, Nascente PS, Schuch LF, Cleff MB, Santin R, Brum CS, et al. Susceptibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a terbinafina e itraconazol. Rev Soc Bras Med Trop. 2007;40:60-62.

Meyer EM, Beer ZW, Summerbell RC, Moharram AW, Hoogs GS, Vismer HF, et al. Taxonomy and phylogeny of new wood-and-soil-inhabiting sporothrix species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. Mycol. 2008;100:647-61.

Miranda LH, Conceição-Silva F, Quintella LP, Kuraiem BP, Pereira SA, Schubach TMP, et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. Comp. Immunol Microbiol Infect Dis. 2013;36:425-432.

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.

Nobre MO, Castro AP, Caetano D, Souza LL, Meireles MCA, Ferreiro L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. Rev Iberoam Micol. 2001;18:137-140.

Oliveira DC, Lopes PGM, 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. 2011.p.3047-3049.

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

Papich MG, Heit MC, Riviera JE. Fármacos antifúngicos e antivirais. In: Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Adams Richard H. edit. 8th ed. Guanabara Koogan ed. 2003; p:767-790.

Peaston A. Journ. Vet. Intern. Med. Sporotrichosis. 1993; 7:44-45.

Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AA, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. 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):220-3.

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 Scien Vet*. 2009;37(4):331-341.

Ramos e silva M, Vasconcellos C, Carneiro S, Cestari T. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol* 2007; 25:181-187

Read SI, Sperling LC. Feline sporotrichosis. Transmission to man. *Arch Dermatol*. 1982;118(6):429-31.

Reis EG, Gremião IDF, Kitada AAB, Rocha RFDB, Castro VSP, Barros MBL, et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. *J fel Med surg*. 2012;14(6):399-404.

Reis RS, et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):777-779.

Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz MM, Tavares PMS, Monteiro PCF, Schubach TMP, 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 (5):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.

Rivitti EA, Aoki V. Deep fungal infections in tropical countries. *Clin. Dermatol*. 1999;17(2):171-190.

Rodrigues AM. Anfotericina B subcutânea associada ao itraconazol no tratamento da esporotricose em gatos domésticos [Mestrado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2009.

Rodrigues AM, Hoog GS, Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med. Mycol.* 2013a; 51:405-12.

Rodrigues AM, Hooq GS, Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;78(4):383-387.

Rodrigues AM, Teixeira MM, Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013b;7(6):e2281

Romeo O, Scordino F, Criseo G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *S. schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia*. 2011;172:179-86.

Sasaki AA, Fernandes GF, Rodrigues AM, Lima FM, Marini MM, Feitosa LS, et al. Chromosomal Polymorphism in the *Sporothrix schenckii* Complex. *PLoS One*. 2014;9(1):e86819.

Schenk BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1898;9:286-90.

Schreiber AZ. Antifungograma: Quando solicitar e Como Interpretar. *Prática Hospitalar*. 2007;49:87-91.

Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(2):129-33.

Schubach T, Menezes RC, Wanke B. Sporotrichosis. In: Greene C, editor. *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2012. p. 645-650.

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):147-9.

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):83-6.

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*. 2003a;152(6):172-5.

Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Pellon IV, Monteiro PCF, Reis RS, et al. Hematogenous spread of *Sporothrix schenckii* in cats with naturally acquired sporotrichosis. *J Small Anim Pract*. 2003b;44(9):395-398.

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 TMP, Schubach AO, Okamoto T, Figueiredo FB, Pereira SA, Leme LRP, et al. *Sporothrix schenckii* isolation from blood clot of naturally infected cats. *Braz J Vet Res Anim Scienc*. 2004b;41(6):404-408.

Silva MB, Costa MM, Torres CC, Galhardo MC, Vall AC, Magalhães MA, et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no rio de janeiro, Brasil. *CAD Saúde Publica*. 2012; 28(10):1867-1880

Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis: etiological considerations and report of additional cases from New York. *New York State Journ of Medic*. 1952;52 (17:1):2147-53.

Silveira CP, Torres-Rodriguez JM, Alvarado_Ramirez E, Murciano-Gonzalo F, Dolande M, Panizo M, Reviakina V. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *Journ. of Med. Microbiol.* 2009; 58:1607-1610.

Song Y, Zhong SX, Yao L, Cai Q, Zhou JF, Liu YY, et al. Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010.

Souza LS, Nascente PS, Nobre MO, Meinerz ARM, Meireles MCA. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Bras. J Microbiol.* 2006;37(3):372-374.

Sterling JB, Heymann WR. Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21st century-Uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43:691-697.

Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrillón MR, Mende SDC, Heidrich D, Valente P, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Med. Mycol.* 2014; 52(1):56-64.

Taboada J. Systemic mycoses. In: Ettinger S, Feldman E, editors. *Textbook of veterinary internal medicine - Diseases of the dog and cat.* 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000. p. 453-476.

Torres-Mendoza BM, Vásquez-Valls E, González-Mendonza A. Efecto del yoduro de potasio sobre la respuesta inmune an la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol.* 1997;14:98-100.

Trilles L, Fernandez-Torres B, Dos Santos Lazera M, Wanke B, de Oliveira Schubach A, de Almeida Paes R, et al. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(9):3952-4.

Warnock DW. Amphotericin B: an introduction. *J Antimicrob chemother.* 1991;28(suppl B):27-38.

Welsh RD. Sporotrichosis. *J Am Vet Med Ass.* 2003;223(8):1123-6.

Zhang X, Huang H, Feng P, Zhang J, Zhong Y, Xue R, et al. *In vitro* activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. *Eur J Dermatol.* 2011;21(4):573-6.