FERNANDA FIDELIS GONSALES

**Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos,
estado de São Paulo**

São Paulo

2018

FERNANDA FIDELIS GONSALES

**Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos,
estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Nilson Roberti Benites

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3635
FMVZ

Gonsales, Fernanda Fidelis
Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos, estado de São Paulo / Fernanda Fidelis Gonsales. – 2018.
100 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Roberti Benites.

1. Esporotricose. 2. *Sporothrix brasiliensis*. 3. Zoonose. 4. Gato. 5. Epidemia. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo da esporotricose em felinos no município de Guarulhos, Estado de São Paulo", protocolada sob o CEUA nº 7029080616, sob a responsabilidade de **Nilson Roberti Benites** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 01/06/2017.

We certify that the proposal "Study of feline sporotrichosis in Guarulhos City, State of São Paulo", utilizing 100 Cats (males and females), protocol number CEUA 7029080616, under the responsibility of **Nilson Roberti Benites** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 06/01/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **08/2018**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Gatos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 25 anos**

N: **100**

Linhagem: **SRD**

Peso: **100 a 12000 g**

Resumo: O presente estudo tem como objetivo determinar a ocorrência e a(s) espécie(s) do agente etiológico associados à esporotricose em gatos domésticos (*Felis catus*), no município de Guarulhos, SP, e avaliar possível resistência das cepas do complexo *Sporothrix schenckii* frente a três fármacos: itraconazol, terbinafina e fluconazol.

Local do experimento: As coletas serão realizadas durante as visitas dos veterinários do CCZ-Guarulhos à residência dos munícipes responsáveis por animais com suspeita de esporotricose. As amostras serão enviadas para processamento ao Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo/SP

São Paulo, 23 de junho de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GONSALES, Fernanda Fidelis

Título: Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos, estado de São Paulo.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos animais, que sempre me fascinaram e despertaram o meu interesse pelo conhecimento científico. Em especial aos meus animais, meus grandes companheiros de jornada, que me fazem um bem enorme com seu amor incondicional.

Agradecimento

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Nilson Roberti Benites pela orientação, confiança e amizade no mestrado e no doutorado. Obrigada por ser essa pessoa incrível e iluminada, que não impõe seu jeito de trabalhar e que nos incentiva a seguir nosso ritmo; sempre muito mais preocupado com a nossa felicidade do que com formalidades. É um imenso privilégio continuar sendo sua orientada.

Ao Prof. Dr. Paulo Eduardo Brandão, por toda a generosidade em discutir por horas as questões técnicas do trabalho (além de deixar as portas do LABMAS abertas).

Ao Vince, meu companheiro, meu amigo e meu amor. Por compreender a jornada acadêmica, por me apoiar, por estar junto em bons e maus momentos, por me incentivar sempre a seguir em frente, por não pedir nada em troca, por me deixar livre, por me aceitar como sou, aceitar minha yorkada e cuidar tão bem de todos nós.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2016/16.023-8) e do auxílio à pesquisa (Proc. 2016/11.583-5).

Aos amigos do lab: Evê Zuniga, Biga e Priscilla Anne Melville pela paciência, apoio e pelas muitas risadas; sem vocês seria difícil concluir esse trabalho. A Amanda Moreto, que trouxe a ideia inicial do projeto e participou de todas as coletas no CCZ de Guarulhos, obrigada!

Às queridas: Juliana Guerra e Natália Fernandes (Ju e Mungs), minhas amigas desde o início da graduação em medicina veterinária pela FMVZ USP em 2004. É um grande privilégio de poder desenvolver um projeto junto com essas patologistas/pesquisadoras incríveis do Instituto Adolf Lutz. Obrigada pela amizade, discussões de artigo e projetos, por serem fenomenais e fazerem a diferença no serviço público, principalmente no momento atual para diagnóstico de leishmania e febre amarela. Admiro demais vocês e espero poder continuar trabalhando junto. Aprendo muito com vocês sempre.

À Juliana Takahashi, que me fez questionar muitíssimo sobre cultura fúngica e sensibilidade aos fármacos e sobre as diferenças dos resultados entre os métodos empregados neste estudo.

Aos colaboradores do Lutz: Leo e Silvana, que possibilitaram a viabilidade do projeto.

Ao Wilson Mansho, Betão e Celeste e demais funcionários do CCZ de Guarulhos, que tanto me auxiliaram. Foi um enorme prazer trabalhar com vocês e novamente constatar que há pessoas que são funcionários públicos e fazem muito mais do que a função exige. Vocês fazem a diferença na vida de muitas pessoas e deveriam receber um real reconhecimento. Parabéns pelo trabalho.

Ao prof. Anderson Rodrigues da Unifesp, por ser tão solícito e incentivar a pesquisa científica. É um grande prazer discutir com uma pessoa tão engajada como o Anderson, que ainda acredita que é possível fazer pesquisa no Brasil e se esforça muito para que isso aconteça. Muitíssimo obrigada por tirar minhas dúvidas sobre PCR e o fornecimento de cepas controle e primers.

Ao Dr. Hildebrando Montenegro, que generosamente abriu o laboratório de micologia do CCZ SP pacientemente me mostrando seu modo processar as amostras recebidas por todo o estado de São Paulo. Muito obrigada. Realmente despertou meu interesse em trabalhar mais com as culturas e não só com biomol.

Ao Prof. Dr. José Angelo Lindoso, que no Emílio Ribas que curou a minha infecção por esporotricose. Acidentes em coletas acontecem e eu realmente fiquei assustada com a evolução do quadro. Obrigada!

Aos funcionários do VPS da FMVZ USP, em especial ao Danival, que colaboraram muito para que este trabalho fosse realizado.

Ao prof. Michael R. Lappin, Valeria Scorza, Helena Contreras e Jennifer Hawley, pelo período incrível que passei na Colorado State University. Realmente, é sensacional trabalhar em

um laboratório com tantos recursos disponíveis em comparação ao Brasil. Obrigada por toda generosidade e amizade. Continuaremos a trabalhar juntos.

A todos que me ajudaram nessa trajetória. Não é fácil, mas é minha escolha de vida e sou muito grata por toda a gentileza e generosidade que o universo vem me retribuindo ao longo dessa jornada.

Aos animais, que nos ajudam muito mais do que nós conseguimos retribuir.

Aos gatos, razão da pesquisa.

Obrigada.

RESUMO

GONSALES, F. F. **Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos, estado de São Paulo**. [Study of sporotrichosis in domestic cats in the city of Guarulhos, São Paulo]. 2018. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A esporotricose é uma micose zoonótica que no Brasil afeta centros urbanos. O gato tem papel chave na transmissão fúngica desta doença. Nos últimos 3 anos, a cidade de Guarulhos já registrou mais de 1500 casos em gatos e assumiu o status de notificação compulsória.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a epidemiologia das cepas do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii* i em relação aos aspectos fenotípicos, moleculares e de suscetibilidade aos fármacos das amostras isoladas de gatos no município de Guarulhos (São Paulo).

O estudo foi dividido em dois experimentos, sendo o primeiro composto por 119 gatos divididos em três grupos: *Caso*, *Contactante* e *Não-Contactante*. As amostras foram obtidas por meio de suabe nas lesões dos animais do grupo *Caso* e dos demais grupos de suabe oral e submetidas à cultura micológica; em paralelo, amostras foram obtidas para processamento de citologia em meio líquido por embocado celular (CB). As amostras isoladas foram submetidas a PCR para identificação da espécie, bem como aos testes de sensibilidade aos fármacos – microdiluição e E-Test. Durante as colheitas 25 gatos foram submetidos à eutanasia e as amostras de pele e órgãos submetidos à análise histopatológica e imunohistoquímica. O segundo estudo foi composto por 135 gatos divididos em dois grupos: *Sintomático* e *Assintomático*. As amostras obtidas foram processadas para cultura micológica e PCR, só que desta vez, a PCR foi realizada diretamente da lesão e não após o isolamento fúngico.

Neste estudo, foi obtido 92,31% de positividade dentre os gatos suspeitos com esporotricose em cultivo micológico. No projeto, 100% das amostras foram identificadas como *S. brasiliensis*. A técnica proposta de citologia em meio líquido por embocado celular (CB) apresentou 93% de positividade para *Sporothrix* spp, com sensibilidade de 97,50% entre o isolamento fúngico e 94,87% para a imunocitoquímica. Concluindo deste modo, que o CB pode ser uma boa opção para diagnóstico em saúde pública.

A investigação da susceptibilidade dos isolados aos fármacos: terbinafina, a anfotericina

B, o itraconazol, fluconazol e o voriconazol foram de 0,06 – 0,5 µg/ml, 0,002 – 2 µg/mL e 0,023 - > 32 µg/ml, > 256 µg/mL e 1 - 8 µg/mL, respectivamente.

As amostras submetidas à histopatologia e imunohistoquímica demonstraram presença do *Sporothrix* spp em pele, linfonodo mesentérico, baço, fígado, pulmão e coração. Não foi observado elemento fúngico no rim. Não foi estabelecida relação entre intensidade de infiltrado inflamatório e intensidade de *Sporothrix* na pele.

Conclui-se que a PCR realizada de amostra diretamente de lesão pode ser utilizada em áreas cuja frequência da doença é alta, visto que a sensibilidade diagnóstica foi de 90,20%, contudo a especificidade foi de 42,11%. Sendo assim, em áreas de baixa frequência da esporotricose, recomenda-se o emprego do padrão ouro que é a cultura micológica para pesquisa de *Sporothrix* spp e com a realização da PCR para as amostras cuja isolamento for obtido. As variáveis de tipo de lesão e início do tratamento interferem no resultado diagnóstico de PCR direto da lesão.

Palavras-chave: Esporotricose, *Sporothrix brasiliensis*, zoonose, gato, epidemia.

ABSTRACT

GONSALES, F. F. **Sporotrichosis study in domestic cats in the city of Guarulhos, São Paulo.** [Estudo da esporotricose em gatos domésticos no município de Guarulhos, estado de São Paulo]. 2018. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Sporotrichosis is a zoonotic mycosis that affects urban centers in Brazil. The cat plays key role in the fungal transmission of this disease. In the last 3 years, the city of Guarulhos has registered more than 1500 cases in cats and this situation received a status of “compulsory notification”.

The objective of the present work was to analyze the epidemiology from the strains of *Sporothrix schenckii* complex in relation to the phenotypic, molecular and drug susceptibility aspects of isolated samples collected in cats from Guarulhos city (São Paulo).

The study was divided in two experiments: the first one consisting of 119 cats divided into three groups: *Case*, *Contacting* and *Non-Contacting*. Samples were obtained by swab lesions from the cats of *Case* group and from the other oral swab groups and submitted to mycological culture; at the same time, samples were obtained for cytology processing in liquid medium by cell block (CB). The isolated samples were submitted to PCR for species identification, as well the drug sensibility tests - microdilution and E-Test. During the process, 25 cats were euthanized and skin and organ samples were submitted to histopathological and immunohistochemical analysis. The second study was made with 135 cats divided into two groups: *Symptomatic* and *Asymptomatic*. The obtained samples were processed for mycological culture and PCR, but this time PCR was performed directly from the lesion and not after fungal isolation.

This study obtained 92.31% of positivity among the cats with suspected of sporotrichosis in mycological culture. In this project, 100% of the samples were identified as *S. brasiliensis*. The proposed technique of cytology in liquid medium by cell block (CB) presented 93% of positivity for *Sporothrix* spp, with sensitivity of 97.50% between fungal isolation and 94.87% for immunocytochemistry. In conclusion, CB may be a good option for public health diagnosis.

Investigations about the susceptibility of the isolates to the drugs: terbinafine, amphotericin B, itraconazole, fluconazole and voriconazole were 0.06 - 0.5 µg/ml, 0.002 - 2 µg/mL and 0.023 -> 32 µg/mL, > 256 µg/mL and 1-8 µg/mL, respectively.

Samples submitted to histopathology and immunohistochemistry pointed the presence of *Sporothrix* spp on the skin, mesenteric lymph node, spleen, liver, lung and heart. No fungal element was observed in the kidney. There was no relationship between inflammatory infiltrate intensity and *Sporothrix* intensity in the skin.

It is concluded that the PCR performed directly from the lesion can be used in areas with a high disease frequency, since the diagnostic sensitivity was 90.20%, but the specificity was 42.11%. Thus, in areas of low frequency of sporotrichosis, it is recommended to use the gold standard, which is the mycological culture for *Sporothrix* spp research, and to perform the PCR for samples whose isolation is obtained. The variables of lesions type and beginning of the treatment interfere in the diagnostic result of direct PCR of the lesion.

Keywords: Sporotrichosis, *Sporothrix brasiliensis*, zoonosis, cat, outbreak.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Guarulhos/São Paulo. Moradias sem acesso ao saneamento básico, ruas sem pavimentação, muitas construções realizadas sem a aprovação do município em áreas invadidas de mata.	33
Figura 2 - Gato incluso no grupo <i>Caso</i> – gato com suspeita de esporotricose, apresentando lesão ulcerada na região cefálica, na face, região periorbital e em orelha esquerda.	34
Figura 3 - Acompanhamento da visita do médico veterinário e de agentes de saúde do CCZ-Guarulhos à residência de munícipe de Guarulhos, após solicitação e agendamento prévio por telefone.	34
Figura 4a - Ficha de identificação individual dos animais integrantes do projeto. Frente	37
Figura 4b - Ficha de identificação individual dos animais integrantes do projeto. Verso	37
Figura 5 - Coleta de exsudato de lesão ulcerada gato incluso no grupo <i>Caso</i> (amostrado no CCZ-Guarulhos, após o gato ter sido submetido ao procedimento de eutanásia)	38
Figura 6 - Espécie alvo, identificação e sequência do primer e tamanho do amplicon para as espécies do clado clínico patogênico <i>Sporothrix schenckii</i> .	41
Figura 7 - Gatos inclusos no grupo <i>Sintomático</i> . Gatos com suspeita de esporotricose, apresentando lesões ulceradas.	47
Figura 8 - Cultivo fúngico de amostra obtida de lesão de felino suspeito de esporotricose através de suabe em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol.	51
Figura 9 - Inoculação primária de secreção de lesão de gato em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol.	51
Figura 10 - Tubos semeados em agar Sabourad para E-Test e microdiluição.	52
Figura 11 - Microdiluição – voriconazol (Fileira G – cepa padrão ATCC 6258 <i>Candida krusei</i> e fileira H cepa padrão <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019).	53
Figura 12 - Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de <i>Sporothrix</i> spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para itraconazol.	53
Figura 13 - Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de <i>Sporothrix</i> spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para fluconazol.	53
Figura 14 - Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de <i>Sporothrix</i> spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para anfotericina B.	54
Figura 15 - 2 Lâminas coradas com coloração de ácido periódico de Schiff (PAS). As duas primeiras lâminas de amostras obtidas por raspado. A terceira lâmina obtida por PAAF.	56
Figura 16 - Fotomicrografias de citologia por embocado celular de lesão cutânea.	56
Figura 17 - Fotomicrografias de gatos confirmados para esporotricose	61

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de gatos machos e fêmeas e o status reprodutivo dos grupos <i>Caso</i> , <i>Contactante</i> e <i>não Contactante</i> .	50
Gráfico 2 - Positividade para <i>Sporothrix</i> dos órgãos acometidos através da avaliação de histopatológico e imunohistoquímica.	58
Gráfico 3 - Frequências obtidas entre machos e fêmeas dos gatos dos grupos <i>Sintomático</i> e <i>Assintomático</i> .	62
Gráfico 4 - Resultados de positividade e negatividade dos grupos <i>Sintomático</i> e <i>Assintomático</i> para PCR e cultura micológica.	65
Gráfico 5 - Gatos do grupo <i>Sintomático</i> - tipo de lesão e início do tratamento, tipo de lesão e sem tratamento no momento da colheita de acordo com frequência de positividade para PCR e isolamento para <i>S. brasiliensis</i> .	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Frequências obtidas entre machos e fêmeas e o status reprodutivo dos gatos dos grupos <i>Caso</i> , <i>Contactante</i> e <i>não Contactante</i> .	48
Tabela 2 -	Positividade em cultura micológica para <i>Sporothrix</i> spp. dos grupos <i>Caso</i> , <i>Contactante</i> e <i>Não Contactante</i> .	50
Tabela 3 -	Resultados obtidos na sensibilidade aos antifúngicos através de E-Test e microdiluição.	53
Tabela 4 -	Resumo de positividade para <i>Sporothrix</i> dos órgãos acometidos, através da avaliação de histopatológico e imunohistoquímica.	57
Tabela 5 -	Frequências obtidas entre machos e fêmeas dos gatos dos grupos <i>Sintomático</i> e <i>Assintomático</i> .	61
Tabela 6 -	Positividade obtidas dos grupos <i>Sintomático</i> e <i>Assintomático</i> para <i>S. brasiliensis</i> .	63
Tabela 7 -	Frequência de lesões úmidas e secas e a positividade na PCR para <i>Sporothrix brasiliensis</i> .	63
Tabela 8 -	Frequência de lesões úmidas e seca e positividade para <i>S. brasiliensis</i> , para os casos em que o tratamento medicamentoso já tinha sido iniciado no momento da coleta.	64
Tabela 9 -	Resultados de positividade e negatividade dos grupos <i>Sintomático</i> e <i>Assintomático</i> para PCR e cultura micológica.	65
Tabela 10 -	Gatos do grupo <i>Sintomático</i> – tipo de lesão, início ou não do tratamento e frequência de positividade para PCR e cultura micológica.	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Critérios de inclusão e exclusão para animais do grupo <i>Caso</i> .	35
Quadro 2 - Critérios de inclusão e exclusão para animais integrantes do grupo <i>Contactante</i> .	36
Quadro 3 - Critérios de inclusão e exclusão para animais do grupo <i>Não Contactante</i> .	36
Quadro 4 - Quadro discriminativo de positividade para <i>Sporothrix</i> dos órgãos acometidas, através da avaliação de histopatológico (HP) e imunohistoquímica (IHQ).	58
Quadro 5 - Avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório, intensidade da presença de estruturas fúngicas, distribuição da esporotricose e contaminação secundária bacteriana na pele das amostras dos gatos do grupo <i>Casos</i> através de histopatológico e imunohistoquímico.	59

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	tampão soro albumina bovina
CB	citologia em meio líquido por emblocado celular
CCZ	centro de controle de zoonoses
DNA	ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FIV	Imunodeficiência viral felina
h	hora
HP	histopatológico
H&E	hematoxilina e eosina
IHQ	imunohistoquímica
INI	Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas
MIC	concentração mínima inibitória
mL	mililitro
mM	milimolar
ng	nanograma
OMS	organização mundial de saúde
OSH	ovariosalpingohisterectomia
p	valor critico amostral
p.a.	puro analítica
PAAF	punção por agulha fina
PBS	tampão fosfato-salino
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
s	segundos
V	volts
UV	ultravioleta
μL	microlitro
μm	micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

-	negativo
%	porcentagem
+	positivo
=	igual
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral	31
3.2	Objetivo específico	31
4	JUSTIFICATIVA	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33

PRIMEIRO EXPERIMENTO (a)

5.1	(a). Local de estudo	33
5.2	(a). População de estudo	33
5.3	(a). Coleta do material biológico	38
5.4	Cultura fúngica e identificação fenotípica	39
5.5	Determinação da sensibilidade aos fármacos	39
5.5.1	Microdiluição	39
5.5.2	E-Test	40
5.6	(a). Identificação molecular	40
5.6.1	Extração de DNA	40
5.6.2	Reação em cadeia pela polimerase	41
5.6.3	Eletroforese	41
5.7	Citologia em meio líquido por emblocado celular	42
5.7.1	Amostras para emblocado celular	42
5.7.2	Citologia em meio líquido por emblocado celular (CB)	42
5.8	Processamento histopatológico	42
5.8.1	Preparação dos blocos histológicos	42
5.8.2	Apara dos blocos	43
5.8.3	Microtomia	43
5.8.4	Coloração: hematoxilina e eosina	43
5.9	Imunohistoquímica	44

SEGUNDO EXPERIMENTO (b)

5.1 (b). Local de estudo	46
5.2 (b). População de estudo	46
5.3 (b). Coleta do material biológico	47
5.6 (b). Identificação molecular	47
5.10 Análise estatística	48
6 RESULTADOS	48
6.1 Bioética	48

PRIMEIRO EXPERIMENTO (a)

6.2 (a). População de estudo	49
6.3 Cultura fúngica e identificação fenotípica	50
6.4 Determinação da sensibilidade aos fármacos	52
6.5 (a). Identificação molecular	55
6.6 Citologia em meio líquido por emblocado celular (CB)	55
6.7 Análises histopatológica e imunohistoquímica	57

SEGUNDO EXPERIMENTO (b)

6.2 (b). População de estudo	62
6.5 (b). Identificação molecular	63
7 DISCUSSÃO	68
8 CONCLUSÃO	85
9 REFERÊNCIAS	87
10 PUBLICAÇÕES	98
10.1 Publicações em periódicos científicos (2014-2018)	98
10.2 Trabalhos apresentados em congresso internacionais	99
10.3 Revisora de periódico internacional	99
10.4 Orientações	100

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é a micose cutânea mais frequente em áreas urbanas no Brasil. É uma doença de distribuição mundial, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Clinicamente a doença é caracterizada por apresentar lesões com característica pápulo-nodular ou úlcero-gomosa. Em geral, é adquirida pela inoculação traumática do agente na pele, por meio do contato com solos e objetos contaminados ou por arranhadura, mordedura ou contato direto com lesões de gatos infectados. Em humanos, casos graves de esporotricose são raros; no gato doméstico, porém, o quadro clínico é bastante diverso, podendo apresentar formas sistêmicas fatais. Embora haja descrição de outros animais como possíveis transmissores da doença, nenhum deles apresenta um potencial zoonótico importante como o do gato.

Ainda que a ocorrência de esporotricose em animais - principalmente em gatos - e sua transmissão para humanos já tenha sido descrita em alguns países como: Estados Unidos da América, México, Malásia, Argentina e Índia, em nenhum outro lugar a doença assumiu proporções epidêmicas como no Brasil (Barros, 2010). No Estado do Rio de Janeiro, já foram confirmados mais de 4 mil casos em humanos e quase 5000 casos em felinos (Gremião, 2017). Neste estado, o atendimento público veterinário e o fornecimento gratuito do tratamento aos animais doentes eram realizados somente pelo INI/FIOCRUZ, que não consegue atender toda a demanda de casos envolvidos na epidemia. Após 2013, o Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman e o CCZ do município do Rio de Janeiro começaram a distribuição de medicamentos para tratamento em felinos acometidos pela esporotricose. Infelizmente, mesmo com a assistência provida, o abandono ao tratamento é frequente nos casos de esporotricose felina, representando um importante obstáculo no controle da doença (Pereira, 2014).

Desde 2011, o número de casos de esporotricose também cresce na cidade de São Paulo e em dois municípios vizinhos (Diadema e Guarulhos), chegando a quase 200 casos confirmados em 2013 (Montenegro, 2014). Em decorrência do crescente número de casos confirmados de esporotricose em humanos e gatos no Município de Guarulhos, a doença ganhou o status de “notificação compulsória” pela portaria nº. 064/2016, publicado no Diário Oficial do Município em 27 de Julho de 2016. O objetivo desta portaria visa que os serviços de clínicas veterinárias notifiquem o Centro de Controle de Zoonoses o maior número de casos

suspeitos felinos com esporotricose, auxiliando no mapeamento e distribuição da doença bem como no planejamento de medidas de controle. Os casos em seres humanos devem ser comunicados à Vigilância Epidemiológica Municipal.

O atraso no diagnóstico e tratamento dos gatos podem levar a rápida dispersão da doença através dos membros da comunidade. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a epidemiologia das cepas do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii*, em relação aos aspectos fenotípicos, moleculares e de suscetibilidade aos fármacos, isoladas de gatos domésticos no município de Guarulhos (São Paulo).

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esporotricose é uma micose de implantação cutânea e subcutânea, causada pelo fungo *Sporothrix schenckii sensu lato* (Chakrabarti, 2015) é amplamente distribuído na natureza e pode ser encontrado em solos (associado a folhas secas e madeira, por exemplo), água, matéria orgânica em decomposição, dentre outros, sendo mais encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Barros, 2011; Rodrigues, 2013a; Chakrabarti, 2015). Apresenta forma dimórfica variando conforme a temperatura ambiental, encontra-se na forma filamentosa a 25-30 °C e converte para forma leveduriforme em temperatura mais elevadas (35-37 °C) quando os propágulos são traumáticamente introduzidos no hospedeiro (Rodrigues, 2014a).

A primeira descrição da esporotricose, em um paciente humano, foi realizada por Benjamim Schenck em 1898, quando este ainda era estudante de medicina no Hospital Johns Hopkins em Baltimore (Schenck, 1898). Em 1900, Hektoen and Perkins fizeram o segundo relato (em um menino), classificando o agente etiológico como *Sporothrix schenckii*. No Brasil, o primeiro caso foi relatado em 1907, por Lutz e Splendore em ratos naturalmente infectados.

Desde sua primeira descrição em 1898, esta micose vem sendo atribuída a uma única espécie fúngica, *S. schenckii*, e relacionada a atividades ocupacionais, afetando principalmente fazendeiros, jardineiros e trabalhadores agrícolas (Powell, 1978; Itoh, 1986). Pesquisas em filogenética molecular, porém, demonstraram que essa não é a única espécie causadora da esporotricose, a doença é causada por um grupo de espécies genotipicamente variado (Marimon, 2006; 2007; 2008), chamado *Complexo Sporothrix schenckii* (de Beer, 2003; Marimon 2006). Além de espécies patogênicas [*S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu strictu* (*s. str.*), *S. globosa* e *S. luriei*] (Rodrigues, 2013b; Zhou, 2013) espécies ambientais e com baixo potencial de patogenicidade aos mamíferos (*S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis*) também fazem parte do gênero *Sporothrix* (Marimon, 2007; Rodrigues 2015). Há relatos de infecções ocasionadas por *S. mexicana* (Rodrigues, 2013a) e *S. pallida* (Morrison, 2013; Zhou, 2013), contudo são menos frequentes.

A esporotricose, frequentemente, é adquirida pela inoculação traumática do agente na pele (Mackinnon, 1986; Kauffman, 1999) no panículo adiposo, por meio do contato com solos contaminados, penetração de espinhos e lascas de madeira contaminados. O contágio também

pode ocorrer por arranhadura, mordedura ou contato direto com lesões de animais infectados (Rodrigues, 2016). Até surgir a transmissão zoonótica, o contágio se dava pelo contato humano com o fungo, majoritariamente, em atividades agrícolas. Como a transmissão entre pessoas é rara, não basta o ser humano doente para a instalação de uma epidemia e manutenção da doença de forma endêmica. Epidemias recentes, porém, demonstraram o potencial zoonótico da doença, associando o gato doméstico como a principal fonte de infecção (Gremião, 2017).

A rota clássica de transmissão se refere à inoculação do agente através de traumas envolvendo plantas ou solo contaminado. Deste modo, o *Sporothrix* spp cresce no meio ambiente a uma temperatura em torno de 22°C a 27°C e 90% de umidade. O material orgânico do solo pode ajudar o crescimento fúngico. Outros fatores que influenciam nesse processo são um solo rico em celulose, temperatura em torno de 30 ° C, pH entre 3,5 - 9,4 e alta umidade (Noriega, 1993). Esta via está relacionada principalmente às infecções por *S. schenckii* s. str. e *S. globosa* (Rodrigues, 2016). Já a rota alternativa de infecção compreende a transmissão horizontal do fungo (de gato para gato, por exemplo) e a zoonótica (de gatos ou outros animais para humanos) (Rodrigues, 2016).

Parte fundamental para o sucesso do *Sporothrix* durante a infecção de mamíferos é a sua capacidade de mudar de um estilo de vida saprófita micelial (25°C no meio ambiente) para a forma leveduriforme parasítica a uma temperatura elevada (35°C a 37°C), como as desenvolvidas por hospedeiros de sangue quente (Rodrigues, 2016). Dentre a complexidade de fatores que favorecem a disseminação do surto de esporotricose, especialmente por *S. brasiliensis*, Montenegro *et al.* (2014) citam: (a) a alta susceptibilidade do hospedeiro felino e alta virulência do patógeno; (b) hábitos felinos; e (c) a introdução recente de *S. brasiliensis* em uma população urbana suscetível de felinos.

S. brasiliensis é o principal agente de infecção na rota alternativa em áreas endêmicas (Rodrigues, 2016). Infecções causadas por *S. brasiliensis* são importantes por sua intensa patogenicidade em hospedeiros vertebrados. Além disto, a distribuição desta espécie é geograficamente restrita ao Brasil (Rodrigues, 2013b; Rodrigues, 2014a; Córdoba, 2018).

A esporotricose tem sido relatada regularmente na África do Sul, sendo que o primeiro caso humano foi descrito em 1914 (Pijper, 1927). Os sul africanos mais acometidos são os trabalhadores de minas de ouro, sendo relatados casos em Gauteng, Pretória, Botswana, Mpumalanga e North West, bem como no Zimbábue, Nigéria e Sudão (Zhang, 2015). Na década de 1940, mais de 3.000 mineiros na África do Sul foram acometidos pela esporotricose (Dangerfield, 1941; Helm, 1947; Vismer 1997).

Na China, o primeiro relato de caso de esporotricose foi em 1916. Desde então, mais de 4000 casos humanos foram descritos, mas a incidência exata não é clara. Os isolados de *Sporothrix* foram recuperados de estacas de milho, galhos e madeira em decomposição, lodo, solo e casca de árvore (Song, 2011; Song, 2013).

Outro país com casuística de esporotricose é a Índia, com primeiro relato em 1932. A doença nesse país está concentrada ao norte (Verma, 2012). Os estudos de tipagem molecular de isolados indianos revelaram-se homogêneos com outros isolados asiáticos (Mehta, 2007; Ishizaki, 2009). *S. globosa*, é detectada na maior parte dos isolados e *S. luriei* foi relatada em casos esporádicos de esporotricose pulmonar (Padhye, 1992). Um caso de transmissão zoonótica foi relatado e amostras do paciente e seu gato foram positivas para *S. schenckii s. str.* (Yegneswaran, 2009).

Nos Estados Unidos, casos isolados ou pequenos surtos foram relatados de 1952 a 2011 e *S. schenckii* foi o agente etiológico (Singer, 1952; Reed, 1993; Rees, 2011). No México, onde o agente etiológico predominante é *S. schenckii s. str.* (Zhang, 2015), apenas um caso de esporotricose zoonótica foi descrito relacionado a um gato infectado em 2008 (Bove-Sevilla, 2008).

Apesar da prevalência da afecção em países em desenvolvimento, há casos isolados de esporotricose felina documentados na Austrália, Espanha, Japão e Alemanha, apesar de não haver relatos de transmissão zoonótica nestas regiões (Mackay, 1986; Gonzalez, 1989; Hirano, 2006; Scheufen, 2015).

Na Malásia, 12 casos de transmissão zoonótica relacionada a gatos foram relatados entre 1990 e 2010 (Zamri-Saad, 1990; Tang, 2012). Zhang *et al.* (2015), relataram 18 isolados clínicos de gatos como *S. schenckii s. str.*, o agente causador predominante da esporotricose felina na Malásia (Siew, 2017).

No Brasil, nunca houve relatos de uma epidemia similar à que ocorre atualmente. Casos de esporotricose já foram relatados nos Estados do Rio de Janeiro (Pereira, 2014), Rio Grande do Sul (Madrid, 2010; Rodrigues, 2014a), São Paulo (Freitas, 1954; Montenegro, 2014), Minas Gerais (Rodrigues, 2013b; Rodrigues, 2014a) e Espírito Santo (Oliveira, 2013), vale ressaltar que Minas Gerais, Espírito Santo e São Paulo são estados que fazem divisa com o Rio de Janeiro.

A primeira epidemia, de cunho zoonótico, no Brasil, foi descrita a partir do final da década de 1990, no Rio de Janeiro, e vem, também, se perpetuando endemicamente. Deste modo, o município do Rio de Janeiro é considerado o epicentro da esporotricose felina no

Brasil. Desde 1998, 244 cães foram diagnosticados até 2014 (Viana, 2015) e 4703 gatos foram diagnosticados até 2015 (Gremião, 2017). Segundo Pereira (2014), a esporotricose é considerada uma doença negligenciada e um grave problema de saúde pública no Rio de Janeiro, sendo que de 1997 até 2011 já foram diagnosticados 4118 casos humanos diagnosticados no INI/FIOCRUZ, o principal centro de referência para tratamento desta micose no Brasil (Silva 2012; Gremião, 2015).

Casos de esporotricose felina e transmissão zoonótica foram relatados em outros estados brasileiros, especialmente no Rio Grande do Sul e São Paulo; no entanto, o número relatado nessas regiões é muito menor quando comparado ao Rio de Janeiro (Rodrigues, 2016). Devido à alta incidência de esporotricose felina, o Rio de Janeiro é atualmente considerado hiperendêmico para a esporotricose associada ao gato (Rodrigues, 2016). No entanto, esses casos foram registrados de uma única instituição, portanto, eles realmente não refletem a imagem real da doença nesta região (Gremião, 2017). Apesar do fato de que este é o maior número de casos de esporotricose canina já documentados, não houve relatos de transmissão zoonótica de cães na epidemia do Rio de Janeiro (Gremião, 2017). Os cães não estão diretamente envolvidos na transmissão do *Sporothrix* spp. Possivelmente devido à escassez de organismos fúngicos em suas lesões (Schubach, 2006).

Nas últimas décadas, no estado de São Paulo foi relatado um número basal de casos de esporotricose, quase sempre sem relação com a transmissão zoonótica relacionada aos gatos (Rodrigues, 2014; Borges, 2013). No período de 1956 a 2001 foram identificados 51 casos em gatos e 15 em pacientes humanos (Nobre, 2001). No município de São Paulo há relato de 25 gatos com esporotricose atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP), no período de 1986 a 2002 e no intervalo de 19 anos, de 1993 a 2011 foram relatados 29 gatos e oito cães diagnosticados no mesmo hospital (Larsson, 2011).

O Centro de Controle de Zoonoses de São Paulo (CCZ-SP) realizou um serviço de vigilância epidemiológica entre gatos selvagens desde 2008 (Montenegro, 2014). O primeiro caso suspeito de esporotricose felina em São Paulo surgiu em março de 2011 na região de Itaquera, uma área urbana com alta densidade populacional, predominantemente povoada por indivíduos de baixa renda e com acesso insuficiente aos cuidados de saúde e um baixo nível educacional. Entre 2011 e 2012, o surto de esporotricose felina nesta área afetou 98 gatos e 11 humanos que entraram em contato com os animais (Silva, 2013).

Há relatos da doença em outros animais: papagaio, camundongo, esquilos, calopsita, cachorros, ratos, cavalos e galinhas (Rippon, 1998), mas nenhum deles apresenta um potencial zoonótico importante como o do gato doméstico (Schubach, 2004), isto porque ao contrário das lesões observadas em humanos e cães, lesões cutâneas em felinos carregam uma alta carga fúngica, tornando o gato uma importante fonte de infecção na transmissão zoonótica desse fungo (Barros, 2011; Pereira, 2011).

Muitos tutores que são infectados pelos animais temem outros casos no domicílio e abandonam seus gatos longe das residências, favorecendo ainda mais a disseminação da doença. Outros sacrificam os animais, jogando os corpos em terrenos baldios ou os enterrando nos quintais, atitude que favorece a perpetuação do fungo no meio ambiente (Barros, 2010).

O perfil dos gatos que mais estão envolvidos na cadeia epidemiológica de transmissão da esporotricose são: (a) domiciliados com acesso à rua, ou que vivem na rua, (b) machos (c) inteiros (animais que não foram submetidos à castração) (d) faixa etária entre 2 e 3 anos e que (d) não possuem raça definida (Otsuka, 2004; Pereira, 2014). Decorre a ação de seus hábitos inatos, como enterrar seus excrementos, lutar com outros animais (por disputa de território ou fêmeas) e escalar árvores ou afiar suas garras sobre eles. Eles podem se tornar portadores saudáveis ou doentes de esporotricose e, portanto, atuam como fonte de infecção para humanos e outros animais através de mordedura, arranhadura ou pelo contato com lesões na pele ou na mucosa (Larsson, 1989; Schubach, 2001). Deste modo, não somente agricultores, jardineiros e trabalhadores rurais que diariamente tem contato com o solo potencialmente infectado são considerados grupos de risco; tutores de gatos, tosadores e tratadores de animais, acadêmicos de medicina veterinária e profissionais veterinários também podem ser vítimas ocasionais de arranhaduras e mordeduras de felinos infectados (Schubach, 2002; Larsson, 2011; Barros, 2011).

Clinicamente, o fungo induz uma reação supurativa granulomatosa nos tecidos do hospedeiro (Kong, 2006). Nos gatos a doença é caracterizada por apresentar lesões com característica pápulo-nodular ou ulcero gomosa (Larsson, 2011). As lesões podem variar entre únicas, com resolução espontânea, até formas sistêmicas fatais (Schubach, 2004). De acordo com a localização da lesão, a doença pode ser classificada como cutânea, mucosa ou extracutânea; a forma cutânea pode ser dividida ainda em cutânea fixa, disseminada ou linfocutânea (Larsson, 2011). Múltiplas lesões de pele, de mucosa e sinais extracutâneos (principalmente comprometimento de trato respiratório) são frequentes em animais diagnosticados com esporotricose (Schubach, 2004). Os sinais extracutâneos, particularmente

os sinais respiratórios (espirros, dispneia e secreção nasal) e envolvimento da mucosa, também são frequentemente observados em gatos (Gremião, 2015). A presença de sinais respiratórios, parece estar associada à pior resposta ao tratamento e maior probabilidade de óbito (Pereira, 2010). Não foram encontrados resultados clínicos e laboratoriais significativos entre os animais co-infectados com os retrovírus da imunodeficiência felina (FIV) e/ou com o vírus da leucemia felina (FeLV) (Schubach, 2004).

O prognóstico para gatos depende do número, da extensão e da localização das lesões; bem como da ocorrência de sinais respiratórios; a condição clínica geral do gato e da cepa infectante, que pode conferir virulência variável e uma resposta diferente ao tratamento (Kong, 2006). A esporotricose felina oferece dificuldades de tratamento e exige um longo período de cuidados diários; vale ressaltar, também, que os gatos nem sempre respondem bem ao tratamento (Gremião, 2015). A cooperação e a persistência do tutor são necessárias para um tratamento bem sucedido (Schubach, 2012).

Em humanos, a maioria dos pacientes apresenta formas cutâneas (25%) e linfocutâneas (55%) (Querioz-Telles, 2003). A forma disseminada cutânea é relatada em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos (Moreira, 2015). Raramente, há envolvimento extracutâneo, em geral quando ocorre há comprometimento pulmonar. Também são relatadas infecções osteoarticular, oftálmica e do sistema nervoso central. A meningite é mais frequente em indivíduos imunocomprometidos. Um número crescente de formas imunoalérgicas – como por exemplo: eritema nodoso, artralgia, mialgia e coriorretinite - foram descritos durante a epidemia no Brasil (Queiroz-Telles, 2017).

No organismo humano afetado, a imunidade das células T é importante na limitação da doença (Fernandes, 2008). Alguns fatores são relatados como ativadores da resposta Th1 ou Th2, como o ergosterol (componente da parede celular fúngica) e exoantígenos (Carlos IZ, 2009). Inicialmente a resposta Th1 é predominante, e somente a partir da quinta semana há Th2. A imunidade de Th1 parece desempenhar um papel protetor em modelos experimentais de esporotricose (Flores-Garcia, 2015). Maia *et al.* (2009) sugerem que a resposta humoral acontece nos estágios mais avançados da doença. A via clássica do complemento é ativada pela imunoglobulina M (IgM) (Almeida Paes, 2007). O processo de adesão é fundamental para a invasão e disseminação de tecidos (Ruiz-Baca, 2009), com a ligação específica da fibronectina através de adesinas na superfície de fungos (Teixeira, 2009).

Em relação à resposta imune felina frente a esporotricose, ainda são grandes os questionamentos, porém sabe-se que os gatos com esporotricose podem ter uma inversão da

relação de linfócitos circulantes periféricos CD4 / CD8. Os casos mais brandos da doença, com menor carga fúngica, foram associados ao aumento das porcentagens de células CD4 +, enquanto que a infecção associada a maiores porcentagens de células CD8 +, e especialmente de células CD8^{low}, ocorreu nos casos em que os sinais clínicos foram mais graves, com lesões disseminadas (Miranda, 2016). A importância dos linfócitos CD4 + também já foi descrita em outras doenças fúngicas, como a cromoblastomose e a criptococose (Aguirre, 2004; Teixeira de Sousa, 2006).

O diagnóstico definitivo de esporotricose felina requer o isolamento do agente etiológico em cultura e sua identificação de espécies por estudos morfológicos e fenotipagem fisiológica, bem como pela PCR visando o gene calmodulina (Rodrigues, 2013b). Para um diagnóstico preliminar da doença nos gatos, técnicas histológicas e citológicas também podem ser utilizadas (Gremião, 2015). Pesquisadores do Laboratório de Pesquisa Clínica em Dermatozoonoses em Animais Domésticos, INI/FIOCRUZ, avaliaram a positividade destas técnicas, obtendo 85% e 87% na citologia (Silva, 2015; Silva, 2018), 91,3% na histopatologia corada com Grocott e 88,6% na imunohistoquímica (Silva, 2018). Histologicamente, as lesões de esporotricose felina são caracterizadas por uma reação inflamatória piogranulomatosa e altas cargas fúngicas (Schubach, 2004; Miranda, 2013).

Além da pele, há relato de identificação de elementos fúngicos em pulmões, fígado, linfonodos e baço (Schubach, 2003). Fernandes *et al.* (2011) padronizaram um ELISA (ensaio imunoenzimático) para o diagnóstico de esporotricose felina, cujo objetivo foi a detecção de anticorpos específicos contra *S. schenckii* em felinos, tornando-se mais uma ferramenta para o rastreio da esporotricose.

O tratamento da esporotricose felina apresenta um desafio, pois há um número limitado de agentes antifúngicos orais, e esses agentes têm efeitos adversos, alguns não apresentam resposta ao tratamento e possuem alto custo (Gremião, 2015).

Em relação à resistência, há alguns estudos sobre o perfil de suscetibilidade frente aos antifúngicos que podem ser utilizados no tratamento da esporotricose. Contudo, os pontos de corte clínicos, para interpretação dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) de qualquer fármaco frente a isolados do gênero *Sporothrix* ainda não estão definidos.

Os antifúngicos azólicos e o iodeto de potássio são os fármacos mais comumente utilizados para tratar a esporotricose felina (Pereira, 2010; Reis, 2012). A cura clínica é observada independentemente dos achados clínicos iniciais ou co-infecção com FIV e/ou FeLV. O tratamento em média leva de 4 a 9 meses e deve ser continuado por pelo menos 1

mês após a cura clínica. A recorrência pode ocorrer, demonstrando a possibilidade de reativação das lesões, apesar do término do tratamento (Pereira, 2010; Gremião, 2011).

O itraconazol (5 mg/kg SID para gatos filhotes ou com menos de 3kg e 10 mg/kg SID para gatos adultos e acima de 3kg) atualmente é considerado o medicamento de escolha. Há ressalvas no uso terapêutico do cetoconazol visto os efeitos adversos que podem suceder ao administrar esse medicamento aos gatos, contudo o custo deste medicamento em comparação ao de primeira escolha – itraconazol é inferior, devendo ser considerado como possibilidade terapêutica (Gremião, 2015).

O INI/Fiocruz acompanha a epidemia de esporotricose e refere que há vários casos de gatos com lesões refratárias ao tratamento antifúngico oral convencional. Para estes casos, a recomendação é a associação com o iodeto de potássio (5 mg/kg SID) (Gremião, 2015), ou alternativamente a anfotericina B administrada intralesional ou subcutânea (Pereira, 2009; Gremião, 2011).

Em alguns casos, a criocirurgia pode ser indicada em associação com a administração oral de itraconazol, apresentando sucesso terapêutico (Souza, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Análise da epidemiologia das cepas do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii*, em relação aos aspectos fenotípicos, moleculares e de suscetibilidade aos fármacos, isoladas de gatos domésticos no município de Guarulhos, estado de São Paulo.

3.2.1 Objetivos específicos:

- Identificação da ocorrência de esporotricose em animais suspeitos (gatos domésticos com lesões sugestivas da doença) por cultivo micológico;
- Identificação de gatos hígidos contactantes de animais doentes, se portadores assintomáticos do fungo (positivos para *Sporothrix* spp. em cultivo micológico, porém sem apresentação clínica da doença);
- Identificação de gatos hígidos *Não-Contactantes* de animais suspeitos, se portadores assintomáticos do fungo (positivos para *Sporothrix* spp. em cultivo micológico, porém sem apresentação clínica da doença);
- Correlação da identificação micológica e histopatológica do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii*;
- Identificação da ocorrência de esporotricose em animais suspeitos através de técnica de embocado celular (citologia em meio líquido);
- Determinação da(s) espécie(s) de *Sporothrix* envolvida(s) nas amostras positivas no cultivo micológico nos três grupos, por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR);
- Determinação da(s) espécie(s) de *Sporothrix* envolvida(s) em amostras coletadas diretamente das lesões de gatos com suspeita clínica de esporotricose, por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR);
- Investigação da susceptibilidade das cepas aos fármacos terbinafina e voriconazol, pela metodologia de referência de microdiluição (CLSI);
- Investigação da susceptibilidade das cepas aos fármacos itraconazol, anfotericina B e fluconazol através de kit comercial E-test.

4 JUSTIFICATIVA

A esporotricose é a micose cutânea mais frequente em áreas urbanas no Brasil. É uma doença de distribuição mundial, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais com alta incidência em países como Brasil, China e África do Sul. O perfil urbano da doença no Brasil é potencialmente influenciada pelos hábitos e estilos de vida, acometendo populações de baixa renda com determinadas condições ambientais: infraestrutura e saneamento precárias, pavimentação incompleta, casa com jardim, solo exposto, material de construção e entulho nos quintais e a presença de felino (principalmente utilizado por tutores como medida de controle de roedores), fechando o ciclo gato-ambiente-homem.

Embora a ocorrência de esporotricose em animais, principalmente em gatos, e sua transmissão para humanos já tenha sido descrita em alguns países, em nenhum outro lugar a doença assumiu proporções epidêmicas como no Brasil. No estado do Rio de Janeiro, já foram confirmados mais de 4 mil casos em humanos e 4.703 casos em felinos. Neste estado, o atendimento público veterinário e o fornecimento gratuito do tratamento aos animais doentes são realizados pelo INI/FIOCRUZ, que não consegue atender toda a demanda de casos envolvidos na epidemia. Após 2013, o Instituto Municipal de Medicina Veterinária Jorge Vaitsman e o CCZ do município do Rio de Janeiro começaram a distribuição de medicamentos para tratamento em felinos acometidos pela esporotricose. Infelizmente, mesmo com a assistência provida, o abandono ao tratamento é frequente nos casos de esporotricose felina, representando um importante obstáculo no controle da doença.

Desde 2010, o número de casos de esporotricose vem crescendo na cidade de São Paulo e em dois municípios vizinhos (Diadema e Guarulhos), chegando a quase 200 casos confirmados em 2013. Em decorrência do crescente número de casos confirmados de esporotricose em humanos e gatos no Município de Guarulhos, a doença assumiu o status de “notificação compulsória” pela portaria no. 064/2016, conforme publicado no Diário Oficial do Município em 27 de Julho de 2016.

Em vista desse panorama, este estudo visou a avaliação da epidemiologia do fungo clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii* na cidade de Guarulhos e a verificação da presença de mais de uma espécie causando a doença no animal. Além disto, gatos que não apresentem lesões cutâneas, tanto contactantes de animais doentes quanto não contactantes, foram avaliados para averiguar a possibilidade de haver portadores assintomáticos do fungo.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

PRIMEIRO ESTUDO (a)

5.1 (a) Local do estudo

As amostras biológicas e dados utilizados no estudo foram provenientes de gatos residentes na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo (Figura 1).

Figura 1: Guarulhos (São Paulo). Moradias sem acesso ao saneamento básico, ruas sem pavimentação e diversas construções realizadas sem a aprovação do município em áreas invadidas de mata.

Fonte: Gonsales (2017).

5.2 (a) População do estudo

A população do estudo foi composta por 119 gatos domésticos; divididos em três grupos: grupo *Caso*, grupo *Contactante* e grupo *Não-Contactante*.

Para o grupo *Caso*, foram selecionados 52 gatos, atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos (CCZ-Guarulhos), com lesões que incluía a esporotricose como hipótese diagnóstica (Figura 2). As coletas foram realizadas durante as visitas dos médicos veterinários do CCZ-Guarulhos à residência dos munícipes responsáveis por animais com suspeita de esporotricose (Figura 3). As visitas foram agendadas através de contato prévio do munícipe com o CCZ-Guarulhos, ou através de busca ativa, por funcionários do CCZ-Guarulhos, em bairros onde a doença tenha sido previamente diagnosticada.

Figura 2: Gato incluso no grupo *Caso* – gato com suspeita de esporotricose, apresentando lesão ulcerada na região cefálica, na face, região periorbital e em orelha esquerda.

Fonte: Gonsales (2017).

Figura 3: Acompanhamento da visita do médico veterinário e de agentes de saúde do CCZ- Guarulhos à residência de munícipe de Guarulhos, após solicitação e agendamento prévio por telefone. O trabalho realizado na residência consistia em orientar o munícipe sobre a esporotricose (manejo do gato e contactantes, como proceder em confirmação de esporotricose e onde buscar auxílio médico em suspeita de caso humano), coleta de material biológico de gatos com lesão para diagnóstico de esporotricose e entrega de itraconazol para tratamento dos gatos afetados com esporotricose.

Fonte: Gonsales (2017).

Animais que estivessem sob responsabilidade do CCZ - Guarulhos e alojados em suas dependências, com suspeita de esporotricose ou em tratamento para esta doença, também integraram o grupo *Caso*. O quadro 1 indica os critérios de inclusão/exclusão dos animais que integraram o grupo *Caso*.

Quadro 1 - Critérios de inclusão e exclusão para animais do grupo *Caso*.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> • Gatos domésticos • Residente no município de Guarulhos • Apresentando lesões cutâneas úmidas cuja inspeção incluía a esporotricose como diagnóstico diferencial suspeito • Atendido, em qualquer momento da pesquisa, pelo CCZ – Guarulhos • Animais provenientes de tutores que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proposto pela CEUA-VET (Comissão de Bioética da FMVZ USP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ter iniciado tratamento com itraconazol e/ou fluconazol e/ou iodeto de potássio e/ou cetoconazol • Ter sintoma clínico respiratório sem lesão cutânea

Fonte: Gonsales (2017).

Para o grupo *Contactante*, foram selecionados 39 gatos contactantes de gatos do grupo *Caso* positivos para esporotricose. As coletas foram realizadas durante as visitas dos veterinários do CCZ-Guarulhos à residência dos munícipes responsáveis por animais com suspeita de esporotricose, no mesmo momento em que foram obtidas às amostras dos gatos do grupo *Caso*. Os critérios de inclusão/exclusão para a seleção dos animais do grupo *Contactante* estão apresentados no quadro 2.

Quadro 2 - Critérios de inclusão e exclusão para animais integrantes do grupo *Contactante*.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> • Gatos domésticos • Residente no município de Guarulhos • Não apresentar lesões cutâneas cuja inspeção incluía a esporotricose como diagnóstico diferencial suspeito • Contactante de gato incluso no grupo <i>Caso</i> • Animais provenientes de tutores que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proposto pela CEUA-VET (Comissão de Bioética da FMVZ USP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ter iniciado tratamento com itraconazol e/ou fluconazol e/ou iodeto de potássio e/ou cetoconazol • Ter sintoma clínico de quadro respiratório sem lesão cutânea

Fonte: Gonsales (2017)

Para o grupo *Não-Contactante*, foram selecionados 28 gatos encaminhados, por seus tutores, ao CCZ - Guarulhos para a campanha de castração (ovariosalpingohisterectomia – OSH ou orquiectomia), que tenham acesso à rua, e que não fossem contactantes de animais suspeitos ou positivos para esporotricose. As coletas foram realizadas previamente à realização do procedimento de OSH ou orquiectomia. O quadro 3 indica os critérios de inclusão/exclusão deste grupo.

Quadro 3- Critérios de inclusão e exclusão para animais do grupo *Não-Contactante*.

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> • Gatos domésticos • Residente no município de Guarulhos • Não apresentar lesões cutâneas cuja inspeção incluía a esporotricose como diagnóstico diferencial suspeito • Gato encaminhado ao CCZ-Guarulhos para a campanha de castração • Animais provenientes de tutores que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) proposto pela CEUA-VET (Comissão de Bioética da FMVZ USP) 	<ul style="list-style-type: none"> • Ter iniciado tratamento com itraconazol e/ou fluconazol e/ou iodeto de potássio e/ou cetoconazol

Fonte: Gonsales (2017)

Todos os animais integrantes deste primeiro estudo tiveram seus dados coletados em Ficha de Coleta individual e específica (figuras 4).

Figura 4: a. Ficha de identificação individual dos animais integrantes do projeto. Frente

<p>LOCALIZAÇÃO DAS LESÕES</p> <p>(indicar tipo de lesão: N: nódulo; U: úlcera; C: crosta; AV: aumento de volume)</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>Número de lesões: 1 [] 2 [] 3 [] 4 [] 5 [] 6 ou + []</p> <p>Tipo de apresentação clínica: Cutânea Localizada []</p> <p style="padding-left: 150px;">Linfocutânea []</p> <p style="padding-left: 150px;">Disseminada []</p> <p style="padding-left: 100px;">Extracutânea/sistêmica []</p>	<p>ACOMPANHAMENTO</p> <p>Animal mantido isolado durante o tto: Não [] Sim [] _____</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 5%;"> </th> <th style="width: 15%;">Data</th> <th style="width: 80%;">Observações</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td style="text-align: center;">1</td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">2</td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">3</td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">4</td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">5</td><td> </td><td> </td></tr> <tr><td style="text-align: center;">6</td><td> </td><td> </td></tr> </tbody> </table>		Data	Observações	1			2			3			4			5			6		
	Data	Observações																				
1																						
2																						
3																						
4																						
5																						
6																						

Fonte: Gonsales (2017).

Figura 4: b. Ficha de identificação individual dos animais integrantes do projeto. Verso

Número ID _____	Caso novo []	Em tratamento []	Contactante []	Não contactante []	Data ____/____/____
-----------------	---------------	-------------------	-----------------	---------------------	---------------------

<p>IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL</p> <p>Nome: _____ Idade: _____ (anos / meses) Sexo: [] M [] F</p> <p>Pelagem: _____ Castrado: Não [] Sim []</p> <p>Nome do Responsável: _____ Telefone _____</p> <p>Endereço: _____ Bairro _____</p> <p>CEP _____ Coordenadas _____</p> <p>Contactantes: Não [] Sim [] _____</p> <p style="padding-left: 40px;">Felinos: Sintomático [] (ID caso _____)</p> <p style="padding-left: 40px;">Assintomático [] (ID controle _____)</p> <p>Acesso à rua? Não [] Sim [] Acesso ao quintal [] _____</p> <p>Início do quadro clínico: _____ (dias / meses)</p> <p>Sinais respiratórios? Não [] Sim [] Iniciado há _____ (dias / meses)</p> <p style="padding-left: 40px;">Estenose [] Secreção nasal [] espirros []</p> <p style="padding-left: 40px;">Outros [] _____</p> <p>Estado geral: BEG [] REG [] MEG []</p> <p>Tipo de alimento: Seco [] Úmido [] Restos de comida [] _____</p> <p>Tratamento anterior: Não [] Sim [] Período: _____ (dias / meses)</p> <p>_____</p> <p>Casos em humanos na residência: Não [] Sim [] _____</p>	<p>MATERIAL COLETADO</p> <p>Swab lesão [] PAAF [] Mat. Histopatol. [] Swab cavidade oral []</p> <p>Local da coleta: _____</p> <p>CARACTERÍSTICAS AMBIENTAIS</p> <p>Rua asfaltada: Não [] Sim []</p> <p>Carac. construção: Alvenaria [] Madeira []</p> <p style="padding-left: 40px;">Acabamento externo: Não [] Sim []</p> <p style="padding-left: 40px;">Solo exposto: Não [] Sim []</p> <p style="padding-left: 40px;">Plantas/área verde: Não [] Sim []</p> <p style="padding-left: 40px;">Presença de entulho/mat. construção: Não [] Sim []</p> <p>Saneamento: Rede de esgoto [] Água encanada [] Coleta de lixo []</p> <p>Presença de ratos: Não [] Sim []</p> <p style="padding-left: 40px;">O gato é usado como controle? Não [] Sim []</p> <p>OBSERVAÇÕES</p>
---	--

Fonte: Gonsales (2017).

5.3 (a) Coleta de material biológico

Foram coletadas amostras de exsudato de lesão de pele de gatos com suspeita de esporotricose (grupo *Caso*) provenientes dos animais atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Guarulhos. A coleta foi realizada através de suabe estéril diretamente sobre a lesão cutânea (figura 5) e armazenada em solução salina estéril (0,85%) com cloranfenicol até o processamento para cultura fúngica, uma segunda coleta foi feita através de escova citológica estéril sob a lesão para a citiologia em meio líquido por emblocado celular. Dos gatos do primeiro estudo incluídos nos grupos *Contactante* e *Não-Contactante*, foram coletas amostras da cavidade oral, utilizando-se suabe estéril sobre a mucosa oral com posterior armazenamento em solução salina estéril (0,85%) com cloranfenicol.

Figura 5: Coleta de exsudato de lesão ulcerada gato incluso no grupo *Caso* (amostrado no CCZ-Guarulhos, após o gato ter sido submetido ao procedimento de eutanásia).

Fonte: Gonsales (2017).

Todas as amostras foram coletadas apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelo responsável direto do animal; após a coleta, as amostras foram armazenadas refrigeradas em frasco com solução salina estéril a 0,85% com adição de cloranfenicol e enviadas, no mesmo dia da coleta, para processamento no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo/SP.

Em paralelo a este estudo, o programa de vigilância do CCZ de Guarulhos rotineiramente envia todas as amostras suspeitas esporotricose felina para diagnóstico no setor de micologia do Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do CCZ de São Paulo, deste modo, todas as amostras do grupo *Caso* foram obtidas no mesmo dia e foram semeadas nos dois laboratórios.

Ambos os laboratórios autorizaram a divulgação dos resultados obtidos. Os laboratórios serão denominados ao longo do estudo de Laboratório A e Laboratório B.

5.4 Cultura fúngica e identificação fenotípica

As culturas foram semeadas em ágar Sabouraud com cloranfenicol e incubadas a 30°C durante 7 dias, sendo observado o crescimento e realizada a reversão térmica. Após, foi realizada uma lâmina corada com lactofenol, para confirmação microscópica de gênero, visualizando hifas septadas com o aspecto típico de margarida e esporulação florida, para confirmação do gênero (de Hoogs, 2000).

5.5 Determinação de sensibilidade aos fármacos

Os testes de suscetibilidade aos antifúngicos tanto pela microdiluição, como pelo E-test foram realizados após o isolamento e purificação das culturas de *Sporothrix* spp.

5.5.1 Microdiluição

A sensibilidade aos antifúngicos das amostras isoladas para o clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii* em meio de cultivo, foram avaliadas pelo método proposto pelo Clinical Laboratory Standards Institute-CLSI (CLSI, 2008), com automação da leitura, a partir de culturas de 96h. Os antifúngicos empregados na forma p.a. (puro analítica) para determinação da sensibilidade através da microdiluição foram: voriconazol e terbinafina. A anfotericina B, fluconazol e itraconazol foram submetidos ao E-Test.

Os resultados de concentração inibitória mínima (MIC) foram obtidos para cada composto, analisando parâmetros de: mediana, valor mínimo e máximo. Para interpretação dos valores de MIC, os pontos de corte clínicos de qualquer fármaco frente a isolados do gênero *Sporothrix*, ainda não estão definidos na literatura.

5.5.2 E-Test

Para realização do E-test, foram utilizadas amostras provenientes das leveduras com resultado positivo no cultivo micológico. A conversão para a fase filamentosa foi realizada a 37°C, utilizando tiras dos antifúngico itraconazol, fluconazol e anfotericina B (AB Biodisk, Suécia), de acordo com as recomendações do fabricante.

5.6 (a) Identificação molecular

A identificação da espécie de *Sporothrix*, foram submetidas à reação de PCR simples de três espécies patogênicas: *S. schenckii sensu strictu* (*s. str.*), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, segundo o protocolo de Rodrigues (2015) especificado a seguir. Neste estudo foram avaliadas as amostras positivas em isolamento fúngico.

5.6.1 Extração de DNA

O DNA das amostras obtidas foi extraído e purificado utilizando-se o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Crawley, Reino Unido), conforme especificação do fabricante. As amostras foram armazenadas a -20°C até a utilização nas reações de PCR.

5.6.2 Reação em cadeia pela Polimerase

As PCRs foram realizadas com os *primers* senso e antisenso para as espécies *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa*, conforme figura 6:

Figura 6 - Espécie alvo, identificação e sequência do primer e tamanho do amplicon para as espécies do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii*. Em destaque, as espécies utilizadas neste projeto. IPC: Controle interno positivo.

Target species	Primer	Primer sequence (5'-3')	Target	Amplicon size (bp)
<i>S. brasiliensis</i>	Sbra-F	CCC CCG TTT GAC GCT TGG	CAL	469
	Sbra-R	CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT		
<i>S. schenckii</i>	Ssch-F	TTT CGA ATG CGT TCG GCT GG	CAL	331
	Ssch-R	CTC CAG ATC ACC GTG TCA		
<i>S. globosa</i>	Sglo-F	CGC CTA GGC CAG ATC ACC ACT AAG	CAL	243
	Sglo-R	CCA ATG TCT ACC CGT GCT		
<i>S. mexicana</i>	Smex-F	TCT CTG CCG ACA ATT CTT TCT C	CAL	183
	Smex-R	GGA AAG CGG TGG CTA GAT GC		
<i>S. pallida</i>	Spa-F	CGC TGC TTT CCG CCA TTT TCG C	CAL	363
	Spa-R	GCC ATT GTT GTC GCG GTC GAA G		
<i>O. stenoceras</i>	Oste-F	GTG AAC ACC CTC TAT GTA CTT CG	CAL	144
	Oste-R	GTG TAG AGG GGG ATA GAC AGT G		
<i>Sporothrix/Ophiostoma</i>	IPC-F	ATG CGA TAC GTA ATG TGA ATT GC	5.8S	101
(IPC)	IPC-R	GAC GCT CGG ACA GGC ATG		

Fonte: Rodrigues (2015b).

O alvo foi o gene calmodulina dos membros do gênero *Sporothrix/Ophiostoma*. A mistura para a PCR consistiu de 25 µL de volume final, sendo 12,5 µL de Master Mix buffer para PCR (2X), 1 µL de cada primer (*senso* e *antisenso* - 10 pmol/µL) de cada espécie para cada reação, 1 µL de DNA alvo [100 ng/µL] e água pura para completar o volume. As condições para a reação foram as seguintes: denaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, anelamento da temperatura por 1 minuto (touchdown PCR) e 1 minuto a 72°C. No protocolo de touchdown, a temperatura de anelamento foi reduzida em 1 °C a cada 2 ciclos pelos próximos 20 ciclos; finalmente, a PCR foi completada com a temperatura de anelamento de 60 °C por mais 15 ciclos.

5.6.3 Eletroforese

O produto foi revelado em eletroforese em gel de agarose a 100V na presença de GelRed (Biotium, Hayward, CA, USA). As bandas marcadas foram visualizadas com luz UV através do sistema de imagens L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

5.7 Citologia em meio líquido por emblocado celular

5.7.1 Amostras para emblocado celular

As amostras foram obtidas através de raspado da lesão cutânea de gato por escova cervical estéril, transferido o material obtido para frasco com solução preservativa de citologia em meio líquido (Surepath, Becton Dickinson, EUA). O frasco foi armazenado em temperatura ambiente. O processamento foi realizado no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz.

5.7.2 Citologia em meio líquido por emblocado celular (CB)

Após fixação, o conteúdo foi transferido para tubo cônico para centrifugação por 10 min a 2000 rpm, com posterior descarte do sobrenadante. O sedimento foi transferido para flaconete de 1,5ml, adicionado 500µL de solução de Nathan (10% - formalina 37%, 90% - álcool absoluto) e deixado em repouso sob refrigeração overnight. No dia seguinte, foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi transferido para papel de seda e fixado em cassete histológico com solução de formalina tamponada 10% por até 6 horas. O material foi submetido a processamento histológico, por inclusão em parafina e foi realizada a microtomia obtendo lâminas para avaliação em H&E e imunocitoquímica.

5.8 Processamento histopatológico

O processamento histológico foi realizado apenas em gatos eutanasiados e os órgãos utilizados foram: pele, linfonodo, baço, fígado, pulmão, coração e rim, de acordo com o protocolo padronizado pelo Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz.

5.8.1 Preparação dos blocos histopatológicos

Os cassetes histológicos com as amostras permaneceram em formalina a 10% tamponada com sais de fosfato, por no mínimo 18 horas e no máximo de 72 horas. Com o auxílio de uma pinça, as amostras foram transferidas para um frasco de vidro com tampa

contendo álcool 70% por no mínimo 24 horas. Após esse período, os cassetes foram transferidos para caçapa de metal para o equipamento histotécnico, presas no frasco correspondente ao álcool 70%, seguidos pelas etapas: cuba 1: álcool 70% por 1h 30 minutos; cuba 2: álcool 70% por 1h 30 minutos; cuba 3: álcool absoluto por 1h 30 minutos; cuba 4: álcool absoluto por 1h 30 minutos; cuba 5: álcool absoluto por 1h 30 minutos; cuba 6: xilol por 1h 30 minutos; cuba 7: xilol por 1h 30 minutos; cuba 8: xilol por 1h 30 minutos; cuba 9: parafina I por 1h 30 minutos e finalmente, cuba 10: parafina II por 2 horas.

Finalizado o procedimento no equipamento histotécnico, os cassetes histológicos foram retirados da caçapa de metal e transferidos para o interior da estufa por 2 horas. Após esse período, os cassetes foram retirados com pinça e toalha de papel; a parafina de inclusão foi filtrada dentro do molde e quando endurecida, o molde pode ser desmontado e as laterais aparadas com o uso de uma faca.

5.8.2 Apara dos blocos

Para garantir a representação da totalidade da amostra nos cortes, os blocos foram aparados por micrótomo, em cortes consecutivos com espessura 20 µm utilizando navalha até que toda superfície do fragmento fosse exposta.

5.8.3 Microtomia

A microtomia foi obtida após os blocos permanecerem a -20°C por no mínimo 8 horas. Os cortes histológicos foram obtidos através de navalha com 3 µm (um corte diferente para cada sonda) e transferidos para o banho histológico à 50°C para distensão do corte. As lâminas permaneceram em estufa por 2 horas para adesão completa do tecido na lâmina e inicialização do processo de desparafinização.

5.8.4 Coloração: hematoxilina e eosina

Duas cubas com xilol foram separadas: uma fria e outra quente (previamente aquecida por 20 minutos). As lâminas amostradas foram submetidas por 10 minutos em xilol quente, secas e submersas por 5 minutos em xilol frio. Após secagem, foram submersas em álcool absoluto por 5 minutos, seguido de secagem e novo banho com álcool 70% por 5 minutos e

permaneceram em água corrente por 3 minutos. Na sequência do processo de coloração, as lâminas foram submersas por 30 segundos em água destilada, secas e submersas em hematoxilina por 1 minuto seguido de lavagem com água corrente por 2 minutos e água destilada por 30 segundos, secas e submetidas em álcool absoluto por 5 minutos.

Em outra cuba, as lâminas foram submersas a eosina alcóolica por 1 minuto, secas, transferidas para cuba com álcool absoluto por 30 segundos, secas novamente, repetido este último processo 3 vezes. Para fixar a coloração, as lâminas foram submersas em xilol por 1 minuto, após secagem, esse processo foi repetido 3 vezes. Sobre lamínulas limpas, com tamanho adequado (recobrimdo totalmente os cortes histológicos das lâminas de vidro) foram despejadas 2 gotas de Entellan e aderidas às lâminas dos cortes histológicos.

5.9 Imunohistoquímica

As lâminas destinadas à imunohistoquímica, foram submetidas a desparafinização por 24 horas em estufa 60°C, seguido dos processos: banho de xilol a 60°C por 20 minutos; banho de xilol à temperatura ambiente por 20 minutos, foram submersas em etanol absoluto por 5 minutos, seguido de etanol 70% por 5 minutos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

As lâminas foram transferidas para panela de pressão (4½ litros, inox, A La Carte, Rochedo®), com solução tampão citrato 10 mM pH 6.0 em fervura e após a pressurização total, por 3 minutos. A panela permaneceu sob água corrente até a despressurização total e as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada.

Procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 6%, com 4 trocas de 5 minutos cada, seguida de lavagem em água corrente e destilada. Na sequência, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10 mM pH 7.4 por 5 minutos.

Um segundo bloqueio foi realizado com Novocastra Protein Block por 5 min a temperatura ambiente.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário *Sporothrix* spp. (FIOCRUZ-RJ) diluído 1:3000 em tampão PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA) (Sigma, A9647, EUA) e 0,1% de azida sódica (NaN₃), por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

As lâminas foram lavadas com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Incubadas por 90 min a 37° C com SuperPicture Poly HRP Conjugate (Invitrogen cat# 87-8963, Camarillo, CA, EUA). Seguida de lavagem com tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada.

Outra incubação em solução substrato: 100 mg de 3, 3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (Sigma, D-5637, St Louis, EUA); 1 mL de Dimetilsulfóxido; 1 mL de H₂O₂ 6%; 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Observada ao microscópio, nas lâminas controles, houve o desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação. As lâminas então foram lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos. Foi adicionado o contracorar com hematoxilina de Harris por 1 minuto. Seguida de lavagem em água corrente e destilada.

As lâminas foram imersas 2 vezes em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%), lavadas em seguida em água corrente e destilada.

Por fim, as lâminas foram desidratadas com etanol absoluto 5 vezes, 30 segundos em cada etapa e com xilol 4 vezes, 30 segundos cada. Foram despejadas 2 gotas de Entellan e aderidas às lâminas.

SEGUNDO ESTUDO (b)

5.1 (b) Local do estudo

As amostras biológicas e dados utilizados no estudo foram provenientes de gatos residentes na cidade de Guarulhos, Estado de São Paulo.

5.2 (b) População do estudo

Para o segundo estudo foram selecionados 135 gatos domésticos divididos em dois grupos: grupo *Sintomático* composto por 100 gatos, que foram atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos (CCZ-Guarulhos), com lesões que incluíam a esporotricose como hipótese diagnóstica (Figura 7), gatos cujo tutores levaram diretamente ao CCZ para avaliação ou através de busca ativa feita pelos médicos veterinários do CCZ de Guarulhos e grupo *Assintomático*, sendo que dos 35 gatos incluídos neste grupo, 30 gatos foram provenientes de colheita no momento da campanha de castração (ovariosalpingohisterectomia – OSH ou orquiectomia) promovido pelo CCZ de Guarulhos, dentro do processo de inclusão deste grupo os fatores determinantes eram que os gatos tivessem acesso à rua não supervisionado e que não fossem contactantes de animais suspeitos ou positivos para esporotricose. As coletas foram realizadas previamente à realização do procedimento de OSH ou orquiectomia. Os outros 5 gatos que foram incluídos nesse estudo, são animais que vivem dentro das dependências do CCZ de Guarulhos, que já apresentaram lesões características e tiveram diagnóstico (por cultura fúngica) para esporotricose, foram tratados e não apresentam mais lesões compatíveis com a doença. Vale ressaltar que estes gatos, assim que clinicamente aptos, são colocados para adoção.

Figura 7: Gatos incluídos no grupo *Sintomático*. Gatos com suspeita de esporotricose, apresentando lesões ulceradas. Gato A – n^o. 6: acometimento de plano nasal, região periobital direta com presença de feridas ulceradas em pálpebra inferior e superior direita e pavilhão auditivo direito; gato B – n^o. 23: profuso edema de pálpebras superior e inferior direito.

Fonte: Gonsales (2017).

5.3 (b) Coleta de material biológico

Amostras de lesão de pele de 100 gatos *Sintomático* (independente se eram lesões secas ou úmidas e se o tratamento já havia iniciado) provenientes dos animais atendidos pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) de Guarulhos foram coletadas. A coleta foi realizada através de suabe estéril diretamente sobre a lesão cutânea. As 35 amostras dos gatos *Assintomáticos*, foram colhidas da cavidade oral, utilizando-se suabe estéril sobre a mucosa oral com posterior armazenamento em tubo seco. Ambas as amostras foram armazenadas a -20°C até o processamento das amostras.

5.6 (b) Identificação molecular

Neste estudo, todas as 135 amostras foram avaliadas para as três espécies patogênicas: *S. schenkii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, conforme descrição no item 5.5 (a).

5.10 Análise estatística

O “software” GRAPHPAD INSTAT 1992-98 foi utilizado para a elaboração das análises estatísticas. As variáveis: sexo, status reprodutivo, positividade micológica entre os três grupos delineados do primeiro estudo, bem como a positividade detectada entre as amostras submetidas a citologia em meio líquido e a imunohistoquímica do primeiro estudo. Além das variáveis sexo, positividade através PCR pelo tipo lesão, com ou sem tratamento foram realizadas por meio do teste exato de Fisher. Já as verificações de associação, concordância e correlação entre quantidade de células fúngicas e intensidade de inflamação obtidos pelo histopatológico foram obtidos através do Kappa, R^2 e Pearson.

6 RESULTADOS

6.1 Bioética

Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP (CEUAVET), protocolo nº. 7029080616 em 01/06/2016. Os tutores dos gatos participantes foram informados sobre o experimento e assinaram termo de consentimento livre e esclarecido. As amostras obtidas para o processamento histopatológico foram coletadas somente dos animais eutanasiados no Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos. A decisão pela eutanásia, o protocolo utilizado e a realização do procedimento foram de inteira responsabilidade dos veterinários do CCZ-Guarulhos. Vale ressaltar que os animais não foram submetidos à eutanásia com o objetivo de serem incluídos neste projeto.

RESULTADOS - PRIMEIRO ESTUDO (a)

6.2 (a) População do estudo

A tabela 1 e o gráfico 1 discriminam a frequência obtida entre machos e fêmeas e o status reprodutivo dos gatos do grupo *Caso*, *Contactante* e *Não-Contactante*.

Em relação ao sexo, o grupo *Caso* apresentou maior número de machos (56,92%), enquanto os grupos *Contactantes* e *Não-Contactante* apresentaram maior número de amostras obtidas de fêmeas (58,97% e 67,89%), no total o número de fêmeas amostradas foi maior (52,94%).

O status reprodutivo foi maior dos animais não castrados (62,18%). Contudo todos os animais participantes do grupo *Não-Contactante* eram inteiros (gatos não castrados) e estavam no CCZ de Guarulhos aguardando cirurgia de esterilização. Enquanto o grupo *Caso* apresentou 76,92% de gatos amostrados inteiros, o grupo *Contactante* apresentou maioria de amostragem de gatos castrados (84,62%).

Tabela 1: Frequências obtidas entre machos e fêmeas e o status reprodutivo dos gatos dos grupos *Caso*, *Contactante* e *Não-Contactante*.

Número de gatos	Grupo	Sexo				Status Reprodutivo			
		Macho	%	Fêmea	%	Castrado	%	Inteiro	%
52	<i>Caso</i>	31	56,92%	21	40,38%	12	23,08%	40	76,92%
39	<i>Contactante</i>	16	41,03%	23	58,97%	33	84,62%	6	15,38%
28	<i>Não-Contactante</i>	9	32,14%	19	67,86%	0	0	28	100%
119	Total	56	47,06%	63	52,94%	45	37,82%	74	62,18%

Fonte: Gonsales (2017).

Gráfico 1: Número de gatos machos e fêmeas e o status reprodutivo dos grupos *Caso*, *Contactante* e *Não-Contactante*.

Fonte: Gonsales (2017).

Estatisticamente, não há diferença entre o número de machos e fêmeas entre os grupos *Caso* e *Contactante* ($p=0,093$) bem como entre os grupos *Contactante* e *Não-Contactante* ($p=0,60$); contudo há diferença estatística entre os grupos *Caso* e *Não-Contactante* ($p=0,03$).

Em relação ao status reprodutivo, há diferença estatística extremamente significativa entre os grupos *Caso* e *Contactante* e entre os grupos *Contactante* e *Não-Contactante* (ambos $p=0,0001$), e muito significativa entre os grupos *Caso* e *Não-Contactante* ($p=0,006$). Ressaltando que todos os participantes do grupo *Não-Contactante* eram inteiros (gatos não castrados) e as amostras foram obtidos no dia da cirurgia de esterilização dos animais.

Em relação ao acesso à rua, todos os tutores afirmaram que os gatos possuíam acesso não supervisionado.

6.3 Cultura fúngica e identificação fenotípica

No mesmo dia em que foram realizadas as coletas, as amostras foram entregues ao Laboratório A para serem semeadas, no intuito de diminuir assim a chance de perda de amostras por atraso na semeadura. Das 119 amostras coletadas, 24 amostras foram isoladas na cultura para o gênero *Sporothrix* spp (Figuras 8 e 9); destas, 21 provenientes do grupo *Caso*, 2 do grupo *Contactante* e 1 do grupo *Não-Contactante*, apresentados na tabela 2.

Figura 8: Cultivo fúngico de amostra obtida de lesão de felino suspeito de esporotricose através de suabe em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Figura 9: Inoculação primária de secreção de lesão de gato em placa de ágar Sabouraud com cloranfenicol.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Tabela 2: Positividade em cultura micológica para *Sporothrix* spp. dos grupos *Caso*, *Contactante* e *Não-Contactante* - Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz.

Grupo	Isolamento <i>Sporothrix</i> spp	%
<i>Caso</i>	21	87,50%
<i>Contactante</i>	2	8,33%
<i>Não-Contactante</i>	1	4,17%
Total	24	

Fonte: Gonsales (2017).

A positividade em cultivo micológico obtido no Núcleo de Patologia Quantitativa do Instituto Adolfo Lutz demonstra diferença estatística extremamente significativa entre os *Caso* e *Contactante* e entre os grupos *Contactante* e *Não-Contactante* (ambos $p < 0,05$), pelo teste exato de Fisher.

6.4 Determinação de sensibilidade aos fármacos

Dentre as 24 amostras isoladas na cultura (Figura 10) para o gênero *Sporothrix* spp; somente 16 cepas apresentaram viabilidade para realização dos testes de sensibilidade aos fármacos, teste de microdiluição (Figura 11) e E-Test (Figura 12, 13 e 14), as demais amostras foram perdidas no processo de descontaminação.

Figura 10: Tubos semeados em agar Sabourad para E-Test e microdiluição.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Figura 11: Microdiluição – voriconazol (Fileira G – cepa padrão ATCC 6258 *Candida krusei* e fileira H cepa padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019).

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Figura 12: Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de *Sporothrix* spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para itraconazol.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Figura 13: Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de *Sporothrix* spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para fluconazol.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Figura 14: Placa semeada com amostra positiva ao isolamento de *Sporothrix* spp, para realização de sensibilidade aos antifúngicos através do E-Test para anfotericina B.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Os resultados obtidos neste estudo para a susceptibilidade aos fármacos dos isolados de *Sporothrix* spp., está representado na tabela 3. A terbinafina, a anfotericina B e o itraconazol apresentaram as menores faixas de MIC (0,06 – 0,5 µg/ml, 0,002 – 2 µg/mL e 0,023 - > 32 µg/ml, respectivamente), enquanto o fluconazol e o voriconazol apresentaram faixas de MIC maiores (> 256 µg/mL e 1 - 8 µg/mL).

Tabela 3: Resultados obtidos na sensibilidade aos antifúngicos através de E-Test e microdiluição.

Gato	Grupo	E-Test (µg/mL)			Microdiluição (µg/mL)	
		Fluconazol	Itraconazol	Anfotericina B	Voriconazol	Terbinafina
1	Caso	>256	0,5	1	4	0,12
2	Caso	>256	0,094	0,38	4	0,06
3	Caso	>256	0,094	0,094	8	0,06
4	Caso	>256	0,094	0,094	8	0,06
5	Caso	>256	0,5	0,25	8	0,25
6	Caso	>256	0,094	0,094	8	0,12
7	Caso	>256	0,094	1,5	8	0,06
8	Caso	>256	0,064	2	8	0,25
9	Caso	>256	0,023	0,064	8	0,12
10	Caso	>256	0,074	0,75	8	0,12
11	Caso	>256	0,094	0,125	8	0,12
12	Caso	>256	0,125	0,002	8	0,12
13	Caso	>256	0,032	1	8	0,06
14	Não-Contactante	>256	0,125	0,064	8	0,12
15	Contactante	>256	>32	0,125	1	0,5
16	Contactante	>256	0,125	1,5	8	0,06
Mediana		-	0,094	0,1875	8	0,12
Valor Mínimo		-	0,023	0,002	1	0,06
Valor Máximo		-	>32	2	8	0,25

Fonte: Gonsales (2017).

6.5 (a) Identificação molecular

As 24 amostras positivas ao cultivo micológico foram submetidas à extração de DNA e a reação de PCR para determinação da espécie de *Sporothrix* isolada. Todas as amostras foram submetidas à pesquisa de *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*. 100% das amostras foram positivas para *S. brasiliensis*.

6.6 Citologia em meio líquido por emblocado celular (CB)

Inicialmente foram colhidas dez amostras de lesões cutâneas, de gatos incluídos no grupo *Caso*; destas, quatro foram obtidas por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) e seis por raspado utilizando-se escova citológica estéril.

A colheita das amostras através de PAAF foi difícil, devida à inquietação do gato pela mobilização e consequente agressividade do mesmo, ocasionando risco de trauma da veterinária que coletava a amostra. Os resultados da PAAF revelaram amostras pouco representativas, sem a turvação adequada do meio no frasco de colheita, somente 50% (2/4) satisfatória e as outras duas amostragens foram insatisfatórias para análise (Figura 15). Os outros dois casos foram representativos, mas um deles exibiu escassa celularidade, insuficiente para a conclusão do diagnóstico.

A colheita realizada por raspado das lesões com escova citológica apresentou mais facilidade mantendo os gatos mais tranquilos e possibilitando, inclusive, que se colhesse de mais de um sítio (quando necessário) e representando um meio mais seguro para obtenção de amostra à veterinária que coletava. O líquido ficou turvo e obteve-se sedimento coeso e densamente celular que permitiu a elaboração de diversos cortes histológicos (Figura 15). Todos os casos (grupo *Caso*) colhidos por escova citológica estéril foram positivos para estruturas fúngicas.

Figura 15 - Lâminas coradas com coloração de ácido periódico de Schiff (PAS). As duas primeiras lâminas de amostras obtidas por raspado. A terceira lâmina obtida por PAAF.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Na coloração de ácido periódico de Schiff (PAS), observou-se quantidade abundante de leveduras de formato arredondado a discretamente ovalado por vezes exibindo brotamento em 70% (7/10) das amostras. As demais amostras (3/10) foram insuficientes para realização do diagnóstico (Figura 16).

Figura 16 - Fotomicrografia de citologia por embocado celular de lesão cutânea. Aumento 400x. Coloração PAS. (A) Amostra insuficiente para conclusão diagnóstica. (B) Marcante quantidade de células inflamatórias, entre elas, neutrófilos, macrófagos, linfócitos e raros plasmócitos e eosinófilos e poucas estruturas leveduriformes (setas) intra e extra-celulares. (C) Abundante quantidade de células fúngicas com distribuição difusa pelo corte, e raras células inflamatórias mononucleares. (D) Imunocitoquímica anti-*Sporothrix*, marcação de coloração amarronzada (setas) confirmando o gênero.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

Após a decisão em prosseguir as coletas utilizando a escova cervical estéril, outras 40 amostras foram obtidas. Destas, apenas uma amostra insuficiente para diagnóstico e 39 (93%) positivos para esporotricose pelo método de citologia em meio líquido por embocado celular. Foi realizado a imunocitoquímica destas lâminas de CB, obtendo três amostras insuficientes para diagnóstico e 37 (92.5%) de positividade para o gênero *Sporothrix*.

Por ser uma técnica nova, comparamos os resultados obtidos com a cultura micológica por se tratar do padrão ouro para esporotricose. Contudo, a positividade obtida no isolamento foi baixa (45%) pelo Laboratório A.

A sensibilidade entre a citologia em meio líquido por embocado celular com o isolamento fúngico foi de 46,15%; enquanto que a sensibilidade entre o isolamento com a imunocitoquímica de CB foi de 48,65%.

Deste modo e com a autorização dos dois laboratórios. Comparamos os resultados obtidos pelo CB com os do Laboratório B. Enfatizando que todos os 40 gatos participantes deste experimento tiveram amostras processadas e colhidas para cultura micológica no mesmo dia em que colhemos para CB. Desta maneira, para as mesmas amostras processadas obtivemos positividade de 95% (38/40 amostras isoladas de *Sporothrix* spp e 2/40 negativas) no Laboratório B.

Entre os resultados obtidos de CB, imunocitoquímica de CB e isolamento no Laboratório B não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$) e a sensibilidade foi de 97,50% entre isolamento do Laboratório B e CB e de 94,87% entre a imunocitoquímica de CB e a cultura fúngica. Assim sendo, optamos por trabalhar com os resultados obtidos pelo Laboratório B.

A especificidade de CB e IHQ de CB não foi calculada por não detectarmos resultados negativos nestas técnicas.

6.7 Análises histopatológica e imunohistoquímica.

O processamento histológico foi realizado apenas nos animais submetidos à eutanásia do grupo *Caso* (25 gatos). Os órgãos utilizados foram pele, linfonodo, baço, fígado, pulmão e rim. 100% dos gatos foram positivos na histopatologia (HP) e imuno-histoquímica (IHQ) de pele.

Dos gatos participantes deste estudo, apenas 1 deles teve representação somente da pele, os outros 24 gatos tiveram os demais órgãos representados. A tabela 4 e o gráfico 2

demonstra a positividade para *Sporothrix* spp. obtidos através de histopatologia e imunohistoquímica, conforme órgão acometido.

Tabela 4 - Resumo de positividade para *Sporothrix* dos órgãos acometidos, através da avaliação de histopatológico e imunohistoquímica.

Órgão	Número de representados	Positivos	% de positividade
Linfonodo mesentérico	24	2	8.33%
Baço	24	2	8.33%
Fígado	24	4	16.67%
Pulmão	24	2	8.33%
Rim	24	0	0
Coração	12	4	33.33%

Fonte: Gonsales (2017).

A diferença entre a quantidade de positividade para *Sporothrix* encontrada entre os diversos órgãos não apresenta diferença significativa ($p < 0,05$).

Gráfico 2 - Positividade para *Sporothrix* dos órgãos acometidos através da avaliação de histopatológico e imunohistoquímica.

Fonte: Gonsales (2017).

Dos 24 gatos com representação de órgãos, 10 (41,67%) apresentaram comprometimento sistêmico com pelo menos 1 órgão comprometido, sendo o de maior frequência o coração (33,33%) – quadro 4.

Quadro 4 - Quadro discriminativo de positividade para *Sporothrix* dos órgãos acometidos, através da avaliação de histopatológico (HP) e imunohistoquímica (IHQ). P = positiva; NEG = negativa; NC = não colhido.

Gato	IHQ Pele	HP Pele	Linfonodo Mesentérico	Baço	Fígado	Pulmão	Rim	Coração
1	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
2	P	P	NEG	NEG	NEG	P	NEG	NEG
3	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
4	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
5	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
6	P	P	NEG	NEG	P	NEG	NEG	P
7	P	P	NEG	P	NEG	NEG	NEG	NEG
8	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
9	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	P
10	P	P	NEG	NEG	P	NEG	NEG	P
11	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
12	P	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	P
13	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
14	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
15	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
16	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
17	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
18	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
19	P	P	NEG	NEG	P	NEG	NEG	NC
20	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
21	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
22	P	P	NEG	NEG	P	NEG	NEG	NC
23	P	P	P	NEG	NEG	P	NEG	NC
24	P	P	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NC
25	P	P	NEG	P	NEG	NEG	NEG	NC

Fonte: Gonsales (2017).

23/25 gatos apresentaram comprometimento de derme profunda e em apenas um gato o comprometimento de derme foi superficial. Quanto ao infiltrado inflamatório, 20% apresentaram infiltrado severo (3+), enquanto a presença de *Sporothrix* spp 64% apresentaram 3+ de estruturas fúngicas. Não houve associação estatística entre intensidade de infiltrado inflamatório e intensidade de *Sporothrix* na pele. Quatro (16%) casos apresentaram colônias bacterianas superficiais na pele segundo a histopatologia (Quadro 5).

Não foi obtido nem concordância, nem associação ou correlação entre os parâmetros avaliados – quantidade de células fúngicas e intensidade de inflamação ($p > 0,05$ – $R^2=0,04$ e Pearson=0,2).

Quadro 5 - Avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório, intensidade da presença de estruturas fúngicas, distribuição da esporotricose e contaminação secundária bacteriana na pele das amostras dos gatos do grupo *Casos* através de histopatológico e imunohistoquímico. + = discreto ++ = moderado +++ = severo.

Pele	Inflamação	Esporo - intensidade	Esporo - distribuição	Bactéria secundária
1	+	+++	Profundo	Não
2	++	+++	Profundo	Não
3	++	++	Profundo	Não
4	++	+	Profundo	Amiloidose
5	+	+	Superficial	Não
6	++	+++	Profundo	Não
7	+++	+++	Profundo	Sim
8	++	+++	Profundo	Não
9	++	+++	Profundo	Não
10	+++	+++	Profundo	Não
11	+	+	Profundo	Não
12	++	++	Profundo	Não
13	+++	+	Profundo	Não
14	++	+++	Profundo	Não
15	++	+++	Profundo	Não
16	++	++	Profundo	Não
17	++	+++	Profundo	Não
18	++	+++	Profundo	Sim
19	+++	+++	Profundo	Não
20	++	+++	Profundo	Não
21	++	+++	Profundo	Sim
22	++	++	Profundo	Sim
23	++	+++	Profundo	Não
24	++	+++	Profundo	Não
25	+++	++	Profundo	Não

Fonte: Gonsales (2017).

Na macroscopia não foi observado aumento de linfonodo regional em nenhum dos casos, por isso os mesmos não foram coletados, somente os mesentéricos.

A análise geral dos casos revelou pulmões com pneumonia intersticial subaguda (13/23, 56,52%), associada a discreta ou moderada congestão, além de edema discreto. Dois casos (2/23 - 8,70%) apresentaram leveduras no interior dos vasos sanguíneos, associado com a pneumonia (Figura 17A) e um destes exibiu infiltrado subpleural de leveduras, associado aos vasos linfáticos. Cristais de colesterol associado a macrófagos espumosos dentro dos alvéolos foram vistos em um dos casos, caracterizando pneumonia lipídica endógena (Figura 17B). A avaliação histopatológica dos linfonodos apresentou moderada hiperplasia linfóide, discreta quantidade de hemossiderina e moderada a marcante plasmocitose e histiocitose medular (Figura 17C). 2/24 (8,33%) linfonodos apresentaram presença de leveduras fúngicas. A histologia esplênica revelou hiperplasia moderada de polpa branca, associada a um plasmocitose e histiocitose de trabéculas esplênicas, além de marcada congestão (Figura 17D), 2/24 (8,33%) casos apresentaram leveduras fúngicas. Os fragmentos hepáticos revelaram discretas áreas de infiltrado inflamatório mononuclear periportais com predomínio de macrófagos e plasmócitos, raros linfócitos, discreta congestão, hemorragia, degeneração

microgoticular e presença discreta de hemossiderina (Figura 17E), 4/24 (16,67%) de fragmentos hepáticos apresentaram leveduras, 3 deles no interior de vasos sinusoidais e um deles afetando o parênquima, caracterizando hepatite sub-aguda. Os rins apresentaram discreto infiltrado inflamatório mononuclear próximo à região cortical e discreta congestão (Figura 17F), não houve comprometimento renal em nenhum dos casos. Todos os casos de pele avaliados apresentaram leveduras de *Sporothrix* spp. intra e extracelulares, associados a infiltrado inflamatório, caracterizado por infiltrado piogranulomatoso de neutrófilos e macrófagos, com intensidade descrita no quadro 5. Todos os animais apresentaram crosta sero-celular, com exsudação de neutrófilos e ocasionalmente de leveduras.

Pontualmente foi amostrado o testículo de um dos gatos necropsiado por apresentar lesão testicular. A análise dos fragmentos cutâneos de bolsa escrotal e testículo revelou intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso, com predomínio de macrófagos, associado à destruição do parênquima testicular, e aglomerados de células leveduriformes (Figura 17 K e L).

Figura 17 - Fotomicrografias de gatos confirmados para esporotricose. (A) pneumonia subaguda, difusa, moderada. (B) Histiocitose alveolar, associado a presença de fendas de colesterol (seta). (C) Hiperplasia de polpa branca em baço. (D) Hiperplasia cortical e paracortical em linfonodo. (E) Infiltrado inflamatório de células mononucleares em espaço porta (seta). (F) discreta congestão renal. (G) Ulceração epidérmica com infiltrado inflamatório misto composto, predominantemente, por neutrófilos íntegros e degenerados e histiócitos. (H) Marcante infiltrado inflamatório dérmico com poucas estruturas leveduriformes (seta). (I) Dermatite subaguda, moderada a marcante, difusa, somado a acantose regular e hiperqueratose ortoqueratótica discreta em epiderme. (J) Abundante quantidade de células fúngicas no interior de macrófagos. (K) Orquite crônica, marcante, com degeneração testicular. (L) Grande quantidade de leveduras (seta) associada a infiltrado inflamatório composto por macrófago, linfócitos e plasmócitos. Magnificação (A-G, I, K) x100; (H, J, L) x400.

Fonte: Instituto Adolfo Lutz (2017).

RESULTADOS - SEGUNDO ESTUDO (b)

6.2 (b) População do estudo

Neste segundo experimento, o grupo *Sintomático* apresentou maior número de machos (62%), enquanto o grupo *Sintomático* apresentou maior número de amostras obtidas de fêmeas (51,43%), no total o número de machos amostrados foi maior (58,52%).

A tabela 5 e o gráfico 3 discriminam a frequência obtida entre machos e fêmeas e o status reprodutivo dos gatos do grupo *Sintomático* e *Assintomático*.

Tabela 5: Frequências obtidas entre machos e fêmeas dos gatos dos grupos *Sintomático* e *Assintomático*.

Grupo	Fêmeas		Machos	
	Gatas	%	Gatos	%
<i>Sintomático</i>	38	38,00%	62	62,00%
<i>Assintomático</i>	18	51,43%	17	48,57%
Total	56		79	

Fonte: Gonsales (2017).

Gráfico 3: Frequências obtidas entre machos e fêmeas dos gatos dos grupos *Sintomático* e *Assintomático*.

Fonte: Gonsales (2017).

Estatisticamente não há diferença entre o número de machos e fêmeas amostrados ($p>0,05$).

O status reprodutivo não foi observado neste estudo. Em relação ao acesso à rua, todos os tutores afirmaram que os gatos possuíam acesso não supervisionado.

6.5 (b) Identificação molecular

As 135 amostras deste estudo foram submetidas à extração de DNA e a reação de PCR para *Sporothrix schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*. 79% das amostras do grupo *Sintomático* foram positivas para *S. brasiliensis*, nenhuma amostra do grupo *Assintomático* foi positiva (Tabela 6). Nenhuma amostra foi positiva para *S. schenckii* ou *S. globosa*.

Tabela 6: Positividade obtidas dos grupos *Sintomático* e *Assintomático* para *S. brasiliensis*.

Grupo	<i>S. brasiliensis</i>	PCR		
		%	Negativo	%
<i>Sintomático</i>	79	79%	21	21%
<i>Assintomático</i>	0	0	35	100%

Fonte: Gonsales (2017).

A positividade detectada de *S. brasiliensis*, no grupo *Sintomático* foi maior do que a detectada no grupo *Assintomático* ($p < 0,0001$). A sensibilidade deste teste foi de 100%, a especificidade de 62,50%, valor preditivo positivo de 79% e valor preditivo negativo de 0%.

O tipo de lesão foi avaliado tanto na detecção de *S. brasiliensis* por PCR, como nos casos em que o tratamento medicamentoso (itraconazol) já tinha sido iniciado.

Tanto para o grupo de PCR positiva quanto para negativa, temos uma maior frequência observada entre o grupo composto por gatos que apresentavam lesões úmidas no momento da colheita de amostragem (74 e 14 respectivamente) - (Tabela 7). Para os casos cujo tratamento já tinha sido iniciado, repete-se a maior ocorrência da lesão úmida, 12 casos dentre os positivos e 9 casos negativos à PCR (Tabela 8).

Tabela 7: Frequência de lesões úmidas e secas e a positividade na PCR para *S. brasiliensis*.

Total de gatos amostrados	PCR positiva para <i>S. brasiliensis</i>			PCR negativa para <i>S. brasiliensis</i>		
	Tipo de lesão	quantidade	%	Tipo de lesão	quantidade	%
88	úmida	74	84,09%	úmida	14	15,91%
12	seca	5	41,67%	seca	7	58,33%

Fonte: Gonsales (2017).

As frequências detectadas entre a detecção de *S. brasiliensis* e a negatividade entre as lesões úmidas e secas apresentou diferença estatística ($p=0,0001$). A frequência mais observada foi de lesões úmidas entre os gatos avaliados, tanto para a PCR positiva como a negativa. Não há diferença entre as frequências observadas em lesões secas, tanto para os gatos cuja a PCR resultou positiva como negativa ($p=0,68$), contudo o “n” amostral desse grupo foi baixo.

Tabela 8: Frequência de lesões úmidas e seca e positividade para *Sporothrix brasiliensis*, para os casos em que o tratamento medicamentoso já tinha sido iniciado no momento da coleta.

Total amostrado	PCR positiva para <i>S. brasiliensis</i> (gatos em tratamento com itraconazol)			PCR negativa para <i>S. brasiliensis</i> (gatos em tratamento com itraconazol)		
	Tipo de lesão	quantidade	%	Tipo de lesão	quantidade	%
21	úmida	12	57,14%	úmida	9	42,87%
3	seca	1	33,33%	seca	2	66,67%

Fonte: Gonsales (2017).

As frequências detectadas entre positividade e negatividade entre as lesões úmidas e secas obtidas de animais que já estavam sob administração para o tratamento da esporotricose, não apresentou diferença estatística ($p>0,05$). O “n” amostral foi baixo para ambos os parâmetros lesionais (lesão úmida ou seca) para detecção do *S. brasiliensis* considerando que o gato já estava sendo medicado no momento da colheita amostral.

Para padronização da técnica, 30 amostras inicialmente foram coletadas (grupo *Sintomático*) no CCZ de Guarulhos, estas amostras já tinham resultado prévio de cultura realizado pelo setor de micologia do Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores do CCZ de São Paulo; os resultados prévios de cultura não foram utilizados para comparação com os resultados obtidos na PCR neste estudo, visto que não foram coletados nem processados no mesmo momento. Após o êxito na padronização da técnica, mais 70 amostras do grupo *Sintomático* e 35 amostras do grupo *Assintomático* foram colhidas, desta vez juntamente com a cultura micológica.

Dentre o grupo *Sintomático*, 51/70 amostras analisadas (65,71%) apresentaram tanto cultura quanto PCR positiva, 8 (11,43%) de resultados negativos tanto para PCR como para o crescimento micológico, 11 (15,71%) somente positividade para PCR e 5 (7,14%) foram positivas no cultivo micológico e negativas à PCR. 77,14% dos resultados foram concordantes entre os dois métodos - duplo positivo e duplo negativo.

Os resultados estão demonstrados na tabela 9 e gráfico 4.

100% das amostras do grupo *Assintomático* foram negativos tanto para PCR quanto para cultura micológica.

Tabela 9: Resultados de positividade e negatividade dos grupos *Sintomático* para PCR e cultura micológica.
+ = positiva; - = negativa

PCR + Cultura +	porcentagem	PCR + Cultura -	porcentagem	PCR - Cultura +	porcentagem	PCR - Cultura -	porcentagem
46	65,71 %	11	15,71%	5	7,14%	8	11,43%

Fonte: Gonsales (2017).

O resultado duplo positivo para os testes micológico e da PCR é extremamente diferente das outras 3 opções apresentadas ($p < 0,0001$); e estes demais resultados entre eles não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$). A concordância Kappa entre os resultados obtidos foi de 35,85% e pabak de 54,28%, logo a concordância é baixa. Com sensibilidade de 90,20% e especificidade de 42,11%.

Gráfico 4: Resultados de positividade e negatividade dos grupos *Sintomático* para PCR e cultura micológica.
+ = positiva; - = negativa

Fonte: Gonsales (2017).

Em relação ao tipo de lesão, início ou não de tratamento no momento da coleta e a frequência de positividade obtida tanto na PCR quanto no isolamento fúngico do grupo *Sintomático*, estão descritas na tabela 10 e gráfico 5.

Tabela 10 - Gatos do grupo *Sintomático* – tipo de lesão, início ou não do tratamento e frequência de positividade para PCR e cultura micológica.

Gato	Tipo de lesão	Tratamento	PCR	Cultura
1	úmida	itraconazol	-	-
2	úmida	itraconazol	-	-
3	úmida	itraconazol	-	-
4	úmida	itraconazol	-	-
5	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
6	seca	não	-	-
7	seca	não	-	-
8	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
9	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
10	úmida	itraconazol	-	-
11	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
12	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
13	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
14	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
15	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	-
16	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
17	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
18	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
19	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
20	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
21	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	+
22	úmida	itraconazol	-	+
23	seca	não	-	+
24	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
25	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
26	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
27	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	+
28	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
29	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
30	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
31	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
32	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	+
33	seca	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
34	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
35	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
36	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
37	seca	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	-
38	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	-
39	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
40	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
41	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
42	úmida	não	-	+
43	úmida	não	-	+
44	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
45	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
46	seca	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
47	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
48	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
49	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
50	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
51	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
52	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
53	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
54	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
55	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
56	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
57	seca	não	-	-
58	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
59	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
60	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	-
61	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
62	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
63	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
64	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
65	seca	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	-
66	seca	itraconazol	-	+
67	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	-
68	úmida	itraconazol	<i>S. brasiliensis</i>	+
69	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
70	úmida	não	<i>S. brasiliensis</i>	+
total	úmida 87,14% (61/70)	tratamento 22,86% (16/70)	<i>S. brasiliensis</i> 81,43% (57/70)	+ 72,86% (51/70)
	seca 12,86% (9/70)	não 77,14% (54/70)	- 18,57% (13/70)	- 27,14% (19/70)

Gráfico 5: Gatos do grupo *Sintomático* - tipo de lesão e início do tratamento, tipo de lesão e sem tratamento no momento da colheita de acordo com frequência de positividade para PCR e isolamento para *S. brasiliensis*.
+ = positivo; - = negativo

Fonte: Gonsales (2017).

Avaliando a frequência global dos resultados analisados neste estudo, foi observada maior frequência em gatos com lesão úmida e que ainda não tinham iniciado o tratamento com itraconazol no momento da colheita amostral. Este resultado pode ser estendido para o duplo positivo de metodologia empregada (PCR e isolamento fúngico), que apresentou maior frequência (89,96%) dos gatos com lesão úmida e sem tratamento, essa frequência foi muito maior do que os demais parâmetros analisados ($p < 0,0001$).

Comparando as demais possibilidades de resultado entre as técnicas de isolamento e PCR. PCR positiva e isolamento negativo ou PCR negativa e isolamento positivo, bem como negativo tanto na PCR como para o isolamento, não houve diferença estatística entre os resultados obtidos ($p > 0,05$).

7 DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose zoonótica subcutânea de implantação, emergente causada por fungos do clado clínico patogênico *Sporothrix schenckii* no qual o gato é um importante reservatório e amplificador da doença (Montenegro, 2014; Rodrigues, 2014b). Neste momento ocorre uma grande epidemia de esporotricose no Brasil (Gremião, 2017).

A epidemia da esporotricose no Rio de Janeiro, por *S. brasiliensis*, iniciou há 20 anos, já em São Paulo, em 2011, houve diagnóstico de gato com esporotricose em Itaquera. Montenegro *et al.* em 2014, após estudo com amostragem obtida por três anos, reportam 163 casos gatos infectados por *S. brasiliensis* na cidade de São Paulo, 10 casos provenientes de Diadema e 17 da cidade de Guarulhos.

No presente estudo as características do perfil do gato acometido pela esporotricose observadas, tanto no primeiro quanto no segundo experimentos realizados, concordam com os relatos de literatura (Boechat, 2018; Pereira, 2014; Otsuka, 2004; Schubach, 2004) que são: (a) gatos domiciliados com acesso à rua, ou que vivem na rua - neste estudo 100% dos gatos participantes possuíam acesso à rua; (b) maior frequência de positividade em gatos machos – obtivemos 56,92% e 62% respectivamente ao primeiro e segundo estudo e ao comparar globalmente as amostras obtidas neste estudo, desconsiderando as estratificações propostas, no total de 254 gatos amostrados, 53,15% eram machos; (c) maior ocorrência de esporotricose em gatos inteiros (gatos não castrados) – somente foi conferido no primeiro estudo, contudo 76,92% dos gatos do grupo *Casos* – grupo cujas lesões apresentadas pelos gatos incluíam a esporotricose como diferencial, eram inteiros (c) não possuem raça definida. 100% dos gatos amostrados neste estudo não apresentaram raça definida.

Esse perfil é consequência das ações e dos hábitos inatos dos gatos. Gatos são animais crepusculares, preferem sair ao final do dia começo da noite para vasculhar o território; por isso os machos e, em especial os inteiros, representam a maior casuística dos gatos doentes por esporotricose. A principal via de transmissão ocorre em decorrência de traumas causados por brigas tanto por disputa de território como por fêmeas no cio. Deste modo, estes gatos podem se tornar portadores saudáveis ou doentes de esporotricose e, portanto, atuam como fonte de infecção para seres humanos e outros animais através de mordedura, arranhadura ou pelo contato com lesões na pele ou na mucosa (Larsson, 1989; Schubach, 2001).

A falta de padrão racial reflete a absoluta maioria da população de animais de rua brasileiros, que não possuem raça definida.

Dentre os hábitos felinos que refletem o risco à esporotricose podemos citar o ato de enterrar seus excrementos, escalar árvores ou afiar suas garras em árvores, favorecendo a contaminação inicial da garra pelo fungo. Os gatos têm garras retráteis e o fungo pode ser mantido superficialmente no corpo do animal (Schubach, 2008; Barros, 2011). Além disso, o hábito dos gatos de se limparem por lambedura pode levar à contaminação da mucosa oral, tornando não só a arranhadura, mas também a mordedura em formas eficazes de implantação profunda do fungo no cutâneo e/ou subcutâneo de outros animais e dos seres humanos (Rodrigues, 2014b).

Em relação aos seres humanos, Barros (2008) relata predominância de mulheres com idade média de 41 anos envolvidas em atividades domésticas. Essas mulheres contraíram a doença duas vezes mais do que os homens. A prevalência de esporotricose foi quatro vezes maior entre os pacientes que cuidavam de animais, independentemente do gênero. Na atual epidemia de esporotricose, cuidar de gatos doentes foi o principal fator associado à transmissão da doença aos seres humanos, o que é coerente, visto que a principal via de transmissão é traumática.

O presente estudo teve como um dos objetivos analisar por meio da cultura fúngica, qual a frequência amostrada dos gatos no município de Guarulhos/São Paulo. No primeiro experimento foi proposto averiguar a positividade em 3 grupos: *Caso* – gatos cuja lesão tecidual tivesse a esporotricose como hipótese de diagnóstico; *Contactante* – gatos hígidos, com convívio com gatos do grupo *Caso* e o terceiro grupo: *Não-Contactantes* – gatos que por resposta dos tutores não tinham contato com gatos do grupo *Caso*.

Deste modo, as amostras coletadas destes três grupos foram entregues no mesmo dia à pesquisadora responsável pela micologia do Laboratório A para serem semeadas, no intuito de minimizar a perda amostral por atraso na semeadura. Das 119 amostras coletadas 24 amostras foram isoladas na cultura para o gênero *Sporothrix* spp; destas, 21 provenientes do grupo *Caso*, duas do grupo *Contactante* e uma do grupo *Não-Contactante*.

A positividade na pesquisa do *Sporothrix* apresentada nesta cultura foi mais baixa do que a esperada. Os 87,5% de positividade encontrada no grupo *Caso* é um valor obtido dentro do total de amostras positivas, contudo ao avaliar a positividade desse grupo isoladamente, temos 40,38% (21 gatos positivos em 52 amostrados). Comparando com as outras técnicas utilizadas neste estudo, temos a sensibilidade entre a citologia em meio líquido por embocado celular com o isolamento fúngico de 46,15%; enquanto que a sensibilidade entre o isolamento com a imunocitoquímica de CB foi de 48,65%.

O número de gatos com esporotricose em Guarulhos é tão alarmante que já é considerada doença de notificação compulsória desde 2016, sendo assim, havia uma expectativa de isolamento mais elevada nos gatos com lesões sugestivas da esporotricose.

Em decorrência da baixa positividade encontrada no Laboratório A e com a ciência de que um segundo laboratório de referência, em paralelo, tinha amostrado no mesmo dia os mesmos gatos do grupo *Caso* e após a autorização dos dois laboratórios, verificamos que a sensibilidade era mais coerente ao utilizarmos os resultados de cultura apresentados pelo Laboratório B. Assim sendo, comparamos este resultado com os outros testes realizados neste estudo, a citologia em meio líquido por embocado celular e imunocitoquímica. Deste modo, obtivemos positividade de 92,31% (48/52) para o isolamento de *Sporothrix* spp e somente 7,69% (4/52) amostras negativas. Ao averiguar os resultados obtidos de CB, imunocitoquímica de CB e isolamento no Laboratório B não houve diferenças estatísticas ($p>0,05$) e a sensibilidade foi de 97,50% entre isolamento do Laboratório B e CB; e de 94,87% entre a imunocitoquímica de CB e a cultura fúngica.

Neste primeiro estudo ainda foi estabelecido um segundo grupo (*Contactantes*) composto por gatos que viviam em contato direto com gatos sintomáticos, porém, sem a presença de lesões cutâneas. O objetivo em verificar se havia o isolamento para *Sporothrix* neste grupo foi principalmente em decorrência do caráter zoonótico que a esporotricose assume e deste modo, se nessa população amostrada haveria ou não portadores sãos. Assim, foram obtidas amostras de mucosa oral, coletadas através de suabe estéril. Dos 39 animais amostrados, dois gatos (5,13%) apresentaram isolamento para *Sporothrix* spp.

Borges *et al.* (2013), buscando isolar *Sporothrix* em gatos assintomáticos, propuseram a colheita de material de garras dos gatos por *imprint*. Esta proposta é interessante visto o hábito dos gatos em afiarem suas garras em troncos de árvores que poderiam estar contaminados por *Sporothrix* e - consequentemente - esta maneira operar como uma via de contaminação inicial com consequente disseminação para outros gatos ou para seres humanos através de arranhadura com a garra contaminada. A positividade deste estudo foi de 0,7% para *Sporothrix* spp (um gato entre 132 amostrados).

No Rio de Janeiro, Schubach *et al.* (2002), também trabalhando com animais assintomáticos e com amostragem obtida através de suabe oral, obtiveram positividade 3,57% (3 gatos positivos de 84 amostrados) e 39,5% (58 gatos positivos de 148 amostrados) de unhas de gatos, para o *Sporothrix* spp. Este grupo de pesquisa, de modo similar ao nosso experimento

(cultura micológica por suabe oral de gatos assintomáticos), obteve uma frequência similar a nossa.

O grupo *Contactantes* não teve amostra coletada e enviada em paralelo para o Laboratório B pois era de interesse somente desse estudo e não da vigilância municipal. De todo modo, houve o isolamento através de suabe oral de gatos assintomáticos na cidade de Guarulhos.

O terceiro grupo de estratificação proposto no primeiro estudo foi o grupo *Não-contactante*, composto por gatos que não tivessem contatos com gatos acometidos pela esporotricose, mas fossem residentes na área endêmica. O objetivo da avaliação deste grupo foi verificar portadores sãos, sem contato com gatos acometidos pela esporotricose. Os gatos que compuseram esse grupo foram ao CCZ de Guarulhos no dia da campanha de castração. Durante a obtenção de amostragem, foi questionado aos tutores sobre a doença (mostrando fotos de gatos sintomáticos e orientando sobre transmissão e prevenção, especialmente enfatizando a importância de restringir o acesso dos gatos à rua) e todos os tutores que negaram conhecimento prévio da doença e de terem visto outro gato com o mesmo sintoma foram incluídos neste grupo.

Do mesmo modo que o grupo *Contactante*, amostras de suabe oral foram colhidas para cultura micológica. Apesar de baixa frequência de isolamento neste grupo (1/28), confirmamos novamente a possibilidade de portadores sãos.

Em se tratando de uma zoonose, a averiguação de gatos sintomáticos e assintomáticos em área endêmica deve ser considerada pela vigilância municipal, visto que os portadores sãos podem ser tornar novas fontes de infecção para seres humanos e outros animais. Vale ressaltar aos colegas veterinários que atuem em áreas endêmicas para esporotricose, que devem ficar atentos ao manipularem gatos, que apresentem ou não lesão, como medida de segurança no intuito de evitar infecção acidental.

Na continuidade dos objetivos propostos neste estudo, ainda no campo da micologia, foi avaliada a sensibilidade aos fármacos das amostras em que houve isolamento para *Sporothrix* spp. Este experimento foi realizado com as cepas isoladas no Laboratório A, conforme as diretrizes do delineamento experimental deste estudo.

Para a avaliação da sensibilidade aos fármacos, as cepas cultivadas não podem apresentar contaminação visto que a presença de outro microorganismo, como por exemplo bactérias, podem interferir e alterar o resultado obtido. Assim, das 24 amostras isoladas na cultura (21 do grupo *Caso*, duas do grupo *Contactante* e uma do grupo *Não contactante*) para

o gênero *Sporothrix*. 16 cepas apresentaram viabilidade para realização dos testes de sensibilidade aos fármacos propostos, sendo estes a microdiluição e o E-Test. As demais amostras foram perdidas no processo de descontaminação. Os antifúngicos empregados na forma p.a., e para determinação da sensibilidade utilizados foram: voriconazol e a terbinafina determinados por microdiluição e os demais fármacos pelo E-Test.

A sensibilidade aos fármacos pode ser utilizada como auxílio na escolha do melhor tratamento a ser administrados aos pacientes infectados.

O medicamento antifúngico de primeira escolha para o tratamento em seres humanos e gatos infectados por *Sporothrix* spp. é o itraconazol. O mecanismo de ação do itraconazol é o mesmo dos outros antifúngicos azóis, ele inibe a síntese fúngica mediada pelo ergosterol, por meio da inibição da enzima 14α -desmetilase de lanosterol (Katzung, 2015) sendo que essa enzima é responsável pelas conversões de lanosterol em ergosterol em fungos (Aftab, 2011).

Embora os pontos de corte não tenham sido estabelecidos para o *Sporothrix*, a CLSI – M38-A2 sugere que, para fins analíticos, fungos filamentosos com MIC $\geq 4,0$ $\mu\text{g/mL}$ podem ser considerados resistentes (Stopiglia, 2013).

Neste estudo, 6,25% (1/16) das amostras apresentaram resistência ao itraconazol - MIC alto (>32), as demais amostras foram sensíveis *in vitro* ao itraconazol. Esta amostra foi isolada do grupo *Contactante*, logo portador são.

Dentre as outras opções terapêuticas para o tratamento da esporotricose, temos: a terbinafina, a anfotericina B, o fluconazol e o voriconazol.

A terbinafina possui inibição do ergosterol como via ação, só que diferentemente dos azólicos, atua sob o esqualeno monooxigenase. A anfotericina B, cuja apresentação farmacêutica pode ser encontrada em forma desoxicolato, lipossomal ou em complexos lipídicos. Ela age ligando-se aos esteróis da membrana celular do fungo, alterando a permeabilidade da membrana e provocando extravasamento de íons monovalentes (K^+ , Na^+ , H^+ e Cl^-) (Bennett, 2012).

Neste estudo, os baixos valores de MIC (concentração mínima inibitória) encontrados para a terbinafina antifúngica estão em concordância com o resultado obtidos por outros estudos (Stopiglia, 2013; Oliveira, 2011; Alvarado-Rodriguez, 2007; Kohler, 2006; Kohler, 2004), bem como para anfotericina B (McGinnis, 2001; Kohler, 2007) e itraconazol (Trilles, 2005; Marimon, 2008).

As altas faixas de MIC de fluconazol (Stopiglia, 2013; Brilhante, 2015) e voriconazol (McGinnis, 2001; Galhardo, 2008) detectadas neste estudo também apresentam equivalência

em resultados obtidos por outros grupos de pesquisa. A resistência ao fluconazol ocorre por meio de mutações no gene *ERG11*, que codifica a 14 α -desmetilase. Essa mutação impede que o medicamento azólico se ligue (Bennett, 2012). A ampla resistência *in vitro* ao fluconazol em isolados clínicos do complexo *S. schenckii* sugere uma resistência intrínseca a este fármaco (Stopiglia, 2013). De todo modo, mesmo considerando a resistência *in vitro*, o fluconazol é considerado o tratamento de segunda linha para a esporotricose (Kauffman, 1996) e há relatos dos veterinários que trabalham no CCZ de Guarulhos que em algumas situações em que o fluconazol foi administrado em gatos com esporotricose houve melhora clínica destes animais, contudo este dado não foi publicado e não houve o acompanhamento do isolamento fúngico e de sensibilidade aos fármacos destes gatos que receberam o fluconazol.

Falta literatura científica referente à eficácia do tratamento com voriconazol para gatos acometidos pela esporotricose. De toda maneira, essa droga possui custo elevado, o que desfavorece a administração em pacientes felinos, visto que muitas vezes os tutores não possuem amplos recursos financeiros para despende com o tratamento.

Apesar da avaliação da sensibilidade aos fármacos, estes estudos foram realizados *in vitro* e quando consideramos o tratamento em gatos, fatores como a imunidade, a extensão e localização das lesões, o score de condição corporal do gato e o acometimento de vias respiratórias (mucosas) pode interferir no tratamento, em tempo e na efetiva cura clínica, mesmo que o gato esteja corretamente sendo medicado. A não resposta ao tratamento com o itraconazol é especialmente observada em casos com acometimento de mucosas nasais, resultando em um período maior de tratamento ou até mesmo a associação com outros fármacos como o iodeto de potássio (Gremião, 2015).

Especialmente em decorrência do caráter zoonótico, é interessante que outros métodos rápidos e confiáveis para o diagnóstico da esporotricose em gatos sejam realizados, contribuindo desta forma não só para o diagnóstico, mas no planejamento de medidas de saúde pública para o controle da doença. Desse modo, este estudo propôs uma metodologia diferenciada de diagnóstico citológico, basicamente com o diferencial do envolvimento do processo histológico para elaboração de lâminas com material mais representativo, com múltiplos *slides* e com a possibilidade de utilizar diversos corantes especial ou mesmo realizar imunocitoquímica destas lâminas.

Citologia em meio líquido por embocado celular (CB) pode ser utilizada em saúde pública, visto que possui baixo custo, e facilmente pode ser adaptada à rotina de laboratório que realize exames de histopatologia. Pode favorecer o diagnóstico da esporotricose em áreas

remotas e de difícil acesso, como por exemplo em municípios distantes de grandes centros urbanos, que por falta de recursos ou infraestrutura não possam realizar o diagnóstico de esporotricose. A obtenção de amostras é simples e não exige treinamento complexo, só uma delicada esfoliação utilizando escova cervical estéril sob a ferida ulcerada do gato, o material é então depositado em um meio líquido conservativo que não necessita de condições térmicas de refrigeração para o acondicionamento e pode aguardar processamento de um a três meses. A amostra somente será processada em laboratório, o que garante uma maior padronização da amostragem com menores erros de processamento.

O CB tem sido utilizado na medicina humana desde meados da década de 1990 e hoje possui amplo campo de utilização, como ferramenta diagnóstica em exames ginecológicos, de urina, de fluído cerebrospinal, em fluidos de lavagens brônquicas e biopsia por aspiração, incluindo de linfonodos (Linder, 1998; Hemel, 2013). O CB consiste na transferência imediata de células colhidas (por esfoliação ou aspiração) em um tubo contendo solução preservativa de citologia em meio líquido (Fernandes, 2015; Arbyn, 2008; Nonogaki, 2004; Ferenczy, 2001; Gupta, 2001) e posterior processamento em bloco de parafina, cortes com micrômetros e preparo das lâminas para leitura.

Previamente propusemos a colheita por dois métodos, primeiro: PAAF e o segundo, esfoliação por escova cervical. O primeiro grupo foi composto por quatro amostras e o segundo por seis amostras e os resultados obtidos foram comparados. Dentre as 10 amostras analisadas as obtidas por PAAF revelaram amostras pouco representativa, sem a turvação adequada do meio no frasco de colheita e somente 50% (2/4) satisfatória, as outras duas amostragens foram insatisfatórias para análise, sendo que dentre os dois casos representativos, um deles exibiu escassa celularidade, insuficiente para a conclusão do diagnóstico. Assim sendo, a técnica de colheita por esfoliação utilizando escova cervical estéril foi o método escolhido para a continuidade deste estudo. Entre as vantagens comparativas da escova cervical estéril pela PAAF, estão: (a) qualidade amostral superior. Com a escova cervical, ao transferir o material para o meio líquido (Surepath, BD), este tornou-se rapidamente e intensamente turvo, obtendo desta maneira, sedimento coeso e densamente celular, permitindo desse modo, a elaboração de diversos cortes histológicos; (b) segurança na colheita. Por causar menor desconforto no gato, foi possível coletar mais de um sítio lesionado sugestivo de esporotricose sem que o gato arranhasse ou mordesse o veterinário que estava coletando a amostra, (c) múltiplas lâminas. Em nosso estudo a média foi de 20 lâminas por amostra, muito superior a lâmina única de PAAF. Maior quantidade de lâminas por amostra permite a

realização de testes complementares como biomoleculares e/ou imunocitoquímica; (d) as lâminas são processadas em laboratório em um método padronizado, reduzindo as variações dependentes do operador em técnica (por exemplo, manipulação de artefatos, e minimizando os resultados insatisfatórios).

Microscopicamente, as lâminas positivas para CB revelaram grupos de leveduras alongadas a redondas que foram positivas para coloração PAS e imunocitoquímica anti-*Sporothrix*.

Neste estudo utilizando a colheita por escova cervical estéril e meio líquido de preservação, somente uma amostra de 40 submetidas à técnica foi insatisfatória para análise e 39 (93%) positivas para esporotricose. Ao submetermos as lâminas à imunocitoquímica, três amostras foram insatisfatórias para diagnóstico, enquanto que 37 (92.5%) lâminas foram positivas para o gênero *Sporothrix*.

Não há diferença estatística entre os valores obtidos no CB e na imunocitoquímica de CB. Neste estudo achamos interessante realizar essas lâminas de imunocitoquímica para não haver dúvidas sobre o agente pesquisado, contudo realmente com treinamento breve, o patologista facilmente consegue realizar a leitura das lâminas de CB e fornecer o diagnóstico rapidamente.

Assim sendo, o isolamento obteve 95% de positividade e o CB 93%, estatisticamente esses valores não são diferentes e desse modo, sugerimos a técnica de citologia em meio líquido por emblocado celular como técnica única ou complementar ao diagnóstico de esporotricose felina. Em termos de custo é praticamente equivalente ao isolamento fúngico; contudo, ao avaliarmos que a esporotricose é um problema de saúde única, o CB pode tornar-se mais interessante por poder ser realizado em larga escala e com maior agilidade de processamento do que a cultura. Laboratórios com grande experiência micológica conseguem liberar resultados positivos em 4 dias de cultivo, contudo, para confirmar os casos negativos deve-se aguardar 30 dias. Já no CB em dois dias há a definição entre positividade e negatividade por indivíduo. Não é sugerido neste trabalho que não seja mais realizada a cultura micológica, contudo, o CB pode e deve ser mais explorado na rotina veterinária.

Alguns aspectos comparativos, tornam mais vantajosa a utilização de CB do que a imunohistoquímica e a histopatológica, visto que, o CB pode ser colhido por um técnico de saúde pública ou veterinário, com breve treinamento, evitando procedimentos invasivos anestésico e custos adicionais para o tutor (Fernandes, 2015). Neste estudo as amostras obtidas para histopatologia e imunohistoquímica vieram de animais submetidos à eutanásia.

O exame histopatológico é um exame importante a se considerar para a esporotricose pois, pode ser uma das ferramentas que auxiliem a elucidar o mecanismo de resposta imune do hospedeiro e do porquê a espécie felina ser tão gravemente afetada, ou até mesmo como ferramenta para a avaliação do desenvolvimento de novos medicamentos. Deste modo, alguns experimentos em modelo murino foram realizados. Com base nestes estudos, sugere-se que as lesões evidenciadas no exame histopatológico variam conforme o estágio da doença. Em resposta a presença do *Sporothrix*, os macrófagos se ativam e diferenciam, formando granulomas (Hiruma, 1988; Miyaji, 1982).

Em relação ao processamento histológico realizado neste estudo, apenas foram amostrados os animais eutanasiados do grupo *Caso* (25 gatos). Os animais sem sinais clínicos do grupo *Contactante* e *Não-Contactante* não foram representados na análise histopatológica. A eutanásia foi realizada nos gatos após a avaliação do médico veterinário do CCZ de Guarulhos e utilizando protocolo estabelecido por essa instituição. 100% dos gatos amostrados foram positivos na HP, IHQ e no CB de pele.

Dos gatos participantes deste estudo, apenas 1 deles teve representação somente da pele. Os outros 24 gatos tiveram amostras colhidas de pele, linfonodo, baço, fígado, pulmão e rim. Na macroscopia não foi observado aumento de linfonodo regional em nenhum dos casos, por isso os mesmos não foram coletados, somente os mesentéricos.

Dentre os achados do processamento histopatológicos, tanto na macroscopia como na microscopia, o órgão mais afetado nos gatos foi a pele. Este dado vai ao encontro com os relatos de literatura (Miranda, 2013; Quintella, 2011; Schubach, 2003). Neste estudo, todos os casos de pele avaliados apresentaram leveduras de *Sporothrix* spp. intra e extracelulares, associados a infiltrado inflamatório, caracterizado por infiltrado piogranulomatoso de neutrófilos e macrófagos, de maneira similar à descrita por Miranda *et al.* (2013) cujo estudo apresentou 94% de detecção para elementos fúngicos na pele. Contudo, no estudo de Quintela *et al.* (2011), 64,7% dos gatos amostrados não apresentavam elementos fúngicos na pele. Todos os animais apresentaram crosta sero-celular, com exsudação de neutrófilos e ocasionalmente de leveduras.

23/25 gatos apresentaram comprometimento de derme profunda e em apenas um gato o comprometimento de derme foi superficial. Quanto ao infiltrado inflamatório, 20% apresentaram infiltrado severo (3+) e 64% apresentaram intensa (3+) quantidade de estruturas fúngicas. Não houve associação estatística entre intensidade de infiltrado inflamatório e intensidade de *Sporothrix* na pele.

Todavia, o grupo de Miranda *et al.* (2013) conseguiu associar infiltrado inflamatório e intensidade de *Sporothrix* na pele; deste modo, observaram uma relação inversa entre intensidade, de leve a moderada, inflamatória (neutrófilos) e altas cargas fúngicas.

Interessante observar que a esporotricose quando acomete os felinos gera predominância de macrófagos nos granulomas, enquanto que nos cães e nos seres humanos o predomínio é de células epitelióides, este fato pode ser um reflexo da susceptibilidade dos gatos frente ao *Sporothrix*, e a relação com a carga fúngica deve ser avaliada (Miranda, 2013).

Morgado *et al.* (2011) afirmam que em seres humanos, a carga fúngica está diretamente associada à intensidade de neutrófilos e que estes apresentam-se em evidência nos pacientes com maior número de lesões e submetidos a tratamentos mais longos.

No presente estudo observou a predominância de neutrófilos e macrófagos nas lesões de pele dos gatos analisados e não foi observada a presença de células epitelióides, semelhante ao resultado obtido e descrito por Miranda (2013). Desta forma, diante da ausência de células epitelióides, o processo ulcera e elimina para o meio externo leveduras, neutrófilos e macrófagos; dificultando a internalização da esporotricose no gato. Os macrófagos não sofrem diferenciação em células epitelióides, demonstrando um padrão clínico diferenciado em gatos em relação ao observado em outros hospedeiros como o homem e o cão.

No presente estudo, 4 (16%) casos apresentaram colônias bacterianas superficiais na pele segundo a histopatologia.

A análise geral dos casos revelou pulmões com pneumonia intersticial subaguda (13/23, 56,52%), associada a discreta a moderada congestão, além de edema discreto. Schubach *et al.* (2003) também descrevem a presença de alguns alvéolos repletos com material eosinofílico amorfo compatível com edema alveolar. Dois casos (2/23 - 8,70%) apresentaram leveduras no interior dos vasos sanguíneos associado com a pneumonia e um destes exibiu infiltrado subpleural de leveduras, associado aos vasos linfáticos. Cristais de colesterol associado a macrófagos espumosos dentro dos alvéolos foram vistos em um dos casos caracterizando pneumonia lipídica endógena. Deste modo, ambos os estudos demonstram processo inflamatório crônico não granulomatoso em pulmão.

A avaliação histopatológica dos linfonodos apresentou moderada hiperplasia linfóide, discreta quantidade de hemossiderina e moderada a marcante plasmocitose e histiocitose medular. 2/24 (8,33%) linfonodos apresentaram presença de leveduras fúngicas não fagocitadas, o que pode sugerir a plasmocitose observada.

A histologia esplênica revelou hiperplasia moderada de polpa branca, associada a um

plasmocitose e histiocitose de trabéculas esplênicas, além de marcada congestão, 2/24 (8,33%) casos apresentaram leveduras fúngicas. Novamente nosso estudo está de acordo com o grupo de Schubach (2003) que descreve microscopicamente o baço dos gatos como congestionado quando acometidos pela esporotricose.

Os fragmentos hepáticos revelaram discretas áreas de infiltrado inflamatório mononuclear periportais com predomínio de macrófagos e plasmócitos, raros linfócitos, discreta congestão, hemorragia, degeneração microgoticular e presença discreta de hemossiderina. 4/24 (16,67%) fígados apresentaram leveduras, 3 deles no interior de vasos sinusoidais e um deles afetando o parênquima, caracterizando hepatite sub-aguda. Deste modo, tanto baço quanto fígado apresentaram reação inflamatória semelhante à descrita nos linfonodos mesentéricos.

Os rins apresentaram discreto infiltrado inflamatório mononuclear próximo à região cortical e discreta congestão, não houve comprometimento renal em nenhum dos casos.

No protocolo inicial não iríamos coletar amostras do coração. No entanto, durante a necropsia foram colhidas amostras de coração de 12 gatos. E o resultado desta análise nos surpreendeu. A maior porcentagem de positividade foi encontrada no coração com 33,33% (4/12), seguido do fígado 16,67% (4/12) e do baço; linfonodo mesentérico e pulmão, todos com 8,33% (2/12). Especulávamos que encontraríamos uma maior positividade no pulmão, visto que os casos mais graves e difíceis de tratar clinicamente incluem lesões cutâneas disseminadas e quadros respiratórios, definitivamente não esperávamos encontrar elementos fúngicos no coração. O grupo de Schubach et al. (2003) avaliou material histopatológico de 10 gatos com esporotricose e não detectou qualquer alteração microscópica em pâncreas, rim ou coração. Contudo, em relação ao coração, este grupo conseguiu o isolamento para *Sporothrix* spp em 5/5 amostras. Este grupo encontrou lesões macroscópicas mais importantes em pulmões e nódulos linfáticos. Nosso estudo também não constatou alteração renal e infelizmente não obtivemos amostras de pâncreas para comparar com esse estudo.

Por fim, dentre as técnicas utilizadas neste trabalho, a biologia molecular foi empregada para a definição de espécie de *Sporothrix*, visto que a cultura micológica consegue definir somente o gênero. Em termos de medidas de controle de saúde pública e notificação, detectar o gênero com rapidez é muito importante, contudo, dentre a virulência apresentada entre as diferentes espécies, é epidemiologicamente fundamental que além da detecção do gênero seja definido a espécie.

A publicação sobre filogenia do *Sporothrix* de Marimon *et al.* (2006) demonstrou a variabilidade genética entre os isolados morfológicamente identificados como *S. schenckii*, propondo desta forma seis espécies: *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. pallida* (Marimon, 2007; 2008). Recentemente, uma nova espécie foi descrita, *S. chilensis* (Rodrigues *et al.*, 2016a).

Das novas espécies estabelecidas cinco são patogênicas: *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu strictu* (*s. str.*), *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. luriei* (Rodrigues, 2013b; Marimon 2008; 2007) e dentre essas espécies a *S. brasiliensis* foi descrita como a mais patogênica e até o momento com distribuição restrita ao Brasil (Marimon, 2007; Rodrigues, 2013b), Della Terra (2017) com modelo murino afirma que *S. brasiliensis* é mais patogênico que *S. schenckii* e *S. globosa*. Deste modo, *S. brasiliensis* é seguida em patogenicidade pela *S. schenckii sensu strictu*, com distribuição mundial, ocorrendo mais frequentemente em países tropicais e subtropicais (Marimon, 2007; Chakrabarti, 2015); *S. globosa* foi descrita na Europa, Ásia e Américas (Marimon, 2007); *S. luriei* raramente é detectada, porém já foi descrita na África (Marimon, 2008). Rodrigues (2016a) afirma que *S. schenckii* e *S. globosa* são patógenos cosmopolitas que geralmente seguem uma via de transmissão ambiental via inoculação traumática de plantas contaminadas. *S. mexicana* foi isolada em três casos seres humanos no Brasil (Rodrigues, 2013a). Apesar de ser descrita como ambiental, *S. chilensis* foi relatada em um caso ser humano (Rodrigues, 2016a).

Deste modo, as 24 amostras isoladas em cultura fúngica do primeiro estudo (utilizamos as amostras provenientes da cultura do NPQ - Lutz, visto que após alguns meses nem todas as cepas amostradas no CCZ de SP ficam armazenadas) foram submetidas a PCR. 100% das amostras foram positivas para *S. brasiliensis*. Concordando com a publicação de Montenegro *et al.* (2014), que detectaram amostras positivas para *S. brasiliensis* em 17 gatos amostrados na mesma região de Guarulhos.

O segundo experimento de PCR foi proposto com dois intuitos. O primeiro foi comparar a técnica de PCR e a cultura micológica, questionando se apesar da cultura ser o padrão ouro, o diagnóstico direto da lesão por PCR poderia ser uma opção; especialmente para clínicas privadas, cujos tutores tem possibilidade de arcar com o custo do exame e em geral preferem o resultado diagnóstico mais rápido. O segundo objetivo deste estudo foi comparar para as variáveis de lesão apresentadas por gatos suspeitos de esporotricose, seca ou úmida; bem como se ter iniciado ou não o tratamento com o itraconazol iria interferir na detecção por PCR e/ou com o isolamento em cultura.

Deste modo, foram analisadas 135 amostras, divididas em dois grupos: 100 gatos *Sintomático*, amostras colhidas de lesões de pele e 35 *Assintomáticos*, cujas amostras foram colhidas através de suabe estéril da cavidade oral. 79% das amostras foram positivas para *S. brasiliensis* dentre os gatos do grupo *Sintomático* e não foi obtida nenhuma amostra para a esporotricose no grupo *Assintomático*. Todas as 135 amostras foram submetidas à reação de PCR para *S. globosa* e *S. schenckii s. str.*, sem nenhum resultado positivo para essas espécies.

A sensibilidade da PCR foi de 100% e a especificidade de 62,50%. Deste modo, podemos considerar que em áreas onde a frequência da esporotricose é alta, a PCR direto da lesão pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica, devido a alta sensibilidade. Contudo em áreas cuja frequência da esporotricose é baixa, deve-se utilizar o padrão ouro que é a cultura micológica para identificação do gênero e a PCR deve ser realizada nas amostras cuja isolamento for obtido.

Clinicamente a esporotricose apresenta-se como pápulo-nodular ou ulcero gomosa (Larsson, 2011). Neste estudo, a diferença entre o tipo de lesão – seca ou úmida, foi significativa a maioria nos gatos que apresentaram lesões úmidas (ulceradas) tanto na PCR positiva como na negativa (74 e 14 respectivamente) do que de lesões secas. Assim, a frequência de detecção de *S. brasiliensis* em gatos que apresentaram lesão úmida foi de 84,09%, já para lesão seca foi em torno de 50%. Para as lesões secas não houve diferença estatística entre os gatos com resultado positivo e negativo à PCR, porém deve-se considerar que o “n” amostral das lesões secas foi baixo, e a não diferença talvez seja decorrente disto. Logo, o tipo de lesão interfere na PCR e a lesão seca apresenta maior número de casos negativos do que a úmida.

Para os casos cujo tratamento já tinha sido iniciado, repete-se a maior ocorrência da lesão úmida, 12 (57,14%) casos dentre os positivos e 9 (42,87%) casos negativos à PCR. Não houve diferença entre as frequências observadas em lesões secas, tanto para os gatos cuja a PCR resultou positiva como negativa ($p=0,68$), bem como para a avaliação com o parâmetro de tipo lesional. O “n” amostral foi baixo para ambos os parâmetros. E ao comparar a somatória tanto de gatos positivos à PCR como os negativos, novamente não demonstra diferença estatística, ou seja: para os gatos que já estejam sob efeito do itraconazol a PCR não é uma ferramenta diagnóstica confiável.

Após o êxito na padronização da técnica, mais 70 amostras do grupo *Sintomático* e 35 amostras do grupo *Assintomático* foram colhidas, desta vez juntamente com a cultura micológica. Dentre o grupo *Sintomático*, 51/70 amostras analisadas (65,71%) apresentaram

tanto cultura quanto PCR positiva, 8 (11,43%) de resultados negativos tanto para PCR como para o crescimento micológico, 11 (15,71%) somente positividade para PCR e 5 (7,14%) foram positivas no cultivo micológico e negativas à PCR. 77,14% dos resultados foram concordantes entre os dois métodos - duplo positivo e duplo negativo. 100% das amostras do grupo *Assintomático* foram negativos tanto para PCR quanto para cultura micológica.

Comparada a PCR de lesão direta com o padrão ouro, o isolamento fúngico, foi obtido sensibilidade de 90,20% e a especificidade de 42,11%. Deste modo, a conclusão obtida sob análise do emprego da técnica de PCR de lesão direta para diagnóstico da esporotricose é reafirmado, sendo assim: em áreas onde a frequência da esporotricose é alta, a PCR direto da lesão pode ser utilizada como ferramenta diagnóstica, devido à alta sensibilidade. Contudo em áreas cuja frequência da esporotricose é baixa, deve-se utilizar o padrão ouro que é a cultura micológica para identificação do gênero e a PCR deve ser realizada nas amostras cuja isolamento for obtido.

Analizando os resultados obtidos entre PCR positiva e cultura positiva tanto em relação ao tipo de lesão como ter iniciado ou não o tratamento no momento da colheita, observou-se maior frequência de detecção e isolamento entre os gatos cujas lesões eram úmidas e não tinham iniciado o tratamento ($p < 0,0001$). Esta análise repete-se tanto para a avaliação geral dos resultados obtidos como para os gatos onde houve detecção de *S. brasiliensis* e isolamento de *Sporothrix* spp.

Para os demais resultados possíveis, positividade só na PCR ou só na cultura ou duplo negativo – para PCR e cultura, não houve diferença estatística ($p > 0,05$). E esse resultado reflete uma concordância entre os resultados obtidos.

Deste modo, pode-se concluir que os parâmetros tipo de lesão e ter iniciado ou não o tratamento, resulta em interferência do resultado nos casos em que houve detecção do *S. brasiliensis* bem como do isolamento para *Sporothrix* spp, considerando deste modo que a lesão seca e o início da administração do itraconazol são os índices que interferem tanto no isolamento quanto na detecção do fungo. Já para as demais possibilidades de resultados, as frequências observadas não são influenciadas pelo tipo de lesão e se o tratamento já tinha sido iniciado ou não no momento da colheita, porém deve-se realçar que o “n” amostral destas estratificações foi baixo e talvez com um número amostral maior os resultados pudessem apresentar diferença.

A vigilância do CCZ do município de Guarulhos possui um grande mapa da cidade onde marca os casos de esporotricose. Esses casos são notificados ao CCZ pelo próprio

trabalho de busca ativa e divulgação da doença pelos agentes de saúde e pelos médicos veterinários que são responsáveis pelo trabalho com esporotricose. Com o tempo de trabalho e informando a população, o número de chamados dos munícipes vem aumentando progressivamente. Muitos tutores são informados por vizinhos e amigos e passam a informação adiante.

Deste modo, as áreas de maior casuística de esporotricose felina da cidade de Guarulhos são as áreas mais carentes. Muitas vezes as áreas de invasão de terrenos de mata com grande precariedade nas casas construídas e falta absoluta de saneamento básico são ambientes propícios para propagação da doença.

No geral, os munícipes recebem muito bem os agentes de saúde e os veterinários que orientam sobre a epidemiologia da doença, o risco zoonótico, coletam material para diagnóstico e após esclarecimento e comprometimento dos tutores, disponibilizam o medicamento (itraconazol) para o tratamento felino, orientando que o ideal não é forçar a medicação via oral, como frequentemente recomenda-se em tratamentos na medicina veterinária, e sim deixar o animal com fome (retirando o acesso a comida no final do dia) e na manhã seguinte, abrir o conteúdo da cápsula e misturar em ração úmida atrativa para que o gato tome a medicação com menor risco de trauma do tutor. As visitas ocorrem em torno de 40 dias para acompanhamento dos animais.

Os tutores são orientados caso notem feridas suspeitas de esporotricose em seres humanos que busquem auxílio na UBS (Unidade Básica de Saúde) mais próxima ou no hospital Emílio Ribas, que possui duas vezes por semana, ambulatório para atendimento de seres humanos suspeitos de esporotricose. O Emílio Ribas coleta biopsia para diagnóstico e fornece gratuitamente o itraconazol para os seres humanos que necessitem do tratamento.

Os tutores que tem disponibilidade em levar os gatos suspeitos ao CCZ conseguem atendimento mais rápido. Vale ressaltar que atendimento ao público é diário e em horário comercial.

Dentre as medidas de controle da esporotricose empregadas pelo CCZ de Guarulhos estão também o recolhimento dos cadáveres de gatos que vieram a óbito para evitar que contaminem o solo, apreensão de gatos errantes, prioridade na esterilização dos gatos no programa de castração já existente no CCZ de Guarulhos (assim que clinicamente os gatos estejam aptos a serem submetidos ao procedimento) e a prioridade inclui a busca do gato pela viatura do CCZ quando o tutor não tem condições de levar o gato até o CCZ.

O número de casos em gatos e seres humanos tem crescido tanto que a doença se tornou de notificação compulsória pela portaria nº. 064/2016, publicado no Diário Oficial do Município em 27 de Julho de 2016. A medida é mais um empenho para que os clínicos particulares que suspeitem de esporotricose em seus pacientes notifiquem o CCZ e com isso auxilie no mapeamento da disseminação da doença.

O trabalho dos responsáveis pelo controle da esporotricose no CCZ de Guarulhos, vale dizer, é admirável. É um serviço público que está atuante em uma área de foco da doença que se dissemina com velocidade e que está com uma visão clara que a educação é a melhor forma de controle da doença. Temer que os tutores ao saberem que se trata de uma zoonose e por causa disso possam querer submeter os gatos à eutanásia em massa, ou gerar pânico, não é o que ocorre. Os tutores ficam realmente felizes com a atenção dos agentes e as orientações e ao compreenderem que é possível sim tratar, a maioria opta em medicar o gato. Caso o tutor não possa por algum problema de saúde ou por não poder correr o risco de exposição da doença ou pelo comportamento irascível do gato ao tratamento, pode solicitar a eutanásia, que será avaliada pelo médico veterinário do CCZ de Guarulhos que após avaliação irá definir se o procedimento deve ou não ser realizado.

Minha opinião pessoal, de quem acompanhou a rotina dos funcionários do CCZ de Guarulhos, é de que a maneira como estão sendo conduzidas as medidas de prevenção e controle da epidemia são muito boas. As pessoas têm o direito à informação e a decisão de tratar ou não os seus animais e o conhecimento gera colaboração e não histeria em massa. Do que eu pude observar durante as colheitas é que são pessoas muito sofredas e que ficam gratas por alguém se preocupar com elas e com seus gatos. A maioria, apesar de ter o felino para controle de roedores, possui afeto pelo gato e apesar de não terem condições de adquirir o medicamento, quando recebe gratuitamente do município, colabora e trata o animal.

A esporotricose é sim uma doença negligenciada, apesar de ainda não constar da lista da OMS (organização mundial de saúde) como tal. O peso e o impacto médico das doenças fúngicas são amplamente desconhecidos e muitas vezes subestimados, especialmente quando se trata de infecções fúngicas endêmicas (Rodrigues, 2014a). As espécies de *Sporothrix* ocorrem frequentemente sob a forma de surtos, com diferenças fundamentais entre as fontes de surtos, as interações hospedeiro-ambiente são fatores clássicos determinantes para o risco de aquisição da doença e as medidas de saúde pública devem mudar de acordo com as características apresentadas (Rodrigues, 2014a).

Deste modo, observar e analisar a epidemia no Rio de Janeiro é imprescindível, visto

que a doença aflige a população urbana há 20 anos. Há muitas publicações, em especial do Instituto Nacional de Infectologia da Fundação Oswaldo Cruz, não somente sobre epidemiologia, histopatologia, tratamentos, mas também como sugestões de medidas de controle da esporotricose. Dentre estes, Barros (2011) lista alguns problemas e entre as estratégias de soluções é possível destacar: (a) normatização das ações de prevenção, diagnóstico e tratamento da epidemia; (b) implementação de programa de controle nos centros de zoonoses dos municípios de ocorrência de casos; (c) estabelecer fluxo para cremação gratuita dos corpos dos animais mortos com esporotricose; (d) oferta de castração gratuita nas unidades de atendimento veterinário; (e) adequação de espaços, preferencialmente anexos a centros de saúde nos municípios com maior incidência de esporotricose, que funcionariam como sentinelas para o atendimento de animais; (f) estruturas de unidades volantes para o atendimento dos animais doentes em municípios sem programas de controle de zoonoses; (g) divulgação nas unidades de saúde de medidas preventivas e de controle da esporotricose humana e animal através de cartazes, folhetos e de outras ações informativas de acordo com o planejamento do município; (h) iniciativas de desenvolvimento da vacina antifúngica animal.

Com base na grande experiência do INI/FIOCRUZ RJ, o CCZ de Guarulhos se não adotou 100% das medidas sugeridas, adaptou e adotou as mais relevantes na tentativa de controle e prevenção da esporotricose no município. Outro aspecto importantíssimo para o controle, é a cooperação e comunicação entre os municípios, especialmente os que fazem divisa com a cidade que apresenta o surto.

Dos aspectos de prevenção e controle instituídos pelo CCZ de Guarulhos o destaque no trabalho de divulgação da informação aos tutores é fundamental. A compreensão da pessoa responsável pelo gato, não somente medicando conforme a prescrição do veterinário, mas esterilizando o animal, orientando ao tutor que o gato não tem necessidade de ter crias, que a castração não apresenta efeitos nocivos, especialmente quando não se tem novos tutores em vista e o destino dos filhotes será o abandono. O aspecto mais difícil de todos ainda é convencer o tutor que o gato não deve ter acesso à rua, mesmo que o gato “adore passear e fazer novos amigos”, visto que é uma das principais maneiras de fonte de infecção para outros gatos.

Apesar do hábito felino de sair especialmente no período noturnos, os gatos têm que permanecer confinados em suas residências. Esse aspecto não é importante somente em termos da saúde dos gatos, mas a esporotricose é um problema de saúde única, de saúde pública. Não

conter o seu animal é dar o aval para que mais gatos sejam infectados e potencialmente novos seres humanos também pelo contato com seus animais.

Em vista dos dados apresentados e do crescente número de casos seres humanos e de gatos infectados, mais estudos devem ser realizados para a melhor compreensão da afecção e para averiguação da eficácia das medidas de controle instituídas e sugestão de novas medidas, visando o controle da esporotricose dos centros urbanos. E para isso não só é necessária a atuação dos CCZs, mas as universidades e os institutos de pesquisa, tem papel fundamental no combate à esporotricose.

8 CONCLUSÃO

A esporotricose nos últimos 20 anos apresentou importantes mudanças na epidemiologia, taxonomia e na relação hospedeiro-patógeno. As dificuldades apresentadas em controle e tratamento de pacientes humanos e felinos é um ponto crítico da afecção. Os surtos em centros urbanos transformaram a visão da doença do jardineiro das rosas para um problema de saúde pública. Os resultados deste estudo, são relevantes visto que os gatos têm papel fundamental na transmissão fúngica, sendo necessário traçar um perfil epidemiológico dos gatos nas áreas afetadas, bem como discutir métodos diagnósticos que auxiliem de maneira rápida e eficiente a esporotricose.

Após a análise dos resultados podemos concluir que 92,31% dos animais suspeitos para esporotricose foram confirmados pelo isolamento fúngico, logo o diagnóstico clínico em área endêmica e o laboratorial são eficientes. A presença de *Sporothrix* na mucosa oral dos gatos assintomáticos ocorre em baixa frequência, contudo deve ser levada em conta visto o caráter zoonótico da esporotricose. Todas as amostras submetidas à PCR confirmaram *Sporothrix brasiliensis*.

O método proposto de citologia em meio líquido por embocado celular, apresentou elevada sensibilidade e pode ser utilizado como método diagnóstico para a esporotricose em gatos, principalmente em áreas endêmicas.

Neste estudo, a investigação da susceptibilidade dos isolados aos fármacos, tanto para os baixos valores de MIC (concentração mínima inibitória) encontrados para a terbinafina, anfotericina B e o itraconazol, como para as altas faixas de MIC de fluconazol e voriconazol estão em concordância com o resultado obtidos por outros grupos de pesquisa.

A PCR de lesão direta pode ser utilizada para diagnóstico na cidade de Guarulhos, bem como em áreas cuja frequência da doença é alta. Visto que a técnica possui sensibilidade diagnóstica elevada. Contudo em áreas de baixa frequência da esporotricose, recomenda-se o emprego do padrão ouro que é a cultura micológica para pesquisa de *Sporothrix* spp e com a realização da PCR para as amostras cuja isolamento for obtido. As variáveis de tipo de lesão e início do tratamento interferem no resultado diagnóstico de PCR direto da lesão.

As investigações sob os campos da genômica, como bem na relação parasito-hospedeiro, com em terapêutica devem ser intensificadas entre os diversos grupos de pesquisa, para que no futuro possamos ter uma perspectiva menos alarmante da doença e as autoridades consigam aprimorar os programas de vigilância e controle.

9 REFERÊNCIAS

- . Aftab BT, Dobromilskaya I, Liu JO, Rudim CM. Itraconazol Inhibits Angiogenesis and Tumor Growth in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*. 2011. 21:6764-6772. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0691.
- . Aguirre K, Crowe J, Haas. Resistance to *Cryptococcus neoformans* infection in the absence of CD4+ T cells. *Med Mycol*. 2004. 42: 15–25.
- . Almeida Paes R, Armorim Pimenta M, Monteiro PC, et al. Immuno- globulins G, M and A against *Sporothrix schenckii* exoantigens in patients with sporotrichosis before and during treatment with itraconazole. *Clin Vaccine Immunol*. 2007. (14):1149-57.
- . Alvarado-Rodriguez E, Torres-Rodriguez JM. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. (51): 2420–2423.
- . Arbyn M, Bergeron C, Klinkhamer P, Martin-Hirsch P, Siebers AG and Bulten J. Liquid compared with conventional cervical cytology: a systematic review and meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology* 2008. 111: 167 – 177.
- . Barros MBL, Schubach AO, Do Valle ACF, Galhardo MCG, Conceição-Silva F, Schubach TMP, Reis RS, Wanke B, Marzochi KBF, Conceição MJ: Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clin Infect Dis*. 2004. 38:529–535.
- . Barros MBL, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*. 2008. 136:1192–1196.
- . Barros MBDL, Schubach TP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica* [Internet]. 2010. 27(6):455–60. Available from: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892010000600007

- . Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. 24(4):633–54.
- . Bennett JE. Antifungal Agents. In L.L. Brunton BA, Chabner BC, Knollmann. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 2012. 12 edição.
- . Boechat JS, Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gremião IDF, Machado ACS, Oliveira RVC, Figueiredo ABF, Rabello VBS, Silva KBL, Zancopé-Oliveira RM, Schubach TMP, Pereira SA. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2018. 113(3):185-196. doi: 10.1590/0074-02760170407.
- . Borges TS, Rossi CN, Fedullo JD, Taborda CP, Larsson CE: Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). *Mycopathol*. 2013. 176:129–137.
- . Bove-Sevilla PM, Mayorga-Rodríguez J, Hernández-Hernández O. Sporotrichosis transmitted by a domestic cat. Case report. *Med Cutan Iber Lat Am*. 2008. 36(1):33–35. Em espanhol.
- . Brilhante RSN, Rodrigues AM, Sidrim JJC, Rocha MFG, Pereira SA, Gremião IDF. In vitro susceptibility of antifungal drugs against *Sporothrix brasiliensis* recovered from cats with sporotrichosis in Brazil. *Med Mycol*. 2016. 54(3):275–9.
- . Carlos IZ, Sassá MF, da Graca Sgarbi DB. Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2009. (168):1-10.
- . Chakrabati A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015. 53(1):3-14. doi: 10.1093/mmy/myu062. Epub 2014 Dec 19.
- . Córdoba S, Isla G, Szusz W, Vivot W, Hevia A, Davel G, Canteros CE. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii sensu lato* isolated in Argentina. *Mycoses*. 2018. doi: 10.1111/myc.12760
- . Dangerfield LF, Gear J. Sporotrichosis among miners on the Witwatersrand gold mines. *SA Medical Journal*. 1941. 128–131.

- . de Beer ZW, Harrington TC, Vismer HF, Wingfield BD, Wingfield MJ. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras*–*Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. 2003. 95: 434-441.
- . de Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Attili Angelis D, Gerrits Van Den Ende a H, et al. Black fungi: clinical and pathogenic approaches. *Med Mycol*. 2000. 38 (1):243–50.
- . Della Terra PP, Rodrigues AM, Fernandes GF, Nishikaku AS, Burger E, de Camargo ZP. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *Plos Negl Trop Dis*. 2017. 11(8):e0005903. doi: 10.1371/journal.pntd.0005903.
- . Fernandes GF, Lopes-Bezerra LM, Bernardes-Engemann AR et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Vet Microbiol*. 2011. 147: 445–449.
- . Fernandes KS, Neto EH, Brito MMS. Experimental role of endogenous nitric oxide in host defense against *S. schenckii*. *Immunology*. 2008. (123):469-79.
- . Fernandes NCCA, Guerra JM, Réssio RA, Wasques DG, Etlinger-Colonelli, Lorente DS, Nogueira E, Dagli MLZ. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. *Vet Comp Onco*. 2015. 14: 107-116. doi: 10.1111/vco.12137
- . Ferenczy A and Franco E. Cervical-cancer screening beyond the year 2000. *Lancet*. 2001. 2: 27-32.
- . Flores-Garcia A, Velarde-Felix JS, Garibaldi-Becerra V. Recombinant murine IL-12 promotes a protective Th1/cellular response in Mongolian gerbils infected with *Sporothrix schenckii*. *J Chemother*. 2015. 27: 87–93.
- . Freitas DC, Migliano MF, Zani Neto L. Sporotrichosis. Observation of spontaneous case in domestic cat (*Felis catus*). *Rev Fac Med Vet Univ Sao Paulo*. 1956. 5: 601-604

- . Galhardo MCG, De Oliveira RMZ, Do Valle ACF, De Almeida Paes R, Silva 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(2):141–51.
- . Gonzalez Cabo JF, de las Heras Guillamon M, Latre Cequiél MV, Garcia de Jalon Ciercoles JA. Feline sporotrichosis: a case report. *Mycopathol*. 1989. 108(3):149–154. PMID: 2615803
- . Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, Rodrigues AM, Honse CO, Barros MBL. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J*. 2011. 89: 346–351.
- . Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, Figueiredo ABF, Cavalcanti MCH, Pereira SA. Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol*. 2014. 53(1):15–21.
- . Gremião ID, Miranda LH, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog*. 2017. 13(1):e1006077. doi: 10.1371/journal.ppat.1006077.
- . Gupta PK, Baloch ZW, Cobbs C and Bibbo M. Processing liquid-based gynecologic specimens: comparison of the available techniques. *Acta Cytologica*. 2001. 45: 995 – 998.
- . Helm MAF, Berman C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. In: Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers' Association, Dec 1944. Johannesburg, South Africa: The Transvaal Chamber of Mines. 1947. 59–67.
- . Hemel BM, Suurmeijer JH. Effective application of the methanol-based Preservcyt fixative and the Cellient automated cell block processor to diagnostic cytopathology, immunocytochemistry and molecular biology. *Diagnostic Cytopathology*. 2013. 41: 734 – 741.
- . Hirano M, Watanabe K, Murakami M, Kano R, Yanai T, Yamazoe K. A case of feline sporotrichosis. *J Vet Med Sci*. 2006. 68(3):283–284. PMID: 16598175.

- . Hiruma M, Yamaji K, Shimizu H, Ohata H, Kukita A. Ultrastructural study of tissue reaction of mice against *Sporothrix schenckii* infection. *Arch. Dermatol. Res.* 1988. 280(Suppl.):94–100.
- . Ishizaki H, Kawasaki M, Anzawa K. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2009. 50: 19–26.
- . Itoh M, Okamoto S. Survey of 200 cases of Sporotrichosis. *Dermatologica.* 1986. 172:209–13.
- . Katzung & Trevor. Pharmacology Examination & Board Review. McGraw Hill. 2015. 397
- . Kauffman CA, Pappas PG, McKinsey DS et al. Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 46–50.
- . Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis.* 1999. (29):231–237.
- . Kohler LM, Fialho 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.
- . Kohler LM, Soares BM, Santos D, Barros ME, Hamdan JS. In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. *Can J Microbiol.* 2006. 52(9):843–7.
- . Kohler LM, Hamdan JS, Ferrari TCA. Successful treatment of a disseminated *Sporothrix schenckii* infection and in vitro analysis for antifungal susceptibility testing. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2007. 58(1):117–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0732889306004305>
- . Kong X, Xiao T, Lin J. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect.* 2006. (12):1077-81.
- . Larsson CE, Gonçalves MA, Araujo VC, Dagli MLZ, Correa B, Fava-Neto C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos. *Rev Inst Med Trop.* 1989. 31:351–8.

- . Larsson, CE. Esporotricose. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 2011. 48(3): 250-259.
- . Linder J. Recent advances in thin-layer cytology. *Diagnostic Cytopathology*. 1998. 18: 24 – 32.
- . Lutz DA, Splendore A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. *Rev Médica São Paulo*. 1907. 21:433–50.
- . Mackay BM, Menrath VH, Ridley MF, Kellym WR. Sporotrichosis in a cat. *Aust Vet Practit.* 1986. 16(1):3–5.
- . Mackinnon J, Conti-Diaz I GE. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia*. 1969. 7:38–45.
- . Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M, Meireles M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: Clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses Public Health*. 2010. 57: 151- 154.
- . Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Oliveira Nobre M, Meireles MCA. Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: A description of 103 cases in cats and dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*. 2012. 173:265–273.
- . Maia DC, Sassá MF, Placeres MC, et al. Influence of Th1/Th2 cytokines and nitric oxide in murine systemic infection induced by *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 2006. (161):11-9.
- . Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, Dos Santos Lazéra M, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J Clin Microbiol*. 2006. 44(9):3251–6. PMID: 16954256
- . Marimon R, Cano J, Gené 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, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008. 52(2):732–4.

- . McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol* [Internet]. 2001. 39(4):369–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556767>
- . Mehta KIS, Sharma NL, Kanga AK, Mahajan VK, Ranjan N. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. *Mycoses*. 2007. 50: 496– 501. doi:10.1111/j.1439-0507.2007.014.
- . Miyaji M, Nishimura K. Defensive role of granuloma against *Sporothrix schenckii* infection. *Mycopathol*. 1982. 80:117–124.
- . Miranda LH, Conceicao-Silva F, Quintella LP, Kuraie BP, Pereira SA, Schubach TMP. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013. 36: 425–432.
- . Miranda LHM, Santiago MA, Schubach TM, Morgado FN, Pereira SA, Oliveira RCV, Conceição-Silva F. Severe feline sporotrichosis associated with an increased population of CD8^{low} cells and a decrease in CD4+ cells. *Med Mycol*. 2016. 54: 29–39.
- . Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res* [Internet]. 2014.10:269. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4244058&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- . Moreira JA, Freitas FS, Lamas CC. The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review. *Infection*. 2015. 43: 267–76.
- . Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The *in situ* inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. *Med. Mycol*. 2011. 49(6):612–20.
- . Morrison AS, Lockhart SR, Bromley JG, Kim JY, Burd EM. An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. *Med Mycol Case Rep*. 2013. (2):88–90.

- . Nobre MO. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Rev Iberoam Micol.* 2001. (18):137-140.
- . Nonogaki S, Wakamatsu A, Longatto-Filho A, Pereira SMM, Utagawa ML, Alves VAF, *et al.* Hybrid capture II and polymerase chain reaction for identifying HPV infection in samples collected in a new collection medium. *Acta Cytologica.* 2004. 48: 514 – 520.
- . Noriega CT, Garay RR, Sabanero G, Basurto RT, Sabanero- Lopez M. *Sporothrix schenckii*: cultures in different soils. *Rev Latinoam Micol.* 1993. 35:191–194
- . Oliveira DC, Lopes PG, Spader TB. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2011. (49): 3047–3049.
- . Oliveira MM, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancope-Oliveira RM: Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013, 108:936–938.
- . Otsuka M, Larsson CE. Sporotrichosis in São Paulo (Brazil): clinical and epidemiological features. *Vet Dermatol.* 2004.15:46.
- . Padhye AA, Kaufman L, Durry E *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. *J Clin Microbiol.* 1992. 30: 2492–2494.
- . Pereira SA, Passos SR, Silva JN *et al.* Response to azolic anti-fungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec.* 2010. 166: 290–294.
- . Pereira SA, Menezes RC, Gremião ID, Silva JN, Honse CO, Figueiredo FB. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg.* 2011. 13:220-223.
- . Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, 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):392–3.
- . Pijper A, Pullinger BD. An outbreak of sporotrichosis among South African native miners. *The Lancet* 1927; 210: 914–916.
- . Powell KE, Taylor A, Phillips BJ, Blakey DL, Campbell GD, Kaufman L, *et al.* Cutaneous sporotrichosis in forestry workers. Epidemic due to contaminated Sphagnum moss. *Jama.* 1978. 240(3):232–5.
- . Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR. Subcutaneous mycoses. *Infect Dis Clin North Am.* 2003. 17: 59–85.

- . Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, Caceres DH, Pasqualotto AC. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect Dis*. 2017. (11): e367-e377. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30306-7.
- . Quintella LP, Passos SR, do Vale AC, Galhardo MC, Barros MB, Cuzzi T. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011. 38(1):25–32.
- . Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993. 16(3):384–387. pmid:8095815
- . Rees RK, Swartzberg JE. Feline-transmitted sporotrichosis: A case study from California. *Dermatol Online J*. 2011. 17(6):2. pmid:21696682
- . Reis EG, Gremião IDF, Kitada AAB et al. Potassium iodide capsule in the treatment of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg*. 2012. 14: 399–404.
- . Rippon J. Sporotrichosis. In: Rippon J, editor. *Medical Micology – The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. 1988. 325-352.
- . Rodrigues AM, de Hoog S, de Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol* [Internet]. 2013a;51(4):405–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22989196>
- . Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira SA, Fernandes GF, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013b;7(6).
- . Rodrigues AM, de Hoog Gs, Zhang Y, de Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2014a;3(5):e32. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/emi.2014.33>
- . Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. Elsevier Inc.; 2014b;78(4):383–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004>
- . Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol*. 2015a;1–19.
- . Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015b;9(12):1–22.

- . Rodrigues AM, Choappa RC, Fernandes GF, de Hoog GS, Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.* 2016a; 120(2): 246-64.
- . Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathog.* 2016b; 12(7):e1005638. doi: 10.1371/ journal.ppat.1005638 PMID: 27415796
- . Ruiz-Baca E, Toriello C, Perez-Torres A, et al. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDz from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. *Med Mycol.* 2009. (47):185-96.
- . Sanchotene KO, Madrid IM, Klafke GB, Bergamashi M, Terra PP Della, Rodrigues AM, et al. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses.* 2015;58(11):652–8.
- . Schenck BR. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1898. 9: 286-290.
- . Scheufen S, Strommer S, Weisenborn J, Prenger-Berninghoff E, Thom N, Bauer N, et al. Clinical manifestation of an amelanotic *Sporothrix schenckii* complex isolate in a cat in Germany. *JMM Case Rep.* 2015. 2(4).
- . Schubach A, Schubach TM, Barros MB, Wanke B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2005. 11:1952–1954.
- . Schubach T, Valle A, Gutierrez-Galhardo M, Monteiro P, Reis R, Zancopé'-Oliveira R, Marzochi K, Schubach A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol.* 2001. 39:147–9
- . Schubach T, Schubach A, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DT, Barros MBL, Brustein R, Oliveira RMZ, Monteiro PCF, Wanke B. *S. schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro Brazil. *Mycopathol.* 2002. 153:83–6.
- . Schubach TM, Schubach Ade O, Cuzzi-Maya T, Okamoto T, Reis RS, Monteiro PC, Gutierrez-Galhardo MC, Wanke B: Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec.* 2003. 152:172–175.
- . Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J AM Vet Med Assoc.* 2004. 224:1623–29.
- . Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory

- diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). *Med Mycol*. 2006. 44(1):87–92. PMID: 16805098
- . Scordino F, Pernice I, Passo C Lo, Galbo R, Medici MA, Criseo G, et al. Antifungal susceptibilities of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Italy. *J Biol Res*. 2015;88(1):139–40.
 - . Schenck, B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the sporotricha. *Johns Hopkins Hops Bul*. 1898. 93:286–90.
 - . Singer JI, Muncie JE. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. *N Y State J Med*. 1952. 52(17:1):2147–2153.
 - . Silva EA, Bernardi F, Schoendorf LMP, Mendes MCN, Garcia NO, Paranhos NT, Montenegro H, Dias MAG. Esporotricose: surto epidêmico com acometimento humano e felino na Zona Leste de São Paulo, Brasil. *Acta Sci Vet*. 2013; In press.
 - . Silva JN, Miranda LHM, Menezes RC, Gremião IDF, Oliveira RVC, Vieira SMM, Conceição-Silva F, Ferreiro L, Pereira SA. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *J Comp Pathol*. 2018 160:72-78. doi: 10.1016/j.jcpa.2018.03.002.
 - . Silva MBT da, Costa MM de M, Torres CC da S, Galhardo MCG, Valle ACF do, Magalhães M de AFM, et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saude Publica* [Internet]. 2012. 28(10):1867–80. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2012001000006&lng=pt&tlng=pt
 - . Song Y, Yao L, Zhong SX, Tian YP, Liu YY, Li SS. Infant sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. *Int J Dermatol*. 2011. 50(5):522-9. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04724.x.
 - . Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013. 27: 313–318. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x.
 - . Souza CP de, Lucas R, Ramadinha RHR, Pires TBCP. Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. *J Fel Med Surg*. 2016. 18(2): 137–143. doi: 10.1177/1098612X15575777
 - . Stopiglia CDO. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology*. 2013. (52): 56-64.
 - . Siew HH. The Current Status of Feline Sporotrichosis in Malaysia. 2017. *Med Mycol J*. 58(3):E107-E113. doi: 10.3314/mmj.17.014.

- . Tang MM, Tang JJ, Gill P, Chang CC, Baba R. Cutaneous sporotrichosis: a six-year review of 19 cases in a tertiary referral center in Malaysia. *Int J Dermatol*. 2012. 51(6):702–708. doi: 10.1111/j.1365- 4632.2011.05229.x PMID: 22607289.
- . Teixeira PA, de Castro RA, Nascimento RC. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. *Microbiology*. 2009. (155):3730-8.
- . Teixeira de Sousa Mda G1, Ghosn EE, Almeida SR. Absence of CD4+ T cells impairs host defence of mice infected with *Fonsecaea pedrosoi*. *Scand J Immunol*. 2006. 64: 595–600.
- . Trilles L, Ferna B, Schubach ADO, Paes RDA, Inza I. In Vitro Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in Two Growth Phases. 2005. 49(9):3952–4.
- . Viana PG, Pereira AS, Mutis MCS, Figueiredo FB, Miranda LHM, Antonio IMC, et al. Clinical and epidemiological aspects of the largest epidemic of sporotrichosis in dogs: 203 cases [2004–2014]. In: Proceeding of the 7th Trends in Medical Mycology; 2015; Lisbon, Portugal. *Mycoses*. 2015;58 (Suppl. 4), p.145.
- . Verma S, Verma GK, Singh G, Kanga A, Shanker V, Singh D, Gupta P, Mokta K, Sharma V. Sporotrichosis in Sub-Himalayan India. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012. 6: e1673. doi:10.1371/journal.pntd.0001673
- . Vismer HF, Hull PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia*. 1997. 137: 137–143. doi: 10.1023/A:1006830131173.
- . Yegneswaran PP, Sripathi H, Bairy I, Lonikar V, Rao R, Prabhu S. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. *Int J Dermatol*. 2009. 48(11):1198–1200. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.04049. PMID: 20064175
- . Zamri-Saad M, Salmiyah TS, Jasni S, Cheng BY, Basri K. Feline sporotrichosis: an increasingly important zoonotic disease in Malaysia. *Vet Rec*. 1990. 127(19):480. PMID: 2270639
- . Zhang Y, Hagen F, Stielow B, Rodrigues AM, Samerpitak K, Zhou X, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14000 human and animal case reports. *Persoonia*. 2015; 35:1–20. doi: 10.3767/003158515X687416 PMID: 26823625
- . Zhou X, Rodrigues AM, Feng P, de Hoog, GS. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Divers*. 2013. 1–13.

10 PUBLICAÇÕES

10.1 Publicações em periódicos científicos (2014-2018)

1. **Gonsales FF**, Guerra JM, Wasques DG, Réssio RA, Brandão PE, Villarreal LY, Fernandes NCCA. Esporotricose em cão Yorkshire Terrier na cidade de São Paulo, SP – Brasil: realto de caso. *Rev Inst Adolf Lutz*. 2015. 74(4):453-457. ISSN: 0073-9855. e-ISSN: 1983-3814.
2. **Gonsales FF**, Brandão PE, Ponti L, Fuji JM, Bueno T, Zuniga E, Melville PA, Benites NR. Detecção de herpesvírus felino do tipo 1 e *Chlamydia felis* em gatil de superpopulação em São Paulo. *Nosso Clínico*. 2015. 105:18-23. ISSN 1808-7191.
3. Salaberry SR, Saidenberg AB, Zuniga E, **Gonsales FF**, Melville PA, Benites NR. Contagem de células somáticas e viabilidade em cabras com mastite subclínica por *Staphylococcus* spp. *Vet. e Zootec*. 2015. 22(3):445-454. ISSN: 0102-5716. e-ISSN: 2178-3764.
4. Zuniga E, Melville PA, Saidenberg AB, Laes MA, **Gonsales FF**, Salaberry SR, Gregori F, Brandão PE, dos Santos FG, Lincopan NE, Benites NR. Occurrence of genes coding for MSCRAMM and biofilm-associated protein Bap in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine subclinical mastitis and relationship with somatic cell counts. *Microb Pathog*. 2015. 89:1-6. doi: 10.1016/j.micpath.2015.08.014.
5. **Gonsales FF**, Brandão PE, Melville PA, Zuniga E, Benites NR. *Chlamydia felis*: Lack of association between clinical signs and the presence of the cryptic plasmid. *Microb Pathog*. 2016. 97:14-8. doi: 10.1016/j.micpath.2016.05.009.
6. **Gonsales FF**, Moreto A, Mansho W, Vincentin CA, Benites NR. Esporotricose na cidade de Guarulhos, São Paulo, Brasil. *Nosso Clínico*. 2018. 121:18-24. ISSN 18082-7191.

10.2 Trabalhos apresentados em congresso internacionais

1. **Gonsales FF.** Occurrence of *Chlamydophila felis*, cryptic plasmid, FHV-1, FIV and FeLV in three shelters. 39th World Small Animal Veterinary Association Congress. Cape Town, South Africa, 2014.
2. **Gonsales FF.** *Chlamydia felis* in cats with upper respiratory tract infection associated with poor sanitary condition in cat shelters from São Paulo city, Brazil. XXII Congreso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología. Cartagena, Colômbia, 2014.
3. **Gonsales FF.** Detection of polymorphic membrane protein genes in *Chlamydia felis* strain in two shelters. 40th World Small Animal Veterinary Association Congress. Bangkok, Tailândia, 2015.
4. **Gonsales FF.** Prevalence of *Mycoplasma* spp. in cats with conjunctivitis in São Paulo, Brazil. 41st World Small Animal Veterinary Association Congress. Cartagena, Colômbia, 2016.
5. **Gonsales FF.** Cell Block Cytology Applied to Sporotrichosis Diagnosis. ACVIM Forum - American College of Veterinary Internal Medicine. Washington DC, EUA, 2017.
6. **Gonsales FF.** Sporotrichosis in domestic felines in Guarulhos, Brazil. 42nd World Small Animal Veterinary Association Congress. Copenhagen, Dinamarca, 2017.

10.3 Revisora de periódico internacional

Journal Feline Medicine and Surgery	ISSN: 1098612X	UK
Journal Feline Medicine and Surgery Open Reports	ISSN: 20551169	UK

10.4 Orientações

1. Claudia Medina de Oliveria. Desvio portossistêmico em felinos: Relato de Caso. 2016. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Clínica de Medicina em Felinos) - Centro de Ensino e Qualificações Superior Equalis. Orientadora: Fernanda Fidelis Gonsales.
2. Betania Kössling Mazzini. Hipertireoidismo Felino: Relato de Caso. 2014. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Clínica de Medicina em Felinos) - Centro de Ensino e Qualificações Superior Equalis. Orientadora: Fernanda Fidelis Gonsales.
3. Cintia Gonçalves Faiad. Cardiomiopatia Hipertrófica em Felinos. 2014. Monografia. (Aperfeiçoamento/Especialização em Clínica de Medicina em Felinos) - Centro de Ensino e Qualificações Superior Equalis. Orientadora: Fernanda Fidelis Gonsales.