

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**BRUNO CARNEIRO REDIGUIERI**

**ESPOROTRICOSE FELINA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO - BRASIL:  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E  
AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME CITOPATOLÓGICO COMO  
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA**

**VITÓRIA-ES**

**2021**

**BRUNO CARNEIRO REDIGUIERI**

**ESPOROTRICOSE FELINA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO - BRASIL:  
CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E  
AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME CITOPATOLÓGICO COMO  
FERRAMENTA DIAGNÓSTICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas.

Orientadora: Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares  
Coorientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto

**VITÓRIA-ES**

**2021**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

R317e Rediguieri, Bruno Carneiro, 1981-  
Esporotricose felina no Estado do Espírito Santo - Brasil : características clínico-epidemiológicas, microbiológicas e avaliação da acurácia do exame citopatológico como ferramenta diagnóstica. / Bruno Carneiro Rediguieri. - 2021.  
77 f. : il.

Orientadora: Sarah Gonçalves Tavares.

Coorientador: Aloísio Falqueto.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. esporotricose. 2. Sporothrix. 3. ES. 4. felinos. 5. panótico. 6. PCR espécie-específica. I. Tavares, Sarah Gonçalves. II. Falqueto, Aloísio. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

O (a) mestrando (a) Bruno Carneiro Rediguiery apresentou a tese intitulada “ESPOROTRICOSE FELINA NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO - BRASIL: CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS, MICROBIOLÓGICAS E AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DO EXAME CITOPATOLÓGICO COMO FERRAMENTA DIAGNÓSTICA” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu ( X ) aprovar ( ) reprovar a dissertação habilitando Bruno Carneiro Rediguiery a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 5 de março de 2021.

Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares  
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora

*Luana Rossato*

Profa. Dra. Luana Rossato  
Universidade Federal da Grande Dourados – Titular Externo

Profa. Dra. Creuza Rachel Vicente  
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

  
Bruno Carneiro Rediguiery  
Discente



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105  
Tel: (27) 3335-7504 | [www.doencasinfecciosas.ufes.br](http://www.doencasinfecciosas.ufes.br) | [ppgdi.ufes@gmail.com](mailto:ppgdi.ufes@gmail.com)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
SARAH GONCALVES TAVARES - SIAPE 2277189  
Departamento de Patologia - DPA/CCS  
Em 09/03/2021 às 14:44

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/153835?tipoArquivo=O>



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

**PROTOCOLO DE ASSINATURA**



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por  
CREUZA RACHEL VICENTE - SIAPE 1404038  
Departamento de Medicina Social - DMS/CCS  
Em 09/03/2021 às 16:13

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link:  
<https://api.lepisma.ufes.br/arquivos-assinados/153975?tipoArquivo=O>

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais (*in memoriam*), Antônio e Margareth. Tenho certeza que estão orgulhosos dessa grande conquista. Obrigado por tudo!

À minha esposa Thaisa e aos meus filhos, Antônio e Benício, grande parte da minha motivação para seguir em frente.

Amo vocês!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me permitir seguir com saúde, mesmo em tempos tão difíceis.

Aos meus pais, por toda a dedicação e por me guiarem a ser o homem que sou.

À minha família, irmãos e amigos pelo apoio. Em especial, à minha esposa Thaisa, por estar ao meu lado e me ajudar a superar todos os obstáculos. Obrigado por compreender que todo o esforço foi pelo nosso bem. Aos meninos, Antônio e Benício, obrigado por serem meu grande estímulo, e por entenderem com a mesma alegria de sempre, por vezes, minha ausência. Tenho certeza de que um dia irão ler esse trabalho e se orgulharem. Sigam sempre estudando!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sarah Gonçalves Tavares: não tenho palavras para agradecer tamanha dedicação. Obrigado por ter aceitado ser minha orientadora, quando ainda nem nos conhecíamos. Agradeço imensamente pelo companheirismo, pela solicitude, pelo perfeccionismo, pela rigidez na dose certa, por todos os ensinamentos na micologia, na pesquisa, na metodologia científica. Levarei para a vida toda! Obrigado! Obrigado!

Ao Prof. Dr. Aloísio Falqueto, meu coorientador, pela disponibilidade de sempre, e por todos os ensinamentos em saúde pública, desde antes do meu ingresso no mestrado.

Aos amigos do Centro de Investigação em Micologia Médica (CIMM) - UFES, à turma da iniciação científica, e em especial à Simone Maifrede e à Isabela Bahiense, por todo o apoio do início ao fim.

Aos colegas que fiz no Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes (LAPEM) - UNIFESP, em especial ao Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues pela gentileza e pela colaboração técnico-científica, fundamental para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial também à Jamile de Carvalho, pela dedicação e pelo auxílio incansável nos ensaios moleculares.

Ao Prof. Dr. Gustavo Rocha Leite, pelos conhecimentos compartilhados e pelo suporte na análise estatística dos resultados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariceli de Araújo, por me incentivar e me mostrar o melhor caminho para adentrar nesse fantástico mundo da pesquisa científica. Obrigado!

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christina Pettan-Brewer, por todo o apoio ao longo desse tempo, e por me introduzir ao universo da Saúde Única (*One Health*).

Aos colegas, médicos veterinários, que colaboraram com o envio de amostras biológicas de gatos suspeitos, Vicente Vizioli, Sidnei Gaspar, Wanessa Pachito, Lucas Soares, Joice do Couto e Luciana Comarú, obrigado pela contribuição ímpar.

Ao pessoal das turmas de mestrado e doutorado que tive a oportunidade de conhecer e conviver.

Ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas (PPGDI-UFES) e ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP/CAPES) pelo apoio técnico-financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

## RESUMO

REDIGUIERI, B.C. ***Esporotricose felina no Estado do Espírito Santo - Brasil: características clínico-epidemiológicas, microbiológicas e avaliação da acurácia do exame citopatológico como ferramenta diagnóstica.*** Dissertação (Mestrado). Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2021. 77 p.

A esporotricose é uma micose de implantação causada por espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, que acomete principalmente o tecido cutâneo e subcutâneo de humanos e animais homeotérmicos. Classicamente, a doença é adquirida por inoculação traumática do microrganismo no tecido subcutâneo, no contato com solo, vegetação e material em decomposição contaminado. A rota alternativa de transmissão (zoonótica) ocorre, frequentemente, por arranhadura ou mordedura de gatos infectados pelo *Sporothrix brasiliensis*, espécie mais virulenta. A esporotricose felina é uma doença endêmica no Brasil, incluindo o estado do Espírito Santo (ES), com crescimento alarmante de casos. O objetivo deste estudo foi verificar os aspectos clínicos-epidemiológicos e microbiológicos da esporotricose felina no ES, bem como, demonstrar o grau de confiabilidade do exame citopatológico no diagnóstico da doença. De março de 2019 a abril de 2020, foram avaliados 154 casos suspeitos, oriundos de vários municípios do ES. Os animais foram examinados e, após o levantamento de dados clínico-epidemiológicos, submetidos à coleta de amostras biológicas e confecção de lâminas por *imprint*, para realização do exame citopatológico associado à técnica de panótico rápido. As lâminas foram avaliadas cegamente por dois pesquisadores. Parte da amostra foi semeada em ágar Sabouraud (ASD) e os isolados de *Sporothrix* recuperados foram caracterizados morfológica e molecularmente. Dessa forma, os isolados foram identificados por PCR-espécie-específica, a partir de um fragmento do gene da calmodulina (CAL). Um banco digital de imagens de acesso público foi elaborado empregando a ferramenta online *Padlet*, a fim de documentar diferentes tipos de lesões dos animais e perfis de lâminas positivas. O grau de confiabilidade do exame citopatológico em relação à cultura foi avaliado utilizando a correspondência entre observadores por meio do coeficiente de concordância de *Kappa*. Acurácia do método foi determinada por meio do teste de independência Qui-quadrado. Dos 154 gatos, a maioria foi composta por

machos (n=109; 70,8%), não-castrados (n=132; 85,7%), com hábito semidomiciliar (n=116; 75,3%), de área urbana (n=150; 97,4%) e com tutor responsável (n=137; 89,0%). A idade média dos animais foi 25,3 meses. Cento e dezesseis (75,3%) amostras foram positivas na citopatologia para esporotricose, enquanto 121 (78,6%) foram confirmadas na cultura. A concordância interobservadores foi alta (coeficiente de *Kappa* = 0,96). Os valores de sensibilidade, especificidade, preditivos (positivo e negativo) e acurácia foram 95,0%, 97,0%, 99,1%, 84,2% e 95,5%, respectivamente. Todos os isolados de *Sporothrix* avaliados por ensaio molecular foram identificados como *S. brasiliensis*. Concluimos que o exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica do panótico rápido, demonstrou alto grau de confiabilidade, independentemente da gravidade do quadro clínico. Ademais, a técnica de PCR espécie-específica utilizada foi capaz de identificar *S. brasiliensis* de forma rápida e com baixo custo. Por fim, essa espécie parece ser o único agente da esporotricose felina no Estado do ES.

**Palavras-chave:** esporotricose. *Sporothrix*. ES. felinos. panótico. PCR espécie-específica

## ABSTRACT

Sporotrichosis is an implantation mycosis caused by species of the *Sporothrix schenckii* complex, which mainly affects the skin and subcutaneous tissue of humans and homeothermic animals. Classically, the disease is acquired by inoculation of the microorganism in the subcutaneous tissue, in traumatic contact with contaminated soil, vegetation, and decomposing material. The alternative route of transmission (zoonotic) occurs frequently by scratching or biting of cats infected with *Sporothrix brasiliensis*, a more virulent species. Feline sporotrichosis is an endemic disease in Brazil, including the state of Espírito Santo, with an alarming increase in cases. The objective of this study was to verify the clinical-epidemiological and microbiological aspects of feline sporotrichosis in ES, as well as to demonstrate the degree of reliability of the cytopathological examination in the diagnosis of the disease. From March 2019 to April 2020, 154 suspicious cases from several municipalities in ES were evaluated. The animals were examined and, after collecting clinical-epidemiological data, subject to the collection of biological samples and making slides by *imprint*, to perform the cytopathological examination associated with the quick panoptic technique. The slides were blindly assessed by two researchers. Part of the sample was sown on Sabouraud agar (ASD) and the recovered *Sporothrix* isolates were morphological and molecularly characterized. The isolates were identified by species-specific PCR targeting a fragment of the calmodulin gene (CAL). A digital public image bank was created using the online tool *Padlet*, to document different types of animal injuries and positive slide profiles. The degree of reliability of the cytopathological examination concerning the culture was assessed using the degree of agreement between observers. The degree of agreement was defined by the *Kappa* agreement coefficient. Accuracy parameters of the method were determined using the Chi-square independence test. Of the 154 cats, the majority were male (n = 109; 70.8%), non-neutered (n = 132; 85.7%), of semi-household habit (n = 116; 75.3%), of urban area (n = 150; 97.4%) and with responsible guardian (n = 137; 89.0%). The average age of the animals was 25.3 months. One hundred and sixteen (75.3%) samples were positive in cytopathology for sporotrichosis, while 121 (78.6%) were confirmed in the culture. The interobserver agreement was high (*Kappa* coefficient = 0.96). Sensitivity, specificity, predictive (positive and negative) and accuracy values were 95.0%, 97.0%, 99.1%, 84.2% and

95.5%, respectively. All *Sporothrix* isolates evaluated by molecular assay were identified as *S. brasiliensis*. We concluded that the cytopathological examination by *imprint*, associated with the quick panoptic technique, demonstrated a high degree of reliability, regardless of the severity of the clinical condition. Furthermore, the species-specific PCR technique used was able to identify *S. brasiliensis* quickly and at a low cost. Finally, this species seems to be the unique agent of feline sporotrichosis in the State of ES.

**Keywords:** sporotrichosis. *Sporothrix*. ES. feline. panoptic. PCR species-specific.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Micromorfologia de *S. schenckii*: formas filamentosas e leveduriformes .....19
- Figura 2** - Árvore filogenética agrupando os cinco principais clados do gênero *Sporothrix* .....21
- Figura 3** - Representação das relações filogenéticas entre os membros dos clados “clínico” e “ambiental” do gênero *Sporothrix* .....22
- Figura 4** - Distribuição geográfica dos casos suspeitos de esporotricose felina incluídos no estudo, de março de 2019 a abril de 2020, Espírito Santo, Brasil .....43
- Figura 5** - Diferentes formas de apresentação clínica da esporotricose felina ..... 45
- Figura 6** - Representação gráfica dos valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia e os respectivos intervalos de confiança (95%) do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de panótico rápido para diagnóstico da esporotricose felina, estratificados por grupos de animais do estudo ..... 48
- Figura 7** - Aspectos macromorfológicos de colônias sugestivas de *Sporothrix* spp.. 49
- Figura 8** - Aspectos micromorfológicos de colônias sugestivas de *Sporothrix* spp... 49
- Figura 9** - Gel de agarose exibindo padrão genotípico de isolados de *Sporothrix* com DNA amplificado pela técnica de PCR espécie-específica, com aproximadamente 469 pares de bases, compatíveis com *S. brasiliensis*..... 50
- Figura 10** - Banco de imagens de acesso público por meio da plataforma Padlet, com descrições de diferentes apresentações clínicas da esporotricose felina na forma cutânea e de perfis de lâminas confeccionadas pela técnica de *imprint*, associada ao panótico rápido, com a descrição de lâminas positivas com diversos graus de carga fúngica e de processo inflamatório associado, além de uma lâmina negativa.....51

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Características epidemiológicas dos animais incluídos no estudo com suspeita de esporotricose ..... 44
- Tabela 2** - Matriz de resultados obtidos no exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de panótico rápido para diagnóstico da esporotricose felina, por estudo comparativo cego, demonstrando o grau de concordância entre os observadores ..... 46
- Tabela 3** - Matriz de resultados alcançados no exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de panótico rápido, comparado à cultura fúngica (padrão-ouro), para diagnóstico da esporotricose felina ..... 46
- Tabela 4** - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia e do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de panótico rápido, em relação à cultura fúngica, no diagnóstico da esporotricose felina ..... 47
- Tabela 5** - Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de panótico rápido para diagnóstico da esporotricose felina, estratificados por grupos de animais do estudo ..... 47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – Acurácia

AFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados

ANB – Anfotericina B

ASD – Ágar Sabouraud dextrose

BHI – Ágar infusão de cérebro e coração

CAL – Calmodulina

CCZ – Centro de Controle de Zoonoses

CDC - USA – Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos

CIMM – Centro de Investigação em Micologia Médica

CTZ – Cetoconazol

CVI – Certificado Veterinário Internacional

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E – Especificidade

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EMD – Exame micológico direto

EPI – Equipamentos de Proteção Individual

ES – Espírito Santo

EUA – Estados Unidos da América

F – Fêmea

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IC – Intervalo de confiança

IgG – Imunoglobulina da classe G

IPEC – Instituto de Pesquisa Evandro Chagas

ITS – Espaçador Interno Transcrito

ITZ – Itraconazol

KI – Iodeto de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

LAPEM – Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes

M – Macho

MALDI - TOF MS – Espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz tempo-de-voe

MPE – Membro pélvico esquerdo

MTD – Membro torácico direito

MTE – Membro torácico esquerdo

MYC – Ágar Mycosel

NESIS - Núcleo Especial de Informação em Saúde

pb – pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDA – Ágar Batata Dextrose

PSC – Posaconazol

QRcode – Código de acesso rápido

RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RCA – Amplificação em círculo rolante

rpm – Rotações por minuto

S - Especificidade

SESA – ES – Secretaria de Estado da Saúde do Espírito Santo

SsCBF – Fração ligadora da Concanavalina-A de *Sporothrix schenckii*

T – Total de amostras

TNC – Total de negativos na cultura

TNCI – Total de negativos no citopatológico

TPC – Total de positivos na cultura

TPCI – Total de positivos no citopatológico

TRB - Terbinafina

UF – Unidade Federativa

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

VN – Verdadeiros negativos

VP – Verdadeiros positivos

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

VRC – Voriconazol

µL - Microlitro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1	CONTEXTO HISTÓRICO DA ESPOROTRICOSE.....	15
1.2	BIOLOGIA E TAXONOMIA DO GÊNERO <i>SPOROTHRIX</i> .....	17
1.3	EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE NO MUNDO .....	20
1.4	DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL DA ESPOROTRICOSE FELINA .....	27
1.5	TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA ESPOROTRICOSE FELINA .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
2.1	OBJETIVO GERAL .....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	36
3.1.1	<b>Coleta da amostra biológica e dos dados epidemiológicos</b> .....	36
3.1.2	<b>Diagnóstico da esporotricose por meio da técnica de panótico rápido</b> .....	37
3.1.3	<b>Processamento da amostra biológica</b> .....	38
3.1.4	<b>Identificação fenotípica dos isolados de <i>Sporothrix</i></b> .....	38
3.1.5	<b>Identificação molecular dos isolados de <i>Sporothrix</i></b> .....	39
3.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
3.3	CONSTRUÇÃO DO BANCO DE IMAGENS.....	42
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	43
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60
	<b>ANEXOS</b> .....	75

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONTEXTO HISTÓRICO DA ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma doença infecciosa fúngica que acomete, principalmente, o tecido cutâneo e subcutâneo de seres humanos e animais homeotérmicos (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015). A doença foi observada e descrita pela primeira vez no final do século XIX, em 30 de novembro de 1896, pelo médico americano Benjamin Robinson Schenck. A descrição relatava um caso clínico de paciente com lesão cutânea no dedo da mão, com disseminação por via linfática para o braço, no Hospital Johns Hopkins, Baltimore, Estados Unidos da América (EUA) (SCHENCK, 1898; ESPINEL-INGROFF, 1996). Posteriormente, o microrganismo isolado das lesões do paciente foi enviado ao micologista do Departamento de Agricultura de Washington, EUA, Dr. Erwin F. Smith, o qual classificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporotrichum*, que foi descrito por Link em 1809 (CARMICHAEL, 1962).

Por volta de 1900, Hektoen e Perkins também relataram um caso clínico cujo agente etiológico isolado era idêntico, morfológica e fisiologicamente, ao descrito por Schenck, classificando-o como *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900). Durante anos houve certa discordância entre autores em relação à classificação do agente. Após análise taxonômica aprofundada, Carmichael (1962) sugeriu a manutenção do termo *Sporothrix schenckii*, que somente após 1973 reapareceu em publicações e passou a ser aceito e aplicado pela comunidade científica (NICOT; MARIAT, 1973). Atualmente, *S. schenckii* compreende um complexo de espécies crípticas causadoras da esporotricose, as quais serão abordadas mais adiante (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015).

Em 1903, De Beurmann e Ramond identificaram o primeiro caso humano de esporotricose na França. Cerca de 200 outros casos foram relatados na região de Paris e outras províncias. Após 1920, os casos se tornaram escassos na Europa, mas aumentaram em outras partes do mundo por meio de surtos epidêmicos (DAVIS, 1996).

No Brasil, a esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1907 em São Paulo, por Lutz e Splendore, quando relataram a ocorrência espontânea de casos em humanos e ratos, além de demonstrarem a infecção experimental em animais (LUTZ; SPLENDORE, 1907).

De acordo com De Beurmann e Mackenna (1912) e Meyer (1915), havia ocorrência esporádica de esporotricose em equinos nos EUA em 1910. Segundo Oliveira *et al.* (1981), de 1907 a 1981, foram relatados no Brasil casos de esporotricose em ratos, equinos, muares, asininos, bovinos, cães e gatos. Mais raramente, foram descritos, também em tatus, insetos, pássaros e outros roedores, como potenciais transmissores da doença para humanos (REED *et al.*, 1993; RODRIGUES *et al.*, 2014).

O primeiro surto de esporotricose foi descrito em Joanesburgo, África do Sul, envolvendo 14 trabalhadores de uma mina de ouro (PIJPER; PULLINGER, 1927). Duas décadas depois, Helm e Berman relataram a ocorrência do maior surto já registrado naquele país, com cerca de 3.000 mineiros contaminados após lesão traumática no contato com as madeiras não tratadas, usadas para sustentação das escavações (QUINTAL, 2000). Posteriormente, foram relatados muitos casos da doença no continente africano, principalmente no Zimbábue, na Nigéria e no Sudão. No entanto, essa casuística não foi claramente registrada devido à escassez de laboratórios de micologia locais (CHAKRABARTI *et al.*, 2014).

Na China, a esporotricose tem sido relatada por todo o país desde o primeiro caso identificado em 1916 (CHEN *et al.*, 2018). A partir de então, mais de 4.000 casos foram descritos na literatura chinesa e internacional, ocorrendo em quase todas as províncias, com destaque para Jilin, no nordeste do país. Entretanto, a incidência exata da doença é desconhecida. Nos últimos 40 anos, inúmeros casos têm sido diagnosticados, incluindo surtos sazonais em trabalhadores rurais infectados durante os períodos de colheita de milho, após lesão traumática com a palha contaminada (SONG *et al.*, 2013; CHAKRABARTI *et al.*, 2014; RODRIGUES; FERNANDES; CAMARGO, 2017).

Na Europa, diversos autores também observaram a ocorrência da doença em países como Bélgica, Suíça, Áustria, Alemanha, Espanha, Itália, Inglaterra, Irlanda e

Croácia, demonstrando o caráter de ocorrência global da doença. Após a década de 20, essa casuística recuou significativamente neste continente (DE BEURMANN; MACKENNA, 1912; SYMMERS, 1968; BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; CHAKRABARTI *et al.*, 2014). Em meados da década de 80, dois casos humanos foram relatados na região do Mediterrâneo, em Barcelona, Espanha (VENTIN *et al.*, 1987). Segundo Barile *et al.* (1993), a Itália teve um importante papel na ecoepidemiologia da esporotricose na Europa. Durante os 30 anos anteriores, foram registrados 58 casos humanos, a maioria na região de Apulia, enquanto no mesmo período, somente 55 casos ocorreram por todo o restante do continente. Outros casos de esporotricose têm sido reportados na Itália (BARONI *et al.*, 2007; CRISEO *et al.*, 2008; GIUFFRIDA *et al.*, 2020; MONNO *et al.*, 2020). Em 2009, um caso autóctone de esporotricose cutânea foi registrado na França (MAGAND *et al.*, 2009). No mesmo ano, em Portugal, foi diagnosticado um caso humano de esporotricose com envolvimento de *S. mexicana*, provavelmente importado da Malásia. Além disso, foi registrado um caso autóctone causado por *S. globosa* (DIAS *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Em relação ao continente americano, em 1988, nos EUA, houve um grande surto de esporotricose humana acometendo 84 pessoas, provenientes de 15 estados. O surto envolveu pessoas que trabalhavam na embalagem de sementes de coníferas, na Pensilvânia, para o envio a outros estados. No processo de embalagem, foram utilizados musgos colhidos em Wisconsin contaminados com *S. schenckii* (CDC - USA, 1988, Acesso em: 10 maio. 2020). Ainda nos EUA, outro surto foi observado no início dos anos 90, em pessoas que entraram em contato com fardos de feno contaminados, utilizados como enfeites de *Halloween*. O feno contaminado também foi relacionado a outros três relatos de casos anteriores (DOOLEY; BOSTIC; BECKIUS, 1997). Na Flórida, mais tarde, nove trabalhadores de três empresas de jardinagem desenvolveram esporotricose. Nestes casos, o principal fator de risco relacionado foi a manipulação de musgo na montagem de plantas ornamentais (HAJJEH *et al.*, 1997).

## 1.2 BIOLOGIA E TAXONOMIA DO GÊNERO *SPOROTHRIX*

*Sporothrix* é um fungo ascomiceto, termodimórfico, que varia de acordo com o nicho ecológico, frequência, distribuição e virulência (TÉLLEZ *et al.*, 2014). Pertence

à ordem *Ophiostomatales*, classe *Sordariomycetes*, família *Ophiostomataceae* (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999; RODRIGUES, 2010). Dentre as espécies pertencentes ao gênero, *Sporothrix schenckii* é considerado o patógeno mais importante, podendo ser encontrado naturalmente em plantas, matéria orgânica em decomposição, solo rico em celulose e excrementos de animais. Sobrevive e reproduz em ambientes com pH entre 3,5 e 9,4, temperatura média de 31°C e umidade relativa acima de 92% (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

*Sporothrix schenckii* é caracterizado fenotipicamente como bolores (forma filamentosa) a 25-30°C, com colônias de textura geralmente lisa em ágar Sabouraud dextrose (ASD), variando com coloração branca-acinzentada, podendo apresentar colônias marrom-enegrecidas e enrugadas com o passar do tempo. Micromorfologicamente, esta forma filamentosa é composta por várias hifas hialinas, finas e septadas, associadas a conídios sésseis e soltos, ovoides, ou conídios simpodiais agrupados em conidióforos terminais, conferindo o aspecto de “margarida” (Figura 1A). Pode ser observado, ainda, presença de conídios sésseis demáceos, que podem ser encontrados dispostos ao longo de toda a hifa (KAUFFMAN, 1999).

A 35-37° C, temperatura corpórea da maioria dos mamíferos, assume a forma parasitária, apresentando estruturas leveduriformes que podem ser observadas no exame micológico direto (EMD), assumindo formas ovais a arredondadas, com a presença de halo externo (parede celular). As leveduras podem, ainda, ser alongadas em formato de “charuto”, medindo aproximadamente 4 a 6 µm de diâmetro (Figura 1B). Em meio ágar infusão de cérebro e coração (BHI), podemos observar colônias com aspecto branco pastoso ao amarelo acinzentado, semelhante a uma colônia bacteriana (HOWARD, 1961; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2018).

A identificação de espécies em fungos, antes do desenvolvimento das técnicas moleculares modernas, era baseada apenas no método de observação minuciosa de características macro e micromorfológicas, fenotípicas e bioquímicas. O emprego da abordagem molecular, com a caracterização e a diferenciação em nível de DNA, propiciou o surgimento de muitas espécies novas dentro do gênero *Sporothrix* (DE HOOG *et al.*, 2015).

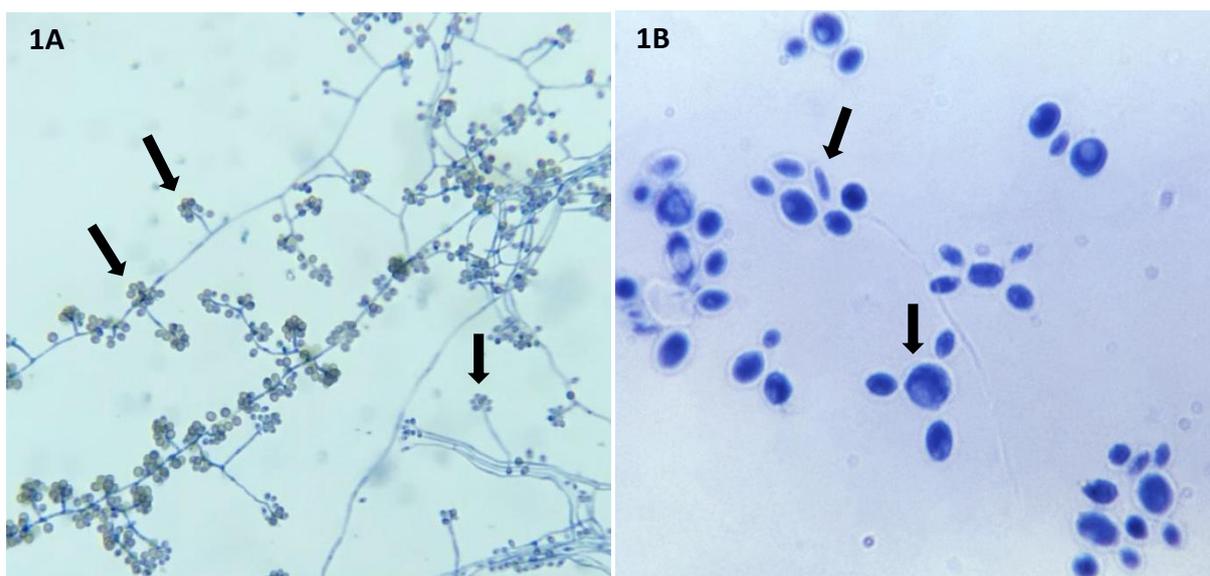


Figura 1 – Micromorfologia de *S. schenckii*: forma filamentosa (25°C) com hifas finas e septadas, com conídios simpodiais, agrupados em conidióforos terminais com aspecto de “margarida” (setas); coloração lactofenol azul de algodão, aumento 40X. (1A); estruturas leveduriformes (37°C) ovais, arredondadas ou alongadas em formato de “charuto”; coloração lactofenol azul de algodão, aumento 100X; (1B; GEORG, 1964).

Até recentemente, *S. schenckii* parecia ser uma única espécie, apesar de serem observadas linhagens genéticas distintas. De Beer *et al.* (2003), analisando filogeneticamente cepas de *Ophiostoma stenoceras*, um fungo saprófito bem conhecido, conjuntamente com *S. schenckii*, identificaram a probabilidade de existir mais de uma espécie em *S. schenckii*.

Posteriormente, Marimon *et al.* (2006, 2007), por meio de técnicas moleculares, baseadas no sequenciamento genético de três diferentes *loci* (quitina sintase,  $\beta$ -tubulina e calmodulina), estudaram isolados de *Sporothrix* de diferentes regiões do mundo. Os resultados demonstraram a existência de um complexo de espécies, denominado “complexo *Sporothrix schenckii*”. Este foi dividido em cinco principais clados agrupados filogeneticamente e que diferiam quanto à prevalência em diferentes regiões geográficas (Figura 2). Dentre eles, i) clado I, com isolados provenientes do Brasil, sendo, posteriormente, denominados *Sporothrix brasiliensis*; ii) clado II (*S. schenckii sensu stricto*), basicamente com isolados das Américas, subdividido em subclado IIa (EUA e América do Sul: Argentina, Bolívia, Colômbia, Peru e Venezuela) e IIb (cepas provenientes do Peru, Argentina e um único isolado da África do Sul); iii) clado III, compreendendo isolados de ampla distribuição geográfica (China, Índia, Itália, Japão, Espanha e EUA), conhecidos como *Sporothrix*

*globosa*, com relevância médica importante nos países asiáticos; iv) clado IV, com isolados ambientais do México, chamados de *Sporothrix mexicana* e v) clado V, agrupando isolados ambientais da Inglaterra e Alemanha, identificados como *Sporothrix albicans*. Esta última espécie foi, posteriormente, renomeada *Sporothrix pallida*, um microrganismo pouco patogênico, raramente associado a casos clínicos (MORRISON *et al.*, 2013; MOUSSA *et al.*, 2017).

Em 1956, Ajello e Kaplan isolaram uma variante de *Sporothrix* de um paciente humano na África do Sul, à qual deram o nome de *S. schenckii* var. *luriei* (AJELLO; KAPLAN, 1969). Marimon *et al.* (2008), por meio de análises molecular, morfológica e fisiológica, identificaram diferenças significativas entre *S. schenckii* e a variante isolada por aqueles pesquisadores, propondo sua reclassificação como uma nova espécie, *Sporothrix luriei*, também incluída no complexo *S. schenckii*.

Atualmente, conforme mostra a Figura 3, o gênero *Sporothrix* é dividido em dois principais clados, o clínico e o ambiental. No “clínico”, denominado complexo *S. schenckii*, foram alocadas as espécies de maior importância médica humana e animal, dentre elas: i) *S. brasiliensis*, comumente associada à esporotricose felina e à transmissão zoonótica, ii) *S. schenckii sensu stricto* e *S. globosa*, frequentemente relacionada à esporotricose sapronótica, principalmente na China e iii) *S. luriei* (RODRIGUES *et al.*, 2013; LIU; ZHANG; ZHOU, 2014). O “clado ambiental” compreende as demais espécies, sendo estas não patogênicas, ou raramente relacionadas a casos de esporotricose em humanos e animais. Dentre elas, i) espécies do chamado complexo *S. pallida*, como *S. mexicana*, *Sporothrix chilensis*, originária do Chile, e, recentemente, identificada também no Brasil, e ii) *Sporothrix humicola*, publicada como agente do primeiro caso de esporotricose felina no Reino Unido em 2020 (ZHOU *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2016; MAKRI *et al.*, 2020; VALERIANO *et al.*, 2020).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE NO MUNDO

A esporotricose é uma micose de distribuição cosmopolita, com prevalência variada entre os continentes, sendo mais frequente em regiões de clima tropical e

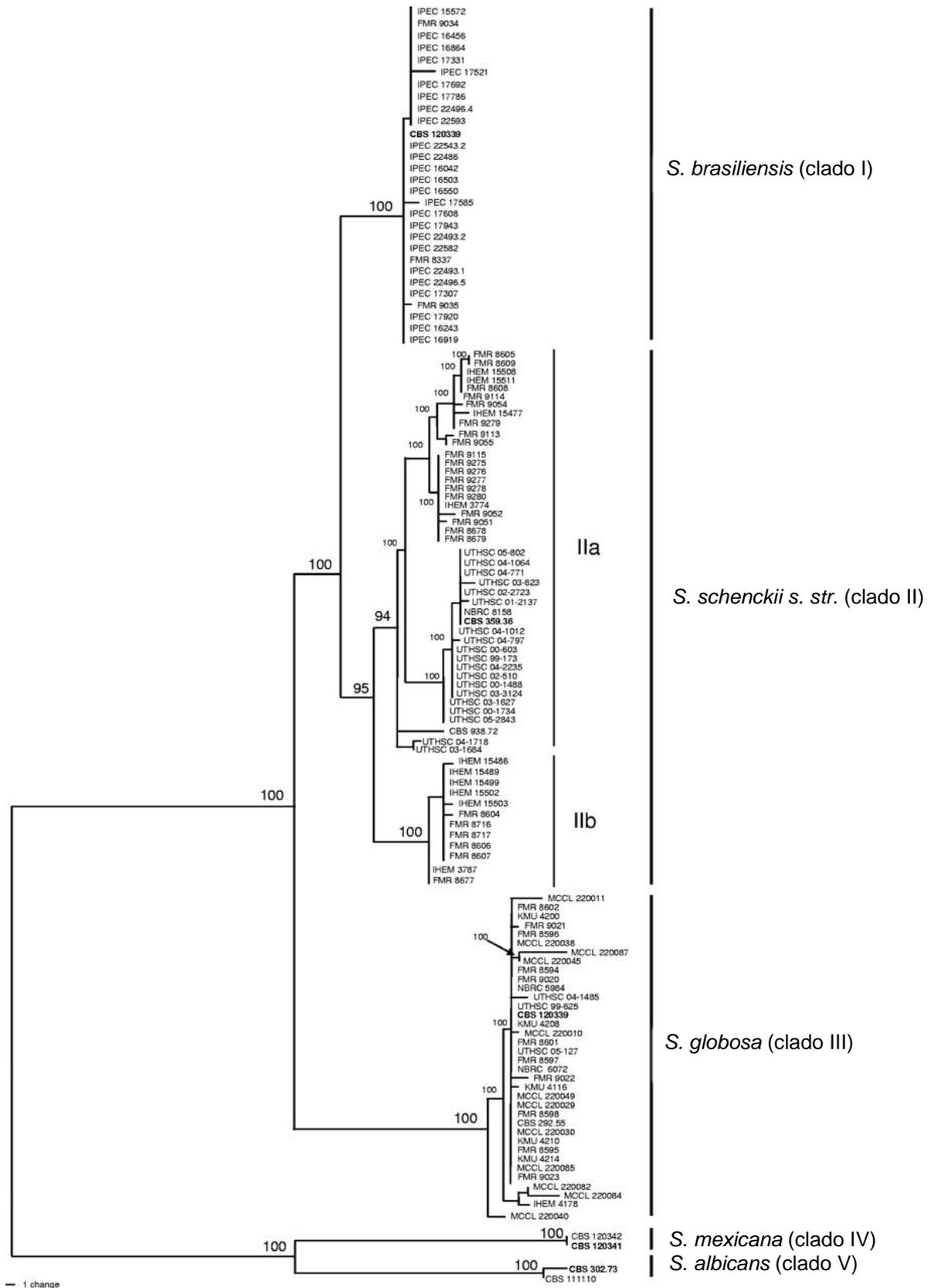


Figura 2 – Árvore filogenética agrupando os cinco principais clados do gênero *Sporothrix*, baseada no sequenciamento do gene da calmodulina. Fonte: Adaptada de Marimon *et al.* (2007).

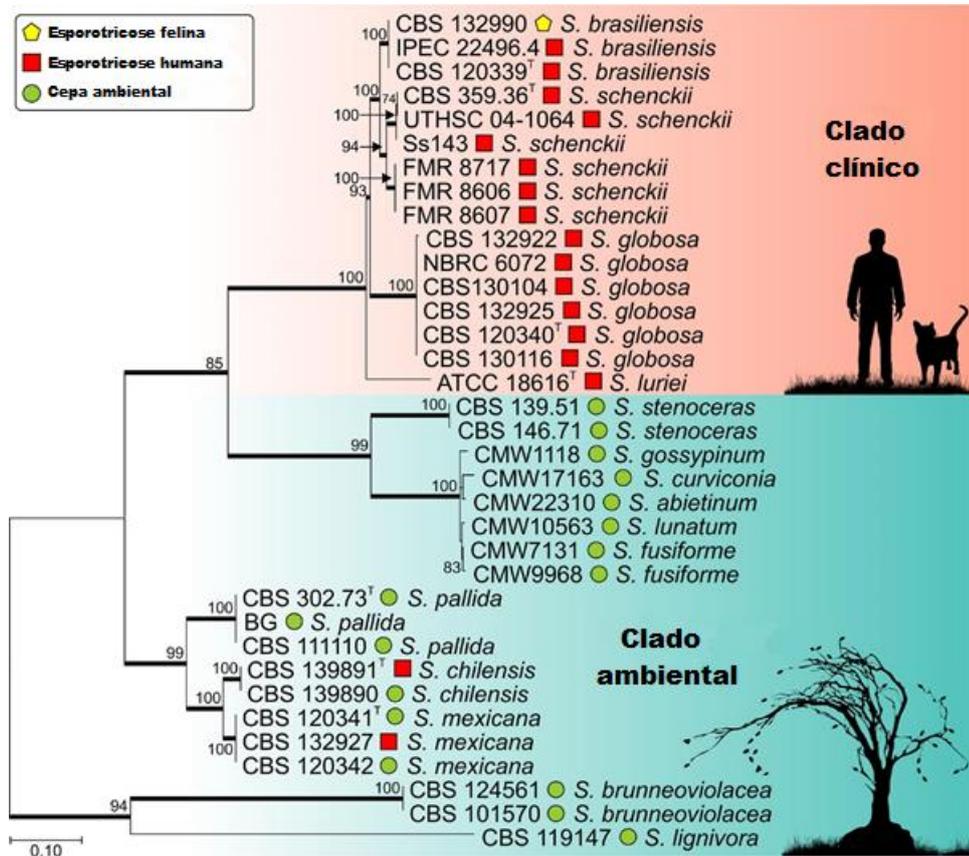


Figura 3 – Representação das relações filogenéticas entre os membros dos clados “clínico” e “ambiental” do gênero *Sporothrix*, baseadas no sequenciamento do gene da calmodulina. Fonte: Adaptada de Orofino-Costa *et al.* (2017).

subtropical (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2011; ROMEO; SCORDINO; CRISEO, 2011; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015; RIOS *et al.*, 2018; KAMAL AZAM *et al.*, 2020).

A doença possui duas principais rotas de transmissão, a rota clássica sapronótica e a rota alternativa, que pode ser horizontal (animal – animal) ou zoonótica (animal – homem). A rota clássica ocorre principalmente por inoculação do fungo no tecido subcutâneo, através de traumas causados pelo contato com solo, plantas e matéria orgânica em decomposição. Nestes casos, comumente estão relacionadas a atividades laborais ou de lazer como jardinagem, floricultura e agricultura (LARSSON *et al.*, 1989; RIOS *et al.*, 2018; QUEIROZ-TELLES; BUCCHERI; BENARD, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020; ROSSOW *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2021). Além de casos de esporotricose humana, a esporotricose adquirida de fontes ambientais também já foi descrita em diversas outras espécies de animais, tais

como cães, gatos, cavalos, camelos, golfinhos, pássaros, ratos e tatus (PEREIRA; GREMIÃO; MENEZES, 2015; MOUSSA *et al.*, 2017; RODRIGUES; FERNANDES; CAMARGO, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020). A rota alternativa de transmissão ocorre frequentemente por arranhadura ou mordedura de animais infectados, em especial, gatos domésticos. Neste caso, médicos-veterinários e seus auxiliares, além dos tutores de animais, têm maior risco de contaminação (BRAVO, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2020). De acordo com Falqueto, Maifrede e Ribeiro (2012), é possível, apesar de rara, a transmissão indireta por meio do contato com objetos contaminados com exsudato das lesões dos gatos com esporotricose, ou ainda, por inalação de propágulos fúngicos, possivelmente devido à alta carga fúngica tecidual nos gatos infectados.

A esporotricose pode ter apresentações clínicas cutâneas e extracutâneas dependendo da rota de infecção, da resposta imune do hospedeiro e da quantidade de material inoculado. A esporotricose cutânea, pode ser classificada como cutâneo-localizada, cutâneo-disseminada por múltiplas inoculações ou linfo-cutânea, sendo esta última forma a mais frequentemente observada, cerca de 80% dos casos humanos (CAMPOS; ARENAS; CORONADO, 1994; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). A forma extracutânea pode se desenvolver em mucosas (nasal e ocular) e, ainda, pode se disseminar sistemicamente, por via hematogênica, com acometimento osteoarticular, neurológico e pulmonar (GORDHAN *et al.*, 2001; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; LING *et al.*, 2018; LACERDA FILHO *et al.*, 2019). Há ainda, as formas imunorreativas, como eritema nodoso, eritema multiforme, artrite reativa e síndrome de *Sweet*. Essas formas são causadas por uma resposta imune exacerbada do hospedeiro contra o fungo (GALHARDO *et al.*, 2002; OROFINO-COSTA *et al.*, 2010 FREITAS *et al.*, 2012).

Na América Latina, a prevalência estimada da esporotricose humana varia entre 0,1 e 0,5% em países como Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, México e Uruguai. Na Argentina, Equador e Panamá, esta taxa é bem menor, de 0,01 a 0,02%. No Chile, a doença é bastante rara. Em algumas regiões do continente latino-americano, a esporotricose ocorre com maior frequência nas estações quentes e úmidas, enquanto que no México, os picos de incidência se concentram nas épocas mais frias e secas do ano (DÍAZ, 1989; BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001; QUEIROZ-

TELLES *et al.*, 2011; CAMACHO *et al.*, 2015; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020;). De acordo com Zhang *et al.* (2015), Brasil, China e África do Sul são considerados endêmicos, registrando alta incidência.

No Brasil, até meados dos anos 90, havia registros de casos de esporotricose humana esporádicos, sendo a maioria homens em área rural, com histórico de manipulação de solo e matéria orgânica, caracterizando a forma clássica de transmissão da doença, prevalente na maioria dos outros países (ROSA *et al.*, 2005). No final dessa década, os casos de esporotricose felina no Brasil ainda apresentavam baixa frequência, apenas surtos não muito expressivos, controlados e de rápida resolução, documentados em São Paulo e no Rio Grande do Sul (MARQUES *et al.*, 1992; MADRID *et al.*, 2010). Entre 1987 a 1997, somente 13 casos humanos haviam sido registrados no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC), no Rio de Janeiro. A partir do ano seguinte, houve uma explosão de casos de esporotricose felina, iniciando, concomitantemente, uma epidemia em humanos. Até 2004, já haviam sido registrados 759 casos em humanos, 1.503 casos em gatos e 64 em cães (SCHUBACH; BARROS; WANKE, 2008). A cidade do Rio de Janeiro, então, hiperendêmica, registrou aproximadamente 5.000 casos humanos até 2015 e 5.113 casos felinos até 2018 (GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015; GREMIÃO *et al.*, 2020b). Desde então, uma somatória de fatores tais como, baixas condições socioeconômicas e higiênico-sanitárias, superpopulação humana e de felinos, além de uma possível adaptação do fungo ao corpo dos gatos (principalmente unhas, saliva, mucosa oral e nasal) resultaram no início da maior epidemia mundial de esporotricose felina e, conseqüentemente, humana (SCHUBACH *et al.*, 2002; BOECHAT *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; ALZUGUIR *et al.*, 2020; PAIVA *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2020b). Até o momento, o estado do Rio de Janeiro permanece hiperendêmico, com números assustadores da doença (GREMIÃO *et al.*, 2017, 2020a, 2020b; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; MACÊDO-SALES *et al.*, 2020; FALCÃO *et al.*, 2020; GONSALES *et al.*, 2020).

Dentre as espécies de animais com risco de adoecerem, os gatos domésticos parecem ser os mais suscetíveis, apresentando formas mais graves da doença. Esses animais apresentam um maior potencial de participação na cadeia de transmissão zoonótica, em virtude da relação íntima com as pessoas (RODRIGUES; DE HOOG;

CAMARGO, 2018; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018a). Além desta, outras características podem favorecer a transmissão gato-homem e gato-gato. Dentre elas, podemos citar: i) presença de alta carga fúngica em lesões, unhas, pele, pelos, cavidades nasal e oral; ii) hábitos externos junto à natureza, como subir em árvores ou arvoredos, enterrar suas fezes, sair de casa para caçar, disputar territórios; e iii) encontrar parceiros na fase reprodutiva, sendo esta última responsável por brigas agressivas e lesões por arranhadura e/ou mordedura, disseminando a doença entre eles (SCHUBACH *et al.*, 2002; MONTENEGRO *et al.*, 2014; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2018). Gatos saudáveis colonizados pelo *Sporothrix*, principalmente em unhas e mucosa oral, também parecem ter algum papel na epidemiologia da esporotricose, apesar de menos significativos que os animais apresentando clinicamente a doença (BORGES *et al.*, 2013; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018a). Hoje, a esporotricose felina é relatada por todas as macrorregiões do território nacional, em quase todos os estados, com destaque para região sudeste, além de Rio Grande do Sul e Alagoas (GREMIÃO *et al.*, 2020b). A casuística da esporotricose felina, dentro dos estados, é bastante variada, e, de maneira geral, acompanha as taxas de incidência e distribuição da esporotricose humana (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Mesmo com a ocorrência de um surto crescente em vários estados no Brasil, não há um programa único, em nível nacional, para o controle da esporotricose felina. Apesar da epidemia no Rio de Janeiro ter iniciado há mais de duas décadas, a doença em felinos ainda não está contemplada na lista oficial de doenças de notificação compulsória nacional (BRASIL, 2020). Alguns estados e municípios implantaram diferentes protocolos e processos para atuação no controle da doença. No Estado do Rio de Janeiro, a esporotricose humana passou a ser notificada somente a partir de 2013 (RIO DE JANEIRO, 2013). Em 2018, foi implantado em Belo Horizonte – Minas Gerais, o protocolo municipal, com diagnóstico e tratamento de casos humanos e investigação de casos em animais (BELO HORIZONTE, [s.d.]. Acesso em: 20 maio. 2020). Outras cidades e estados também realizam atividades de vigilância, como o município de São Paulo (BORGES *et al.*, 2013).

No Estado do Espírito Santo (ES), pouco se sabe sobre a epidemiologia da esporotricose humana e animal. Em estudo realizado entre 2005 e 2012, no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM),

em Vitória – ES, em uma revisão de três décadas (1982 a 2012), Caus *et al.* (2019) demonstraram que a esporotricose humana tinha características de doença de transmissão sapronótica clássica, rural, tendo sido registrados, 171 casos humanos. Falqueto, Maifrede e Ribeiro (2012) relataram o primeiro surto de esporotricose no estado, envolvendo três casos de esporotricose em uma mesma família. O caso ocorreu em uma região rural do estado, provavelmente transmitidos por contato com exsudato de lesões de um gato doente. Mais tarde, estes isolados foram identificados molecularmente por Oliveira *et al.* (2013) como *S. brasiliensis*. Araújo *et al.* (2015) identificaram molecularmente *S. schenckii sensu stricto* em 12 casos humanos. Nesse mesmo estudo, 5 isolados recuperados, com histórico de contato com felinos, foram caracterizados como *S. brasiliensis*, assim como uma amostra isolada de um gato. Em 2016, Medeiros e colaboradores descreveram um relato de caso de transmissão zoonótica com desenvolvimento de esporotricose cutânea disseminada em paciente humano imunocompetente.

Em 2016, um aumento na ocorrência de casos suspeitos em animais foi observado na região sul-litorânea do estado, segundo relatos de médicos veterinários de municípios como Piúma e Anchieta. Recentemente, os Centros de Controle de Zoonoses (CCZ) de grande parte do ES, incluindo a Grande Vitória, bem como o serviço veterinário privado, têm notado um crescimento alarmante de casos da doença em felinos (dados não publicados). Da mesma forma, há relatos de um aumento no atendimento a pacientes humanos suspeitos e confirmados com esporotricose no serviço público de saúde, geralmente relacionados a histórico de contato prévio com animais com lesões semelhantes. A incidência real de casos humanos e animais no ES é incerta, visto que, somente em 2020 a esporotricose humana passou a ser de notificação compulsória estadual (ESPÍRITO SANTO, 2020). No entanto, a partir da elaboração de um modelo de formulário eletrônico (FormSUS) específico, criado em 2018, a Secretaria Estadual de Saúde (SESA-ES) vem recebendo registros de casos suspeitos de esporotricose animal de muitas regiões do estado. Até janeiro de 2021, foram 752 casos notificados, sendo 740 gatos e 11 cães. Dentre os municípios de notificação estão: Anchieta, Aracruz, Cariacica, Castelo, Domingos Martins, Fundão, Guarapari, Ibraçu, Itapemirim, Linhares, Marataízes, Mimoso do Sul, Nova Venécia, Santa Teresa, Serra, Viana, Vila Valério, Vila Velha e Vitória (ESPÍRITO SANTO, [s.d.]. Acesso em: 31 janeiro. 2021). Atualmente, de acordo com Cruz-Bahiense

Rocha *et al.* (2020), a esporotricose no ES parece ter assumido um caráter urbano epidêmico, com significativa expansão de ocorrência da esporotricose causada principalmente por *S. brasiliensis*.

A vigilância dos felinos domésticos, portanto, é parte indispensável do controle da transmissão zoonótica da esporotricose e impacta diretamente na ocorrência de casos humanos e no controle da disseminação fúngica entre animais e o ambiente. Apesar da crescente epidemia de esporotricose felina no estado do ES, informações a respeito da doença são pouco difundidas, tanto entre clínicos quanto em relação a população geral, o que dificulta o diagnóstico e o manejo terapêutico da doença. Além disso, pouco se conhece em relação à esporotricose felina no nosso estado.

#### 1.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO-LABORATORIAL DA ESPOROTRICOSE FELINA

O diagnóstico clínico-epidemiológico da esporotricose felina é baseado nos achados clínicos, associados ao histórico epidemiológico. Isso geralmente inclui fugas recentes ou brigas, frequentemente envolvendo machos adultos, sem raça e não – castrados (PEREIRA *et al.*, 2014). Clinicamente, os gatos podem apresentar uma infecção subclínica, mas que na maioria das vezes evoluem para a forma cutâneo-disseminada, com múltiplas lesões, predominantemente em face e patas, podendo ocorrer acometimento sistêmico fatal (GREMIÃO *et al.*, 2014). Inicialmente, as lesões são papulares, evoluindo para aspecto gomoso e, então, ulcerado, com presença de exsudato serossanguinolento (LARSSON, 2011). É comum a presença de lesões em mucosa nasal, podendo haver comprometimento linfático na forma de linfangite e linfadenite (SCHUBACH *et al.*, 2004). Sinais extracutâneos, principalmente espirros, dispneia e secreção nasal são bastante comuns e, quando presentes, são associados a falha terapêutica e a óbito (GREMIÃO *et al.*, 2014).

O diagnóstico laboratorial preciso e precoce é de suma importância, visto que o aspecto clínico das lesões cutâneas nos gatos pode ser semelhante a outras manifestações dermatológicas como micobacteriose, criptococose, histoplasmose, neoplasias e leishmaniose cutânea (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2018).

O padrão-ouro para diagnóstico laboratorial da esporotricose é a cultura fúngica, com isolamento e identificação do microrganismo a partir de amostras clínicas

coletadas de lesões de pele, abscessos, escarro, pus, sangue, dentre outros (KAUFFMAN *et al.*, 2007). No entanto, a cultura não é 100% sensível e pode ser influenciada por má coleta ou transporte inadequado das amostras clínicas, bem como pela presença de microrganismos contaminantes (SILVA *et al.*, 2018). Os espécimes clínicos são semeados em meios de cultura específicos, como ASD acrescidos de cloranfenicol e Ágar MYC, com posterior incubação a 25° e 37°C, além do Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI), incubado a 37°C (LARSSON, 2011). Cerca de 89% dos casos, o isolamento do fungo é concluído dentro de oito dias, mas em algumas amostras, pode haver demora de até quatro semanas para ocorrer o crescimento do fungo (PAPPAS *et al.*, 2000).

A citopatologia para o diagnóstico de esporotricose humana, por exame micológico direto (EMD), utilizando soluções de hidróxido de potássio (KOH), apresenta uma sensibilidade e especificidade muito baixa, com raras ou nenhuma estrutura de *Sporothrix*. Esses resultados são mais satisfatórios em pacientes imunossuprimidos (ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2011). Segundo Orofino-Costa *et al.* (2017), *imprints* de secreção purulenta ou biópsia, corados com corante de Giemsa, aumentam a sensibilidade do teste em humanos.

Por outro lado, o EMD submetido a técnicas de coloração de Gram, Panótico Rápido, Wright, Giemsa ou Rosenfeld, é mais sensível em animais, particularmente em felinos. Geralmente, os felinos com esporotricose apresentam altas concentrações de células fúngicas nas lesões teciduais, podendo ser observadas, na maior parte das vezes, diversas estruturas leveduriformes, intra ou extracelulares, ovaladas, arredondadas ou em formato de “charuto” (LARSSON, 2011).

O método Panótico Rápido, uma técnica de coloração do tipo *Romanowsky*, similar ao *DiffQuik*, é bastante comum nas clínicas veterinárias devido à sua praticidade, ao seu baixíssimo custo e ao ótimo rendimento, considerando que com um kit de coloração é possível corar em torno de 1000 lâminas (CLINKENBEARD, 1991; PANÓTICO RÁPIDO: • LABORCLIN, [s.d.]; WELSH, 2003). Em felinos, este tipo de exame diagnóstico apresenta sensibilidade de 52,6 a 87%, quando comparado ao exame padrão-ouro (PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA, *et al.*, 2015, 2018; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018a). No entanto, o tratamento com antifúngicos em doses elevadas

parece interferir negativamente na sensibilidade deste método diagnóstico (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018b).

O exame histopatológico tem sido uma boa alternativa diagnóstica para a esporotricose em felinos, sendo rápida, barata e acessível. Através de biópsia de lesões cutâneas é possível observar células leveduriformes nos tecidos, bem como avaliar o nível e o tipo de resposta inflamatória local (MIRANDA *et al.*, 2013). O uso de técnicas de histoquímica, como a coloração prata de Grocott, o ácido periódico de Schiff, azul Alciano e métodos de imuno-histoquímica combinados, aumentam a sensibilidade diagnóstica do exame histopatológico (MARQUES *et al.*, 1992; MIRANDA *et al.*, 2013; BAZZI *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2018). No entanto, essa técnica é mais laboriosa que o Panótico Rápido (SILVA, G. M. *et al.*, 2018; GONSALES *et al.*, 2019).

Kano *et al.* (2005) desenvolveram uma técnica de identificação de DNA diretamente das amostras de biópsia, possibilitando resultados mais rápidos e confiáveis no diagnóstico da esporotricose felina. No entanto, não é uma ferramenta acessível nos laboratórios de rotina.

Outra técnica, que também possibilita o diagnóstico de esporotricose felina, é a citoinclusão em blocos (*cell-block*), associada à punção aspirativa com agulha fina. Entretanto, requer maior estrutura laboratorial e é mais cara, quando comparada ao exame citopatológico convencional associado ao Panótico Rápido (GONSALES *et al.*, 2019).

Testes sorológicos, baseados na detecção de imunoglobulinas IgG, podem ser utilizados no diagnóstico e no monitoramento da resposta terapêutica da esporotricose felina. Ademais, podem ser aplicados na distinção entre infecções recentes e tardias, sendo fundamentais nos inquéritos de acompanhamento da prevalência e de taxas de transmissão da doença numa população (BAPTISTA *et al.*, 2020). Fernandes *et al.* (2011) desenvolveram um ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Sporothrix* em soro de felinos, utilizando um antígeno de parede celular purificado (SsCBF). Os autores demonstraram alta sensibilidade (90,0%) e especificidade (96,0%) do ensaio. Atualmente, há testes sorológicos validados, comercialmente disponíveis para o diagnóstico da esporotricose humana e

felina. No entanto, além do custo elevado, quando comparados ao exame citopatológico, as dificuldades de contenção física e os riscos de acidentes por arranhadura e mordedura, no procedimento de coleta de soro, podem inviabilizar essa opção diagnóstica nos gatos (GREMIÃO *et al.*, 2020a).

Dentre as técnicas diagnósticas abordadas acima, nenhuma possibilita a identificação das espécies de *Sporothrix*. Ademais, somente a cultura fúngica permite o isolamento do microrganismo para sua posterior caracterização morfológica e molecular (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020). As diferenças morfológicas entre espécies de *Sporothrix* são muito sutis, o que torna inviável a identificação desses microrganismos baseada apenas nessas características. Outro fator importante é que as características fenotípicas podem sofrer modificações de acordo com fatores externos, ou após microcultivos seguidos, podendo induzir ao erro (OLIVEIRA *et al.*, 2011; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2013; CAMACHO *et al.*, 2015). No entanto, novas ferramentas moleculares têm sido desenvolvidas para a identificação de espécies de *Sporothrix*, tais como: i) polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição de DNA (PCR-RFLP) direcionada para genes estruturais como calmodulina (*CAL*), ii) PCR espécie-específica, iii) amplificação em círculo rolante (RCA), iv) PCR em tempo real, v) polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), usando o primer universal T3B, vi) sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal, vii) PCR com alvo no gene da topoisomerase II, viii) polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e ix) PCR *fingerprinting* usando o Microssatélite M13 (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2011; ZANCOPÉ-OLIVEIRA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2015; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020). De acordo com Rodrigues, de Hoog e Camargo (2015), a técnica de PCR espécie-específica, baseada na amplificação do gene da *CAL*, é padrão-ouro para a identificação de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida* a partir de culturas fúngicas ou espécimes clínicos. Em relação a outras técnicas de biologia molecular, o custo dessa metodologia é relativamente baixo, apresentando rapidez, facilidade de execução, eficiência, alta sensibilidade e confiabilidade, sendo amplamente recomendada para diagnóstico de esporotricose e identificação de espécie.

Dentre as principais moléculas-alvo empregadas nestas técnicas estão a calmodulina,  $\beta$ -tubulina, fator de alongação (EF-1 $\alpha$ ) e região ITS do DNA ribossomal (MARIMON *et al.*, 2006; 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2014). Vale destacar que entre os marcadores citados, a *CAL* é considerada um excelente marcador para identificação das espécies, estudo da diversidade genética e de estrutura populacional de espécies pertencentes ao complexo *Sporothrix schenckii* (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Em 2015, Oliveira e colaboradores desenvolveram e padronizaram um protocolo de identificação de isolados clínicos e ambientais do complexo *S. schenckii*, utilizando a técnica de espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz tempo-de-voo (MALDI-TOF MS). Os autores obtiveram 100% (64/64) de concordância com os resultados dos métodos moleculares baseados em marcadores de DNA, como o sequenciamento parcial do gene da *CAL* (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Apesar da importância do diagnóstico laboratorial, como parte de um conjunto de ações públicas voltadas para o controle de surtos de esporotricose, esse serviço ainda não foi implementando nos CCZ da maioria dos municípios do ES. Nem todas as cidades dispõem de médicos-veterinários nas secretarias municipais de saúde. Além disso, em muitas, não há recursos e estrutura laboratorial adequada para a realização da cultura fúngica (padrão-ouro), tampouco do diagnóstico sorológico ou molecular. O exame citopatológico pode ser uma alternativa mais prática, acessível e compatível com a realidade destes municípios. Assim, esse exame poderia permitir um diagnóstico precoce dos casos suspeitos de esporotricose e uma intervenção mais segura e eficaz. Vale destacar a relevância epidemiológica da caracterização das espécies envolvidas nos surtos, sendo a PCR-espécie-específica, a técnica molecular mais barata e viável para identificação de espécies dentro do complexo *S. schenckii*.

## 1.5 TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA ESPOROTRICOSE FELINA

O tratamento dos animais, em especial os felinos, tem sido um dos maiores entraves no controle da esporotricose em nível de saúde pública. Dentre os principais fatores que dificultam tal ação estão, principalmente, a escassez de medicamentos de administração oral, o alto custo, o surgimento de efeitos colaterais adversos e a longa

duração até o sucesso terapêutico (RODRIGUES; FERNANDES; CAMARGO, 2017). O custo do tratamento por seis meses, considerando apenas o medicamento veterinário à base do antifúngico de primeira escolha, está em torno de 3 a 4 mil reais, em média (ITL 100 MG: O ANTIFÚNGICO PARA CÃES E GATOS | PETZ, [s.d.]).

Dentre os fármacos disponíveis para o tratamento da esporotricose estão iodeto de potássio (KI), cetoconazol (CTZ), itraconazol (ITZ), anfotericina B (ANB) e terbinafina (TRB). O ITZ é o antifúngico azólico de primeira escolha no tratamento da esporotricose felina, usado no Brasil desde 1993, na dose de 10mg/kg/dia, via oral ou ainda na dose de 50 ou 100mg por dia (LARSSON, 2011; SOUZA *et al.*, 2018). O KI, administrado via oral em cápsulas (15 mg/kg/dia), é uma boa alternativa terapêutica, apesar de estar associado ao iodismo em gatos. Este fármaco associado ao ITZ (100mg/dia) mostrou bons resultados no tratamento de casos refratários à monoterapia utilizando somente uma das drogas (REIS *et al.*, 2012; 2016; ROCHA *et al.*, 2018). No entanto, a aceitação do felino da medicação por via oral é bastante complexa, principalmente em virtude do sabor desagradável do fármaco. O CTZ, na dose de 5 a 10mg/kg, a cada 12 ou 24 horas, também é eficaz no tratamento da esporotricose felina, mas é associado a maior ocorrência de efeitos colaterais (WELSH, 2003; PEREIRA *et al.*, 2010).

A aplicação intralesional de ANB (5mg/mL) tem sido empregada na resolução de casos refratários aos antifúngicos azólicos ou em associação a esses, com resultados satisfatórios em sua maioria (GREMIÃO *et al.*, 2011).

Resultados recentes, obtidos de avaliações de susceptibilidade *in vitro* de isolados de *S. schenckii sensu lato* a antifúngicos, sugerem o desenvolvimento de resistência aos principais azólicos utilizados no tratamento da esporotricose felina. Esses resultados também reforçam a importância da implementação dos antifungogramas na rotina clínica, a fim de promover a vigilância da emergência de resistência, bem como orientar melhor o manejo terapêutico (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017; NAKASU *et al.*, 2020).

Borba-Santos *et al.* (2015) demonstraram que, dentre diversos antifúngicos avaliados, a TRB apresentou os melhores resultados *in vitro* contra *S. brasiliensis*, seguido do posaconazol (PSC). Diferentemente, o voriconazol (VRC) apresentou

pouca atividade contra este microrganismo. Segundo Jaham, Paradis e Papich (2000), a dose recomendada de TRB para cães e gatos varia de 20 a 40 mg/kg a cada 24 ou 48 horas.

No tratamento da esporotricose felina, diversas alternativas terapêuticas coadjuvantes têm sido aplicadas, como a termoterapia local na forma cutâneo – fixa da doença, a criocirurgia e a remoção cirúrgica (PEREIRA *et al.*, 2009). Além destas, outras estão em desenvolvimento, tais como terapias tópicas com antifúngicos à base de substâncias naturais, como o própolis (HONSE *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2016; WALLER *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2020; PASSOS *et al.*, 2020).

O prognóstico dos gatos depende do grau de disseminação cutânea e/ou sistêmica da doença. Além disso, devemos levar em consideração, também, a dedicação do tutor na manutenção do tratamento, que dura em média 4 a 9 meses. O tratamento deve ser estendido por em média 4 semanas após a remissão completa das lesões cutâneas e dos sinais extracutâneos (GREMIÃO *et al.*, 2014; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2018).

A prevenção da esporotricose felina está diretamente ligada aos processos de educação em saúde da população, com a disseminação de informações gerais sobre esta zoonose e sobre o conceito de guarda responsável de animais de estimação. Além disso, não podemos esquecer que perpassa pelo treinamento dos profissionais de saúde (CDC - USA. [s.d.]. Acesso em: 19 maio. 2020). A castração é medida indispensável para diminuir a atividade sexual dos animais e reduzir a exposição à contaminação em brigas. O diagnóstico precoce de gatos doentes na comunidade e a oferta do tratamento gratuito são fundamentais, pois possibilitam um bloqueio mais rápido e eficaz na cadeia de transmissão a outros animais e aos humanos. Carcaças de animais mortos com esporotricose devem, necessariamente, ser cremadas ou incineradas, sob risco de contaminação do solo com o fungo, caso venham a ser enterradas (RODRIGUES *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2020b).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC-EUA) reforça a importância da abordagem de saúde única (“*one health*”) no combate à esporotricose. Dessa forma, médicos-veterinários, médicos, ecologistas e muitos outros profissionais trabalham em conjunto para monitorar e controlar as ameaças à

saúde pública e para aprender como as doenças propagam entre pessoas, animais e o ambiente (CDC - USA. [s.d.]. Acesso em: 24 maio. 2020).

Sob este aspecto, a abordagem de saúde única é imprescindível na prevenção da esporotricose, no sentido de que estes profissionais estejam capacitados e atentos às características epidemiológicas, de transmissão e de controle desta zoonose (KAADAN *et al.*, 2020). A expansão geográfica da epidemia de esporotricose humana e felina no Brasil é um exemplo didático da importância deste conceito, que engloba a saúde humana, animal e do meio ambiente. Ademais, abrange aspectos socioeducativos, econômicos e de políticas públicas (LERNER; BERG, 2017; ROSSOW *et al.*, 2020).

Esperamos, com esta pesquisa, não apenas contribuir para o preenchimento da lacuna de conhecimento existente a respeito da esporotricose felina no ES, mas também, colaborar para uma melhor atuação dos serviços de vigilância, por meio de ferramentas simples e de baixo custo, promovendo o melhor manejo do animal doente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características clínico-epidemiológicas e microbiológicas da esporotricose felina no Estado do ES, bem como, determinar o grau de confiabilidade do exame citopatológico no diagnóstico da doença.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever e analisar dados clínico-epidemiológicos dos casos de esporotricose felina no ES;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados de *Sporothrix* recuperados neste estudo;
- Identificar molecularmente as espécies de *Sporothrix* recuperadas;
- Avaliar a sensibilidade e a especificidade da técnica de Panótico Rápido no diagnóstico da esporotricose felina no Estado;
- Descrever e documentar em acesso público, por meio fotográfico digital, diferentes tipos de lesões dos animais estudados e diferentes perfis de lâminas positivas para esporotricose, para possibilitar o acesso de estudantes e profissionais de medicina veterinária ao banco de imagens e facilitar o diagnóstico.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foi realizado um estudo de corte transversal com casos suspeitos de esporotricose felina atendidos em vários municípios do estado do ES. Os animais incluídos no estudo foram provenientes de CCZ, clínicas veterinárias e domicílios, no período de março de 2019 a abril de 2020. Cada animal foi examinado minuciosamente e, em seguida, submetido à coleta de amostras biológicas (exsudato de lesões cutâneas), por meio de *swab* e confecção de lâminas por *imprint*. Estes materiais eram enviados ao Centro de Investigação em Micologia Médica (CIMM), Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

Foram incluídos no estudo gatos domésticos (*Felis catus*), com idade maior que um mês e peso entre 1 a 15 quilogramas, independente da raça ou sexo, apresentando pelo menos uma lesão cutânea sugestiva de esporotricose, em especial, aqueles com histórico de fugas e/ou brigas com outros animais. O critério de exclusão foi a utilização prévia de antifúngicos tópicos e/ou sistêmicos por mais de sete dias seguidos.

Os animais foram classificados em quatro grupos distintos, de acordo com critério de grau de acometimento da doença, dentre eles: **C1** (presença de lesões cutâneas em apenas uma localização e ausência de sinais de acometimento respiratório); **C2** (presença de lesões cutâneas em duas localizações distintas, não adjacentes, e ausência de sinais de acometimento respiratório); **C3** (presença de lesões cutâneas em três ou mais localizações distintas, não adjacentes, e ausência de sinais de acometimento respiratório) e **R** (presença de pelo menos uma lesão cutânea e sinais de acometimento respiratório).

Dados gerais do tutor e clínico-epidemiológico-laboratoriais dos animais foram coletados de acordo com o modelo da ficha de investigação utilizada no município de Anchieta-ES em anexo (Anexo 1), para posterior análise de frequências simples e relativa. Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-UFES) sob o número 15/2019.

##### 3.1.1 Coleta da amostra biológica e dados epidemiológicos

As amostras biológicas foram coletadas na residência do tutor ou na sala de procedimentos dos CCZ, por equipe composta pelo médico veterinário e pelo menos um auxiliar de veterinária para contenção animal, todos devidamente paramentados com equipamentos de proteção individual (EPI).

Previamente à coleta da amostra biológica, foram preenchidos os seguintes documentos: ficha de investigação, ficha de classificação dos grupos de animais (Anexo 2) e termo de consentimento livre e esclarecido. Em seguida, foram realizados registros fotográficos das lesões utilizando um aparelho celular Iphone 7 (*Apple*<sup>®</sup>, EUA) com câmera grande-angular de 12 megapixels. Após a escolha da lesão ulcerada de maior diâmetro e a devida contenção física do animal, a antisepsia do local foi procedida com gaze estéril umedecida em álcool etílico 70% vol., de forma a reduzir a contaminação bacteriana e remover possíveis crostas, aumentando, assim, a exsudação da lesão para permitir a melhor amostragem.

Por meio de um *swab* estéril, foram coletadas amostras das bordas da lesão de maior diâmetro, acondicionando-as em tubo com meio de transporte *Stuart*, já devidamente identificado com os dados do felino. Em seguida, foram confeccionadas lâminas, em duplicata, para análise citopatológica utilizando a técnica de *imprint*, ou seja, pressionando a lâmina por três vezes na mesma lesão, em locais distintos da lâmina, a fim de produzir três decalques, sempre que possível.

### **3.1.2 Diagnóstico da esporotricose por meio da técnica de Panótico Rápido**

Para a avaliação citopatológica, a lâmina confeccionada no item 3.1.1 foi seca em temperatura ambiente e, em seguida, fixada e corada pelo método Panótico Rápido (Kit InstantProv; Newprov<sup>®</sup>), de acordo com as recomendações do fabricante. Sendo assim, a lâmina foi submersa na solução nº 1, em movimento contínuo de cima para baixo, durante 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada). Em seguida, o mesmo procedimento nas soluções nº 2 e nº 3. Por fim, a lâmina foi lavada com água corrente abundante para retirada do excesso de corante e seca à temperatura ambiente, na posição vertical e com a face do "*imprint*" voltada para cima.

Logo após a coloração, a lâmina foi examinada pelo 1<sup>o</sup> observador em microscópio óptico (Euromex<sup>®</sup> Bio Blue series) no CCZ, nas objetivas de aumento

40X e 100X. O resultado foi incluído no banco de dados de amostras, com o registro fotográfico da lâmina, caso positiva. Foram consideradas positivas as lâminas em que fosse observada ao menos uma estrutura leveduriforme condizente com *Sporothrix* spp.

Em um estudo comparativo cego entre dois observadores, após avaliação pelo 1º observador, a lâmina foi encaminhada ao CIMM/UFES para análise pelo 2º observador, seguindo o mesmo padrão citado anteriormente, para comparação dos resultados.

### **3.1.3 Processamento da amostra biológica**

Juntamente com a lâmina, foi direcionada ao CIMM/UFES a amostra coletada no swab estéril, para processamento da cultura fúngica. No laboratório de micologia, o swab foi semeado em quatro tubos com meio de cultura, sendo dois contendo ASD (Difco™ BD/Sparks, MD, EUA) acrescido de cloranfenicol 50mg/L e dois tubos contendo ágar MYC. Dois dos tubos contendo o material semeado, sendo um com ágar ASD e um com ágar MYC, foram incubados a 25°C. Os outros dois tubos, incubados a 37°C. Os tubos foram verificados diariamente até o crescimento de colônias sugestivas de *Sporothrix*, por um período máximo de trinta dias. Após este período, tubos sem crescimento sugestivo, foram descartados, sendo considerados negativos.

Colônias com crescimento sugestivo de *Sporothrix* foram caracterizadas por macro e micromorfologia para confirmação do gênero.

### **3.1.4 Identificação fenotípica dos isolados de *Sporothrix***

A identificação fenotípica dos isolados de *Sporothrix* foi realizada levando em consideração as características da colônia (macromorfologia) e a micromorfologia do fungo.

Para análise macromorfológica das colônias, cada isolado foi semeado, com o auxílio de uma alça de platina em L, em três pontos equidistantes da placa de Petri (90 X 15 mm), contendo ágar batata dextrose (PDA) (39,5 g PDA; 1000 mL água destilada) e incubados a 25°C durante 7 a 14 dias. Após o período de incubação, as

culturas foram analisadas quanto ao aspecto macroscópico de acordo com Marimon *et al.* (2007).

A caracterização micromorfológica foi realizada pela técnica de microcultivo, também descrita por Marimon *et al.* (2007). Para tal, cada isolado foi semeado, com o auxílio de uma alça de platina em L ou agulha de níquel cromo, nas bordas de blocos (1,0 X 1,0 cm) de PDA em placas de Petri (90 X 15 mm). Cada bloco foi coberto com uma lamínula esterilizada e, em seguida, as placas foram incubadas a 25°C durante 7 a 14 dias. Decorrido o período de incubação, após o crescimento, a lamínula de cada cultivo foi depositada sobre uma lâmina contendo uma gota de lactofenol azul de algodão, a qual foi observada em microscópio de luz (Leica® DM500) com objetiva de 40X, onde foram analisadas as características das estruturas do micélio reprodutivo. Fragmentos das colônias confirmadas como *Sporothrix* spp. foram armazenados em temperatura ambiente, em frascos de vidro contendo água estéril acrescida de cloranfenicol 50mg/L (Castellani, 1939), para posterior identificação molecular.

### **3.1.5 Identificação molecular dos isolados de *Sporothrix***

Os isolados bancados na micoteca do CIMM-UFES foram reativados a 25°C, em placas de Petri contendo ASD (Difco™ BD/Sparks, MD, EUA) e, após 14 dias de crescimento, foi realizada a identificação molecular utilizando PCR-espécie-específica de um fragmento do gene da calmodulina (*CAL*), de acordo com protocolos pré-estabelecidos, previamente descritos por Rodrigues, de Hoog e Camargo (2015). Importante mencionar que esta etapa do projeto foi realizada em colaboração com o Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes-LAPEM, da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, contando com a contribuição do Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues.

#### **Extração do DNA genômico**

O processo de extração e purificação do DNA, a partir de colônias monospóricas, foi realizado com o uso do *kit Fast DNA* (MP Biomedicals, Vista, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A lise celular foi realizada por métodos químicos e físicos, seguida pela etapa de purificação do DNA. Inicialmente, com auxílio de palitos estéreis, fragmentos miceliais da colônia foram transferidos para

um tubo *ependorf* contendo uma esfera de porcelana, ao qual foram adicionados 1000  $\mu\text{L}$  de solução detergente (*CLS-Y*). Em seguida, os tubos foram homogeneizados por três vezes, a 6.000 rotações por minuto (rpm) (20 segundos cada, com intervalos de 5 segundos) por meio do aparelho *Precellys 24*<sup>®</sup> (Bertin, Montigny le Bretonneux, França). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo contendo 700  $\mu\text{L}$  de uma solução matriz (*Binding Matrix*), seguido de centrifugação por 5 minutos a 14.500 rpm. O novo sobrenadante formado foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensão e purificado com 500  $\mu\text{L}$  de uma solução de lavagem à base de etanol (*SEWS-M*), para remoção de sais. Novamente, o tubo foi centrifugado (5 minutos a 14.500 rpm) e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* de DNA foi seco no aparelho *SpeedVac*<sup>®</sup> (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) por 30 minutos a 30° C. Após secagem, o *pellet* foi ressuspensão em 170  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (*Milli-Q*) e incubado a 56° C por 3 minutos. Por fim, o DNA foi submetido a três centrifugações consecutivas de 8 minutos a 14.500 rpm, resgatando e transferindo o sobrenadante para novos tubos e descartando o *pellet*. O sobrenadante final contendo o DNA total (100  $\mu\text{L}$ ) foi transferido para um novo tubo e as concentrações de material genético foram estimadas em um espectrofotômetro de massa *NanoDrop*<sup>®</sup> 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA), sendo armazenados a -20°C até a etapa seguinte (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015).

### **PCR espécie-específica e eletroforese em gel de agarose 1,2%**

Cento e doze isolados foram caracterizados molecularmente, por meio de PCR espécie-específica a partir do gene alvo que codifica a calmodulina. Cepas-referência de *S. brasiliensis* (Ss27, Ss53 e Ss54) e *S. schenckii s. str.* (Ss36) foram utilizadas como controle positivo e, a ausência de DNA, como controle negativo no experimento. Foram empregados *primers forward* e *reverse* específicos para *S. brasiliensis* e *S. schenckii s. str.*, espécies mais prevalentes no Brasil. Desta forma, um Mix Duplex PCR com volume final de 25  $\mu\text{L}$  foi produzido, composto por: 12,5  $\mu\text{L}$  de tampão Master Mix - 2X; 9,5  $\mu\text{L}$  de água; 1  $\mu\text{L}$  de DNA alvo (100 ng/ $\mu\text{l}$ ); 1  $\mu\text{L}$  de *primer forward* e 1  $\mu\text{L}$  de *primer reverse* da espécie em questão. As reações de PCR foram processadas em um termociclador, com início a 95°C por 4 minutos e, então, amplificação por 35 ciclos, de acordo com a seguinte programação: i) Fase de desnaturação em 1 minuto a 94°C; ii) Fase de anelamento iniciando a 70°C por 1 min.

e diminuindo 1°C em média a cada dois ciclos até chegar a 60°C, com manutenção desta temperatura pelos 15 ciclos restantes; iii) Fase de polimerização do DNA, ocorrendo em 1 minuto a 72°C. O processo foi concluído com a fase de extensão final do DNA, que ocorreu por 10 minutos a 72°C. A reação durou em média 3 horas. Os resultados foram observados pela técnica de eletroforese em gel de agarose 1,2%. Para tal, foi preparado um Mix (6 µL de água MilliQ; 2 µL tampão padrão; 4 µL do produto da PCR) a ser aplicado posteriormente no gel de agarose. Para realizar a eletroforese, foi preparado um gel de agarose 1,2% (1,8g de agarose; 150 mL de Tampão TBE 1x Tris/Borato/EDTA), onde a solução foi vertida em uma cuba, aguardando posterior solidificação. Após conclusão dessa fase, 3 µL do marcador de peso molecular de 3000 pares de bases (pb) foram aplicados no primeiro poço, para mensuração das bandas e comparação com o controle positivo. Nos demais poços foram aplicados 10 µL do Mix contendo o produto da PCR, previamente preparado. A eletroforese foi, então, realizada durante 70 minutos a 100 Volts. As bandas produzidas foram visualizadas sob luz UV por meio do equipamento L-Pix (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015).

### 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo do “n” amostral, foi aplicada a fórmula  $n = (Z\alpha/2 \cdot \text{raiz quadrada de } p \cdot q) / E$  para descrição de variáveis qualitativas em uma população. Com o valor crítico para o grau de confiança desejado,  $Z\alpha/2 = 1,96$  (95%); proporção de resultados favoráveis da variável na população,  $p = 0,05$ ; proporção de resultados desfavoráveis na população,  $q = 0,95$ ; e erro padrão,  $E = 0,10$ . O número amostral foi de 97 animais.

O tamanho amostral para descrever a concordância entre os dois observadores pelo Coeficiente de Concordância de *Kappa*, foi calculado por meio da fórmula de qualidade-de-ajuste (*goodness-of-fit* fórmula) proposta por Donner e Eliasziw em 1992. Para a detecção de um valor de *Kappa* de 0,90 (excelente) em um teste bicaudal com hipótese nula abaixo de 0,79, considerando a proporção de avaliações positivas de 0,80, alfa de 0,05 e poder do teste de 0,80 - o número amostral foi de 101 lâminas.

Os dados epidemiológicos e os resultados laboratoriais obtidos foram descritos e analisados utilizando ferramentas básicas do EXCEL® (Microsoft, EUA). Para cálculo

da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) do exame citopatológico, foi aplicado o teste de independência *Qui-quadrado*, ao nível de significância de 5% e intervalos de 95% de confiança, utilizando a linguagem Python® (Python Software Foundation, EUA), por meio da plataforma Google Colab® (Google Research, EUA). A mesma plataforma foi utilizada para o cálculo do coeficiente de concordância (*Kappa*) entre os observadores, por meio da comparação de resultados obtidos no exame citopatológico.

### 3.3 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE IMAGENS

Para documentação e descrição das diferentes lesões dos animais estudados, foi construído um banco de imagens usando a ferramenta *Padlet* (<https://padlet.com/>) de acesso gratuito. A mesma ferramenta foi utilizada para elaboração de um laminário a partir de lâminas positivas pela técnica de *imprint*, associada ao panótico rápido, que apresentaram diferentes perfis de imagem.

## 4 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo um total de 154 gatos com suspeita de esporotricose. Destes, a maioria foi composta por machos (n=109; 70,8%), não-castrados (n=132; 85,7%), de hábito semidomiciliar (n=116; 75,3%), de área urbana (n=150; 97,4%) e com tutor responsável (n=137; 89,0%). Noventa e seis gatos (62,3%) possuíam outros animais contatantes na residência. A média e a mediana de idade dos animais foram 25,3 e 18,0 meses, respectivamente. Todos esses dados podem ser observados na Tabela 1. As amostras foram provenientes dos municípios de Aracruz (n=56; 36,4%), Anchieta (n=38; 24,7%), Vila Velha (n=33; 21,4%), Vitória (n=15; 9,7%), Serra (n=8; 5,2%), Guarapari (n=2; 1,3%), além de uma (0,6%) de Ibraçu e uma (0,6%) de Jerônimo Monteiro. A distribuição geográfica dos casos pode ser observada na Figura 4.

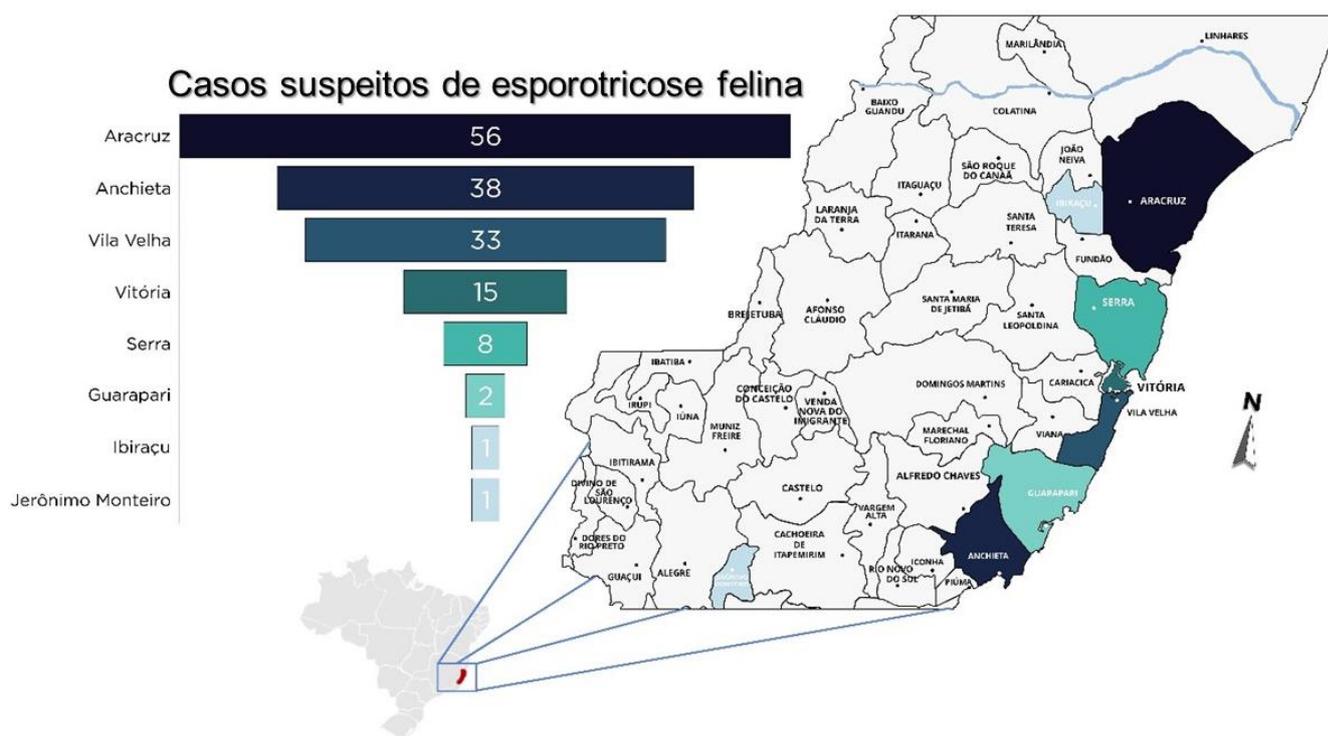


Figura 4 – Distribuição geográfica dos casos suspeitos de esporotricose felina incluídos no estudo, de março de 2019 a abril de 2020, Espírito Santo, Brasil (n=154).

De acordo com os dados epidemiológicos coletados, 124 casos (80,5%) foram registrados como primeira ocorrência de lesões cutâneas suspeitas de esporotricose. O início do desenvolvimento das lesões ocorreu entre uma semana e um mês da data da coleta em 72 animais (46,8%). Em 56 animais (36,4%), o início foi há mais de um mês e em 6 (3,9%), há menos de uma semana.

Tabela 1 – Características epidemiológicas dos animais incluídos no estudo com suspeita de esporotricose (n = 154).

Características	Animais investigados	
	Número de animais	Porcentagem
<b>Gênero</b>		
Macho	109	70,8
Fêmea	45	29,2
<b>Média/Mediana de idade = 25,3/18,0</b>		
<b>Castração</b>		
Castrados	18	11,7
Não castrados	132	85,7
Não informados	4	2,6
<b>Hábito</b>		
Domiciliado	13	8,4
Semidomiciliado	116	75,3
Não domiciliado	25	16,3
<b>Origem</b>		
Área urbana	150	97,4
Área rural	4	2,6
<b>Tutor</b>		
Sim	137	89
Não	17	11
<b>Contatantes</b>		
Sim	96	62,3
Não	38	24,7
Não informado	20	13

Segundo o critério de classificação dos animais por distribuição das lesões e acometimento respiratório, a maioria pertencia ao grupo R (n=71; 46,1%), seguida do grupo C1 (n=40; 26,0%), C3 (n=26; 16,9%) e C2 (n=17; 11,0%). Com relação ao aspecto das lesões cutâneas, a maior parte dos gatos apresentou lesões ulceradas (n=137; 89,0%), seguidas de lesões crostosas (n=74; 48,1%) e papulares (n=11; 7,1%). Foi observada presença de secreção nas lesões em apenas 60 (39,0%) animais, enquanto que o prurido foi constatado ou relatado pelo tutor em 52 (33,8%) casos. Os tipos de lesões podem ser observados na Figura 5. Através do QR code (Figura 10A), é possível acessar o banco de imagens das diferentes lesões de felinos geradas durante o estudo.



Figura 5 – Diferentes formas de apresentação clínica da esporotricose felina: 5A) cutâneo-localizada, em região de plano nasal e focinho, com lesão papular (seta preta) e ulcerada, com secreção serosanguinolenta (seta amarela) ; 5B) cutâneo-disseminada, em região de cabeça, com lesões crostosas (setas amarelas) e ulceradas, com secreção serosanguinolenta (setas pretas); 5C) cutâneo-disseminada, acometendo membros pélvicos, membros torácicos, tórax, pescoço e cabeça, com lesões ulceradas com secreção serosanguinolenta (setas brancas).

Quanto à localização das lesões cutâneas, a maior frequência foi observada em cabeça (n=114; 74,0%), seguida de membros torácicos (n=84; 54,5%) e membros pélvicos (n=67; 43,5%). Lesões no pescoço foram observadas em 49 (31,8%) animais, além de 30 (19,5%) no tórax, 19 (12,3%) no quadril, 17 (11,0%) no abdome e 13 (8,4%) na cauda.

Do total de 154 amostras coletadas, cento e vinte e uma (78,6%) foram positivas na cultura fúngica para colônias sugestivas de *Sporothrix* spp. Dentre as 33 (21,4%) amostras com cultura negativa para *Sporothrix*, houve crescimento de *Cryptococcus neoformans* em um caso. Dos 154 casos suspeitos de esporotricose, 116 (75,3%) foram positivos na citopatologia, ou seja, apresentavam estruturas fúngicas leveduriformes compatíveis com *Sporothrix*, constatadas pelos dois observadores. No entanto, houve divergência nos resultados em dois casos (Gato 57 e 64). A concordância interobservadores foi considerada excelente, com o valor do coeficiente de *Kappa* de 0,96. Esses dados podem ser observados na Tabela 2. As lâminas positivas com diferentes perfis, obtidas neste estudo, podem ser visualizadas através do QR code (Figura 10B).

Tabela 2 – Matriz de resultados obtidos no exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de Panótico Rápido, para diagnóstico da esporotricose felina, por estudo comparativo cego, demonstrando o grau de concordância entre os observadores (n = 154).

		1º Observador		
		Positivo	Negativo	Total
2º Observador	Positivo	115	1*	116
	Negativo	1*	37	38
	Total	116	38	154

$Kappa = 0,96$ ,  $Z(Kappa) = 11,97$ ,  $p < 0,0001$ , \* Gato 57 e Gato 64 (resultados divergentes entre os observadores).

Para o diagnóstico da esporotricose felina, de acordo com os resultados obtidos pelo 1º observador, considerados para fins de cálculos dos parâmetros de confiabilidade do exame citopatológico em relação à cultura fúngica, seis (15,8%) casos positivos na cultura, tiveram resultado negativo no citopatológico, sendo classificados neste teste como falsos-negativos. Um caso (Gato 140) foi considerado falso-positivo no exame citopatológico por ambos os observadores (Tabela 3).

Tabela 3 – Matriz de resultados alcançados no exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de Panótico Rápido, comparado à cultura fúngica (padrão-ouro), para diagnóstico da esporotricose felina (n = 154).

		Cultura		
		Positivo	Negativo	Total
Exame Citopatológico	Positivo	115	1*	116
	Negativo	6	32	38
	Total	121	33	154

$Kappa = 0,87$ ,  $Z(Kappa) = 10,86$ ,  $p < 0,0001$ , \* Gato 140 (falso-positivo).

Para o exame citopatológico, considerando uma prevalência de 78,6% (121/154), baseada no padrão-ouro (cultura), os resultados registrados de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia (AC) foram de 95,0%, 97,0%, 99,1%, 84,2% e 95,5%,

respectivamente (Tabela 4). Estes dados, estratificados para cada grupo (C1, C2, C3 e R), estão descritos na Tabela 5 e representados na Figura 6.

Tabela 4 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de Panótico Rápido, em relação à cultura fúngica, no diagnóstico da esporotricose felina.

	n / N (fórmula)	Resultado (%)	IC 95%
<b>Sensibilidade (%)</b>	115/121 (VP/TPC)	95,0	91,2 - 98,9
<b>Especificidade (%)</b>	32/33 (VN/TNC)	97,0	91,1 - 102,8
<b>VPP %</b>	115/116 (VP/TPCI)	99,1	97,5 - 100,8
<b>VPN %</b>	32/38 (VN/TNCI)	84,2	72,6 - 95,8
<b>Acurácia %</b>	147/154 (VP+VN/T)	95,5	92,2 - 98,7

Legenda: VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, IC: intervalo de confiança, VP: verdadeiros positivos, VN: verdadeiros negativos, TPC: total de positivos na cultura, TNC: total de negativos na cultura, TPCI: total de positivos no exame citopatológico, TNCI: total de negativos no exame citopatológico, T: total de amostras.

Tabela 5 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos e acurácia do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de Panótico Rápido, para diagnóstico da esporotricose felina, estratificados por grupos de animais do estudo.

	C1 (n=40)	IC 95%	C2 (n=17)	IC 95%	C3 (n=26)	IC 95%	R (n=71)	IC 95%
<b>Sensibilidade (%)</b>	100,0	77,9 -101,1	100,0	98,3 -101,7	100,0	98,3 -101,7	98,4	96,7 -100,1
<b>Especificidade (%)</b>	89,5	77,9 -101,1	100,0	88,4 -111,6	40,0	28,4 - 51,6	85,7	74,1 - 97,3
<b>VPP (%)</b>	91,3	89,6 - 93,0	100,0	98,3 -101,7	87,5	85,8 - 89,2	98,4	96,7-100,1
<b>VPN (%)</b>	100,0	94,2 -105,9	100,0	94,2 -105,9	100,0	94,2 -105,9	85,7	79,9 -111,6
<b>AC (%)</b>	95,0	91,7 - 98,3	100,0	96,7 -103,3	88,5	85,2 - 91,8	97,2	93,9 -100,5

Legenda: VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, AC: acurácia, IC: intervalo de confiança, C1, C2, C3: grupos de gatos com lesões cutâneas, respectivamente, em apenas uma, duas ou pelo menos três localizações distintas e não adjacentes, ambos com ausência de sinais de acometimento respiratório, R: grupo de gatos com, pelo menos, uma lesão cutânea e sinais de acometimento respiratório.

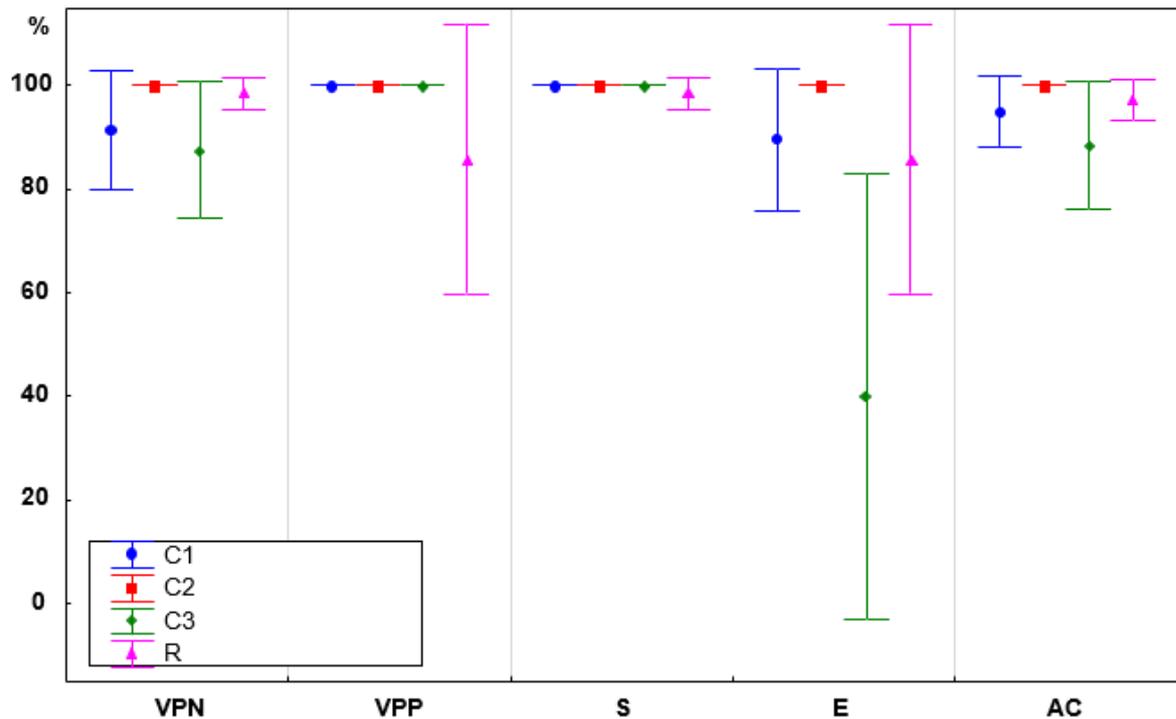


Figura 6 – Valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos, acurácia e os respectivos intervalos de confiança (95%) do exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica de Panótico Rápido para diagnóstico da esporotricose felina, estratificados por grupos de animais do estudo. Legenda: E: especificidade, S: sensibilidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, AC: acurácia.

De acordo com a análise morfológica, todas as 121 amostras com crescimento fúngico sugestivo de *Sporothrix* foram identificadas como pertencentes a este gênero (Figura 7). Aos 14 dias de incubação, as colônias apresentavam textura com superfície ligeiramente enrugada, com micélio aéreo rasteiro e pigmentação branca (Figura 7A), bege claro (Figura 7B), marrom (Figura 7C) a marrom-enegrecida (Figura 7D). Na micromorfologia (Figuras 8A e 8B) foi possível observar hifas hialinas delgadas, septadas e ramificadas, além de conídios pequenos, hialinos e demáceos, com pouca variação entre os isolados. Havia, ainda, conídios sésseis, aderidos diretamente ao longo das hifas, ou em uma disposição simpodial, em uma pequena dilatação apical do conidióforo, conferindo aspecto de margarida.

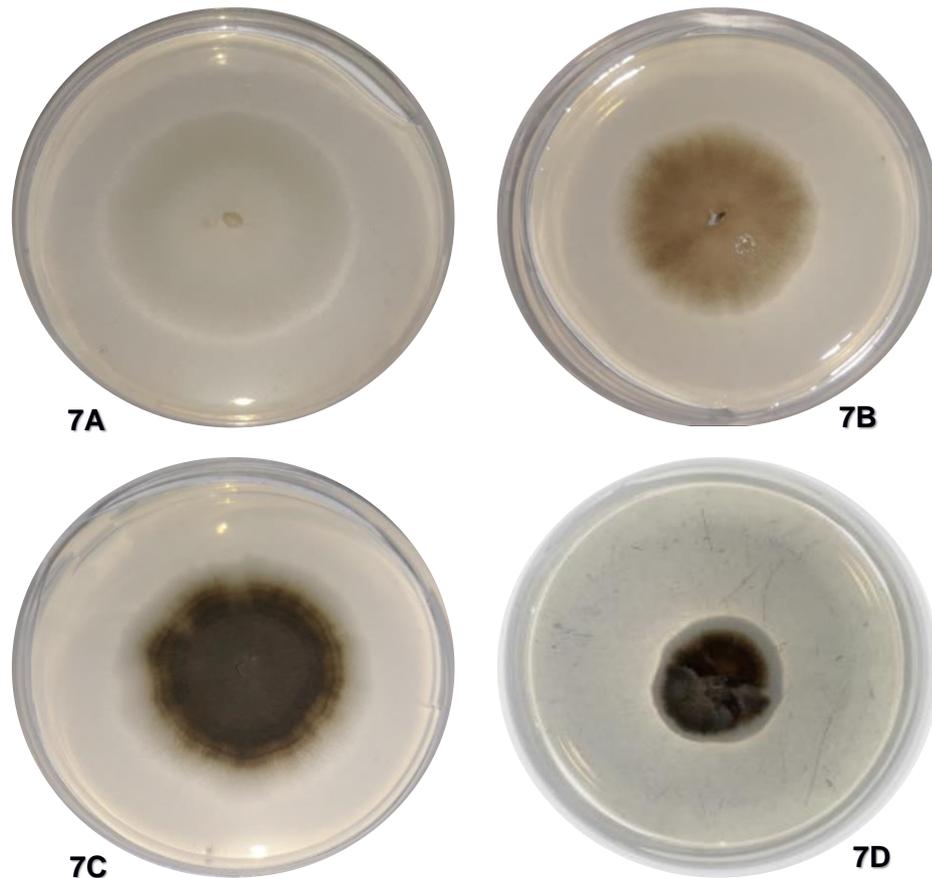


Figura 7 – Aspectos macromorfológicos de colônias sugestivas de *Sporothrix* spp., em ágar PDA (25 °C): colônias com 14 dias de incubação, pigmentação branca (7A), bege claro (7B), marrom (7C) a marrom-enebecida (7D).

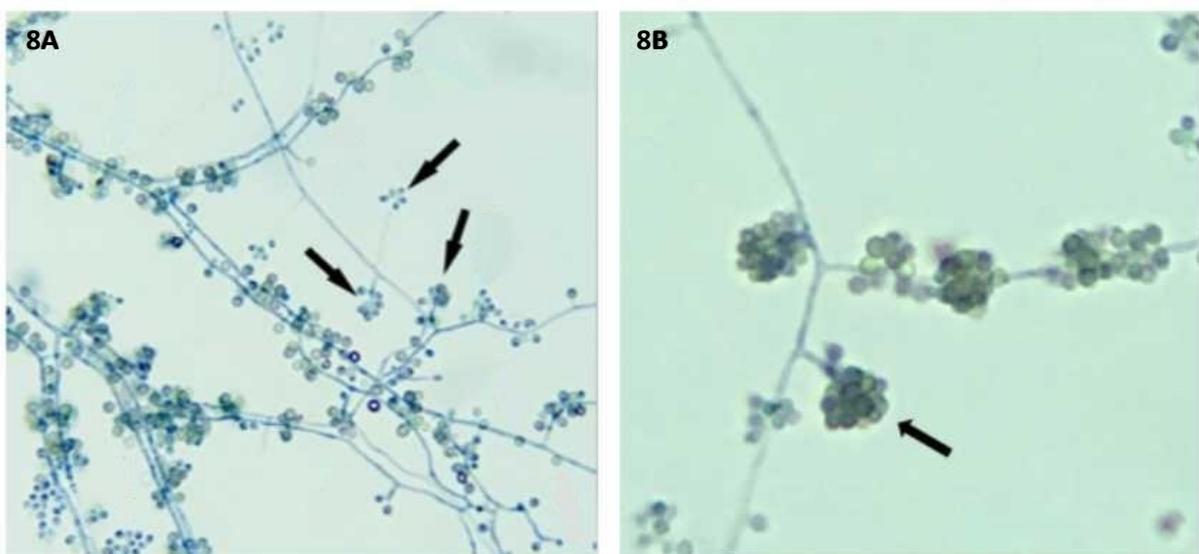


Figura 8 – Aspectos micromorfológicos de colônias sugestivas de *Sporothrix* spp. (25°C): destaque para o aspecto de “margarida” característico do conidióforo (setas) (8A e 8B).

Durante a fase de reativação das colônias positivas armazenadas no CIMM, 112 de 121 isolados (92,5%) estavam viáveis e apresentaram crescimento satisfatório, sendo submetidas à análise molecular por meio de PCR espécie-específica. Todos os isolados (100%) foram identificados como *S. brasiliensis* conforme podemos observar na Figura 9.

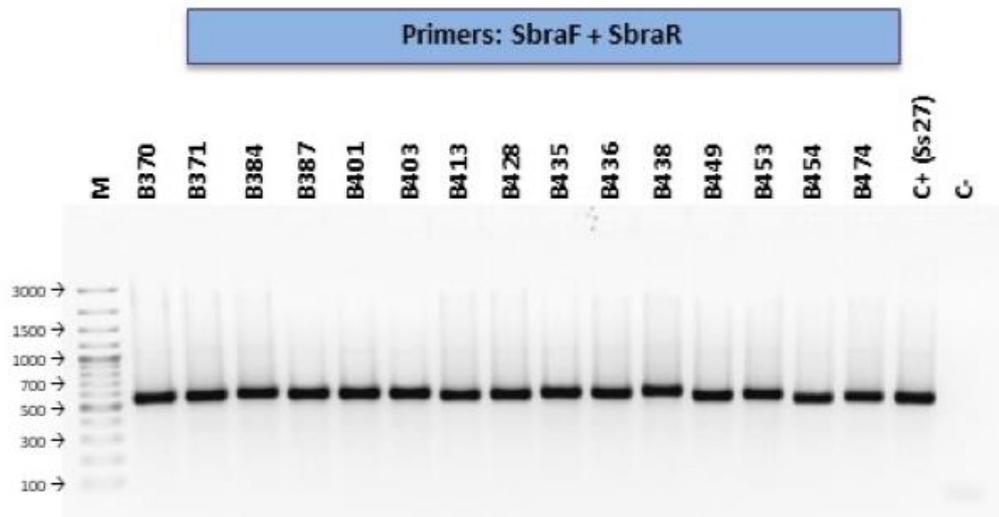


Figura 9 – Gel de agarose exibindo padrão genotípico de isolados de *Sporothrix* com DNA amplificado pela técnica de PCR espécie-específica, com aproximadamente 469pb, compatíveis com *S. brasiliensis*. Legenda - Sbra: *Sporothrix brasiliensis*; F: *primer forward*; R: *primer reverse*; M: Marcador de peso molecular; Ss27: cepa referência; C+: Controle Positivo; C-: Controle Negativo.

Em relação ao banco de imagens relacionado a lesões de felinos acometidos por esporotricose, foram descritas 11 imagens com lesões representativas de diferentes apresentações clínicas na forma cutânea da doença. Para o banco de lâminas, confeccionadas pela técnica de *imprint* associada ao Panótico Rápido, foram descritas um total de 10 lâminas positivas, além de uma negativa. Ambos podem ser acessados através de *QRcode* e *links* compartilháveis (Figuras 10A e 10B, respectivamente).



Figura 10 – Banco de imagens de acesso público por meio da plataforma *Padlet*: 10A) descrições de diferentes apresentações clínicas da esporotricose felina na forma cutânea. Acesso em: <https://padlet.com/brediquieri/2w5pegjmrr447ily>; 10B) lâminas confeccionadas pela técnica de *imprint*, associada ao Panótico Rápido, com a descrição de lâminas positivas com diferentes graus de carga fúngica e de processo inflamatório associado, além de uma lâmina negativa. Acesso em: <https://padlet.com/brediquieri/Bookmarks>

## 5 DISCUSSÃO

A esporotricose vem se apresentando como um importante problema de saúde pública no Brasil. Embora muitos trabalhos abordando a epidemiologia clínica e o diagnóstico da doença tenham sido descritos em diferentes estados, o ES carece de trabalhos que auxiliem a esclarecer sua ocorrência nesta região (GREMIÃO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; GUTIERREZ-GALHARDO *et al.*, 2015; BAZZI *et al.*, 2016; ALZUGUIR *et al.*, 2020; FALCÃO *et al.*, 2020).

Dentre os resultados obtidos, os dados clínico-epidemiológicos da população de animais incluídos corroboram aqueles descritos por outros autores, sendo a maioria dos gatos machos, não-esterilizados, de hábitos semidomiciliares, em fase adulta, advindos de área urbana e com tutor responsável (MADRID *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2014; BOECHAT *et al.*, 2018; LECCA *et al.*, 2020). Esse perfil de animal é mais propício a se envolver em brigas e se contaminar. Somente quatro gatos de área rural, com suspeita de esporotricose, foram incluídos neste estudo. No entanto, foram todos descartados no diagnóstico utilizando a cultura fúngica, reafirmando o atual caráter urbano de ocorrência da doença, tanto em humanos, quanto em animais. Interessante ressaltar que, na maioria dos casos, havia um tutor responsável pelos animais. No entanto, a maior parte dos gatos tinha acesso à rua, demonstrando as dificuldades em restringirem o acesso dessa espécie animal à área externa. Os dados deixam evidente que há necessidade de uma maior disseminação das práticas de posse responsável. Além disso, o maior percentual de imóveis onde havia outros animais contatantes, alerta para o risco de disseminação intradomiciliar da doença. Todas essas características podem ser associadas a problemas ambientais de saneamento básico, socioeconômicos e de aglomeração urbana, contribuindo para a expansão da esporotricose nas cidades (GREMIÃO *et al.*, 2020b).

Em 2016, foram registrados os primeiros relatos do surgimento da esporotricose felina, com súbito aumento na incidência desde então. No entanto, esse evento foi observado em municípios do sul do ES, principalmente Piúma e Anchieta. Neste trabalho, muitos casos da doença foram observados na Grande Vitória e na região Norte. Estes dados, somados aos registros da SESA-ES, por meio do

FormSUS, demonstram que a esporotricose felina vem se disseminando rapidamente por todo o estado (ESPÍRITO SANTO, [s.d.] Acesso em: 31 janeiro. 2021.).

A maioria dos animais avaliados nunca havia apresentado lesões cutâneas sugestivas de esporotricose, segundo seus tutores. Esse dado sugere que a doença tem avançado para regiões onde, possivelmente, ainda não ocorria, reforçando ainda mais a observação do processo de emergência da esporotricose felina no estado. Com relação ao tempo de evolução do quadro clínico até o momento da abordagem pelo médico veterinário responsável, os sinais clínicos haviam iniciado há pelo menos uma semana, período em que é provável que tenha ocorrido o agravamento das condições clínicas e a contaminação de pessoas e, principalmente, de outros animais. Este dado é semelhante ao encontrado por Sanchotene *et al.* (2015), em que apenas 21,2% dos animais foram diagnosticados antes de 30 dias de evolução da doença. Um atraso na identificação dos casos também foi observado por Pereira *et al.* (2014), em que o tempo médio decorrido desde o início dos sinais cutâneos até o primeiro atendimento clínico foi de oito semanas. Esses dados reforçam a importância da educação em saúde da população, para que saiba identificar os casos suspeitos e busque o atendimento veterinário o quanto antes. O diagnóstico precoce contribui para um melhor prognóstico dos gatos, permitindo a instituição do tratamento ainda na fase inicial da doença, reduzindo também as chances de abandono do protocolo terapêutico e a contaminação de outros indivíduos (CHAVES *et al.*, 2013; RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015, 2018).

Schubach *et al.* (2004), em um dos mais importantes estudos retrospectivos sobre os aspectos clínico-epidemiológicos da epidemia de esporotricose felina no Rio de Janeiro, observaram sinais clínicos de acometimento do trato respiratório em 44,4% (n=347) dos casos, percentual similar ao encontrado neste trabalho e que foi classificado como Grupo R. Esta característica clínica também teve alta frequência em outros trabalhos (GREMIÃO *et al.*, 2014; SANCHOTENE *et al.*, 2015; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018b). Dentre os grupos sem sinais de acometimento respiratório, o Grupo C1, formado pelos animais com lesões em somente uma região do corpo, foi o maior, diferentemente do observado por Miranda *et al.* (2013), Schubach *et al.* (2004) e Silva *et al.* (2015), em que foram mais frequentes os animais apresentando a forma disseminada da doença, com lesões cutâneas em pelo menos três locais do corpo.

As lesões cutâneas ulceradas tiveram maior ocorrência nos gatos, seguidas das lesões crostosas, em concordância com o observado por Madrid *et al.* (2010), Bazzi *et al.* (2016) e Duangkaew *et al.* (2019). Vale ressaltar que 62 (40,2%) animais apresentavam pelo menos dois dos tipos de lesão, dentre ulceradas, crostosas ou papulares, demonstrando o aspecto clínico variado da doença nesta espécie animal. Presença de secreção e prurido foram características pouco incidentes neste trabalho. Macêdo-Sales *et al.* (2018b) registraram resultados concordantes em relação à baixa presença de secreção, mas, discordantes na frequência de prurido. No entanto, no estudo citado não houve diferença significativa na ocorrência deste sinal clínico entre grupos de animais com e sem esporotricose.

A cabeça é a região mais frequentemente acometida por lesões cutâneas na esporotricose felina (Werner e Werner (1994) e Rodrigues *et al.* (2018)), aspecto clínico frequentemente observado neste trabalho. Os membros torácicos e pélvicos também estavam constantemente acometidos, muito provavelmente devido à maior exposição durante as brigas com outros animais. Outras localizações, como pescoço, tórax, quadril, abdome e cauda foram observadas e podem estar relacionadas ao hábito dos felinos de se lamberem, disseminando os fungos presentes nas lesões para outras regiões do corpo (GREMIÃO *et al.*, 2020b).

Em uma das 33 amostras negativas na cultura fúngica, houve crescimento de *Cryptococcus neoformans* em uma delas. No diagnóstico citopatológico, esta amostra também foi considerada negativa para *Sporothrix* spp. e sugestiva para *C. neoformans* por ambos os observadores, sem maiores complicações no diagnóstico diferencial. Alguns autores alertam para a similaridade entre estes microrganismos no EMD, e com *Histoplasma capsulatum*, com a possibilidade de diagnósticos incorretos. Capacitações e treinamentos dos profissionais responsáveis pelo diagnóstico podem mitigar tais riscos (PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015).

O grau de concordância entre os observadores, considerado excelente neste trabalho ( $kappa = 0,96$ ,  $p < 0,0001$ ), com apenas dois resultados discordantes, foi mais alto que o descrito por Silva *et al.* (2015) ( $kappa = 0,61$ ), em trabalho semelhante. Isso demonstra boa reprodutibilidade do EMD quando executado por diferentes investigadores.

Sobre os parâmetros de acurácia em relação à cultura fúngica, os seis casos diagnosticados como falsos-negativos podem estar relacionados a diversos fatores, entre eles: lâminas produzidas a partir de lesões pouco ou não ulceradas. Nessa condição, as lesões trazem pouca quantidade de exsudado, o que dificulta a pesquisa por células leveduriformes. Além disso, cepas menos virulentas de *Sporothrix*, associadas a boa resposta imunológica do hospedeiro e, ainda, um possível uso recente de antifúngicos, ocultado pelo tutor, podem estar relacionados à redução da carga fúngica. Tal alteração influencia diretamente na sensibilidade do teste diagnóstico, gerando resultados falsos-negativos. O único caso falso-positivo observado neste estudo pode estar relacionado ao fato de que a cultura fúngica não apresenta 100% de sensibilidade, sendo o crescimento das colônias inibido por contaminação da amostra por microrganismos ambientais. Ademais, má coleta, transporte e armazenamento inadequados, bem como uso recente de antifúngicos, omitido pelos tutores, pode gerar esse resultado (SILVA et al., 2015, 2018). Segundo Silva et al. (2015), pode haver confusão com outros microrganismos semelhantes, como dito anteriormente, ocasionando resultados falsos-positivos.

Ainda sobre os resultados de acurácia do exame citopatológico, este trabalho obteve uma sensibilidade geral de 95,0% (91,2 - 98,9; IC 95%), significativamente superior ao já descrito na literatura (52,6 a 87,0%) (MACÊDO-SALES et al., 2018a; SILVA et al., 2018). A alta sensibilidade pode estar relacionada à boa qualidade das lâminas produzidas durante esta pesquisa, bem como aos critérios de escolha da lesão cutânea de maior diâmetro, ulcerada e apresentando exsudato.

A sensibilidade e a especificidade do EMD de amostras teciduais permanecem pouco estudadas, já que muitos pesquisadores o consideram de pouca utilidade diagnóstica em humanos, devido à escassez de células fúngicas nas lesões de esporotricose (CIVILA et al., 2004). No entanto, neste trabalho, o exame citopatológico por *imprint*, associado ao método de coloração Panótico Rápido, demonstrou ser um recurso prático, rápido, acurado e reprodutível. Portanto, uma ferramenta de grande auxílio no diagnóstico da esporotricose felina, espécie mais envolvida na transmissão zoonótica da doença (WELSH, 2003; SILVA et al., 2015). O método manteve sua eficácia, independentemente do grau de disseminação cutânea da doença nos gatos.

Atualmente, o ES vive uma crescente epidemia de esporotricose felina. Entretanto, poucos municípios contam com um estabelecimento de saúde pública responsável pela vigilância e pelo controle de zoonoses (BRASIL, [s.d.]. Acesso em: 02 maio. 2021). Dentre eles, há pouca ou nenhuma estrutura física e técnica para o diagnóstico laboratorial de doenças, como a esporotricose. Há escassez de recursos financeiros, e ainda, a não-priorização deste tipo de ação por parte da gestão pública. Considerando esta realidade, alternativas mais complexas e exigentes para o diagnóstico da esporotricose felina como a cultura fúngica, a histopatologia e os testes sorológicos parecem inviáveis como medidas de saúde pública. Nesse sentido, fica clara a importância do exame citopatológico, associado ao panótico rápido, no contexto de epidemia no Estado, sendo uma opção simples e barata para diagnóstico de gatos doentes, principais disseminadores do *Sporothrix*.

Segundo Gremião *et al.* (2020b), um programa nacional de vigilância e controle da esporotricose, humana e animal, é essencial para o sucesso no enfrentamento desta epidemia que ultrapassa fronteiras, inclusive internacionais. O diagnóstico precoce, o acesso ao tratamento gratuito, a educação da população sobre o tema e dos profissionais de saúde no atendimento a casos suspeitos em animais e pessoas estão entre ações fundamentais. A extensão territorial do Brasil, bem como de suas fronteiras, dificulta a fiscalização e o controle do transporte de animais de estimação, apesar da exigência de certificados sanitários dos animais para viagens nacionais e do certificado veterinário internacional (CVI), para viagens a outros países (BRASIL, [s.d.]. Acesso em: 19 maio. 2020). Um recente relato de casos de transmissão zoonótica de esporotricose, no Paraguai, por um gato trazido de uma região endêmica do Brasil, e de casos da doença zoonótica por *S. brasiliensis*, na Argentina, reforçam a necessidade da preocupação com o transporte de animais (GARCÍA DUARTE *et al.*, 2017; CÓRDOBA *et al.*, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2020).

Na análise macro e micromorfológica, as colônias de *Sporothrix* apresentaram características muito variadas, o que impossibilitou a identificação dos isolados em nível de espécie. Esses achados corroboram dados da literatura que descrevem que a identificação acurada da espécie só é possível por meio das técnicas moleculares (RODRIGUES; DE HOOG; CAMARGO, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2020).

De acordo com os resultados moleculares, em que 100% (112/112) dos isolados dos felinos submetidos à análise foram caracterizados como *S. brasiliensis*, podemos observar o evidente destaque desta espécie de *Sporothrix* na etiologia da esporotricose felina no ES, assim como já relatado por diversos outros autores em outros estados brasileiros (PEREIRA *et al.*, 2014; SANCHOTENE *et al.*, 2015; BOECHAT *et al.*, 2018; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2018; CRUZ-BAHIENSE ROCHA *et al.*, 2020; GREMIÃO *et al.*, 2020b). Como podemos observar, não foi possível reativar 9 isolados, ou seja, depois de armazenados na nossa micoteca por meio da técnica de Castellani (1939), eles não cresceram nos meios de cultura convencionais. Apesar de trabalharmos com fungos armazenados há mais de 5 anos utilizando essa técnica, várias hipóteses poderiam explicar esse evento. No entanto, a mais plausível está relacionada a temperatura. Os isolados armazenados devem ser mantidos a temperatura ambiente, ou seja, 25°C. No entanto, nosso laboratório não é climatizado 24 horas. Considerando o clima de nossa região, temperaturas acima de 37°C já foram registradas. De acordo com Marimon *et al* (2007), cepas de *S. brasiliensis* não sobrevivem a 40°C.

Assim como descrito por Rodrigues e colaboradores (2015), a técnica de PCR espécie-específica, utilizada na caracterização molecular dos isolados de *Sporothrix*, é a abordagem mais rápida e eficiente quando comparada a outros ensaios como a PCR-RFLP e o sequenciamento do DNA. Além disso, apresenta resultados com alta sensibilidade, confiabilidade e praticidade, com menor custo (RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2015; NAKASU *et al.*, 2020).

Embora o *S. brasiliensis* esteja íntimamente relacionado com a doença nos gatos, vale ressaltar que, no Brasil e em outras partes do mundo, *S. schenckii* s. str., *S. globosa*, *S. pallida* e *S. humicola* já foram identificados em casos de esporotricose em felinos. Esse fato reforça a importância da investigação molecular da esporotricose felina realizada neste trabalho (RODRIGUES *et al.*, 2013; KANO *et al.*, 2015a, 2015b; HAN *et al.*, 2017; THOMSON *et al.*, 2019; HAN; KANO, 2020; KAMAL AZAM *et al.*, 2020; MAKRI *et al.*, 2020).

A ferramenta *Padlet*, utilizada na montagem do banco digital de imagens, é de execução simples e intuitiva, além de ser gratuita e de acesso rápido em qualquer dispositivo com internet, como celulares e *tablets*. O banco de imagens elaborado

poderá ser bastante útil como fonte de consulta rápida, tanto para fins didáticos, quanto de orientação a médicos veterinários no diagnóstico da esporotricose felina. É possível observar a variedade de apresentações clínicas dos animais e de perfis de lâminas produzidas na técnica utilizada. Este é o primeiro banco brasileiro de imagens caracterizando a esporotricose felina do ponto de vista clínico, retratando a diversidade das lesões e os possíveis achados microscópicos através do diagnóstico citopatológico.

Os resultados obtidos nesta pesquisa básica aplicada são de grande relevância para o serviço público de saúde, não somente estadual, mas em âmbito nacional. A descrição das características clinico-epidemiológicas da esporotricose felina no ES e a identificação das espécies dos isolados de *Sporothrix* agrupados neste trabalho, oriundos do ES, nos permitiram conhecer mais sobre a epidemiologia desta zoonose na região. Ademais, demonstramos que o exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica do Panótico Rápido, para o diagnóstico da esporotricose felina, pode ser empregado com excelente nível de segurança e confiabilidade, sobretudo em surtos e epidemias, independentemente do grau de disseminação da doença nos animais. Vale salientar que esta técnica é única ferramenta acessível na maioria das unidades de vigilância de zoonoses municipais.

## 6 CONCLUSÃO

- O exame citopatológico por *imprint*, associado à técnica do Panótico Rápido, demonstrou alto grau de confiabilidade para o diagnóstico da esporotricose felina, independentemente da gravidade do quadro clínico.
- As características clínico-epidemiológicas da esporotricose felina no ES são semelhantes às descritas em outros estados.
- A avaliação macro e micromorfológica foram insuficientes para a identificação em nível de espécies dentro do gênero *Sporothrix*.
- A técnica de PCR espécie-específica, usando como alvo o gene da *CAL*, foi capaz de identificar *S. brasiliensis* de forma rápida e com baixo custo.
- *S. brasiliensis* parece ser o único agente da esporotricose felina no Estado do ES.
- O banco digital de imagens com acesso público é uma ferramenta importante que poderá auxiliar no diagnóstico clínico, assim como servir de base de apoio educacional.

## REFERÊNCIAS

- AJELLO, L.; KAPLAN, W. A New Variant of *Sporothrix Schenckii*. **Mycoses**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 633–644, 1969. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1969.tb03423.x.
- ALBERICI, F. *et al.* *Sporothrix schenckii* var *luriei* as the cause of sporotrichosis in Italy. **Eur. J. Epidemiol.**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 173–177, 1989.
- ALZUGUIR, C. L. C. *et al.* Geo-epidemiology and socioeconomic aspects of human sporotrichosis in the municipality of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, between 2007 and 2016. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 114, n. 2, p. 99–106, 2020. DOI: 10.1093/trstmh/trz081.
- ARAÚJO, M. L. *et al.* Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, [S. l.], v. 58, n. 8, p. 485–490, 2015. DOI: 10.1111/myc.12346.
- BACHMEYER, C. *et al.* Fixed cutaneous sporotrichosis: An unusual diagnosis in West Europe. **Clinical and Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 479–481, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2230.2006.02108.x.
- BAPTISTA, V. S. *et al.* Promising application of the SsCBF ELISA test to monitor the therapeutic response of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* from Brazilian epidemics. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00362-6.
- BARILE, F. *et al.* Cutaneous sporotrichosis in the period 1978-1992 in the province of Bari, Apulia, Southern Italy. **Mycoses**, [S. l.], v. 36, n. 5–6, p. 181–185, 1993. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00747.x.
- BARONI, A. *et al.* Sporotrichosis: Success of itraconazole treatment. **Le Jacq**, [S. l.], p. 41–44, 2007. Disponível em: [www.lejacq.com](http://www.lejacq.com).
- BAZZI, T. *et al.* Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 303–311, 2016. DOI: 10.1590/S0100-736X2016000400009.
- BOECHAT, J. S. *et al.* Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 113, n. 3, p. 185–196, 2018. DOI: 10.1590/0074-02760170407.
- BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2017. DOI: 10.3390/jof3010006.
- BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A. M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **JDDG - Journal of the German Society of Dermatology**, [S. l.], v. 8, n. 8, p. 619–628, 2010. DOI: 10.1111/j.1610-0387.2010.07453.x.

BORBA-SANTOS, L. P. *et al.* Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 178–188, 2015. DOI: 10.1093/mmy/myu056.

BORGES, T. S. *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the claws of domestic cats (indoor and outdoor) and in captivity in São Paulo (Brazil). **Mycopathologia**, [S. l.], v. 176, n. 1–2, p. 129–137, 2013. DOI: 10.1007/s11046-013-9658-8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Viajar com animais de estimação — Português (Brasil). [s.d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/vigilancia-agropecuaria/animais-estimacao>. Acesso em: 19 maio. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde. [s.d.]. Disponível em: <http://cnes.datasus.gov.br/>. Acesso em: 2 fev. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 264, de 17 de fevereiro de 2020 -e - Brasília, 2020. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264\\_19\\_02\\_2020.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html). Acesso em: 19 maio. 2020.

BRAVO, T. C. New observations on the epidemiology of sporotrichosis and *Sporothrix schenckii* complex. **Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**, [S. l.], v. 59, n. 2, p. 88–100, 2012.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 145–149, 2001. DOI: 10.1097/00001432-200104000-00006.

CAMACHO, E. *et al.* Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC Infectious Diseases**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 1–10, 2015. DOI: 10.1186/s12879-015-0839-6.

CAMPOS, P.; ARENAS, R.; CORONADO, H. Epidemic cutaneous sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 38–41, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-4362.1994.tb01491.x.

CARMICHAEL, J. W. *Chrysosporium* and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, [S. l.], v. 40, p. 1149, 1962.

CARVALHO, J. A. *et al.* Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, [S. l.], v. 14, n. 7, p. e0008330, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008330.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 1939; 24:270-6.

CAUS, A. L. O. *et al.* Epidemiological and clinical aspects of sporotrichosis in Espírito Santo State, southeast Brazil: A study of three decades (1982–2012). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 706–713, 2019.

DOI: 10.4269/ajtmh.18-0667.

CDC - USA. Epidemiologic notes and reports multistate outbreak of sporotrichosis in seedling handlers. 1988. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00001295.htm>. Acesso em: 10 maio. 2020.

CDC - USA. One Health basics: One Health. [s.d.]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>. Acesso em: 24 maio. 2020.

CDC - USA. *Sporothrix brasiliensis*: Fungal Diseases | CDC. [s.d.]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/sporotrichosis/brasiliensis.html>. Acesso em: 19 maio. 2020.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 3–14, 2014. DOI: 10.1093/mmy/myu062.

CHAVES, A. R. *et al.* Treatment abandonment in feline sporotrichosis - study of 147 cases. *Zoonoses and Public Health*, [S. l.], v. 60, n. 2, p. 149–153, 2013. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2012.01506.x.

CHEN, M. *et al.* Epidemiology of fungal infections in China. **Frontiers of Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 58–75, 2018. DOI: 10.1007/s11684-017-0601-0.

CIVILA, E. S. *et al.* Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 43, n. 11, p. 808–810, 2004. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2004.02271.x.

CLINKENBEARD, K. D. Diagnostic cytology: sporotrichosis. **The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian (USA)**, [S. l.], v. v. 13, n. 2, p. 207–211, 1991.

CÓRDOBA, S. *et al.* Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii sensu lato* isolated in Argentina. **Mycoses**, [S. l.], v. 61, n. 7, p. 441–448, 2018. DOI: 10.1111/myc.12760.

COSTA, M. C. *et al.* Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. **New Microbes and New Infections**, [S. l.], v. 29, p. 100496, 2019. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.11.004.

CRISEO, G. *et al.* Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: A case report from extreme southern Italy. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 166, n. 3, p. 159–162, 2008. DOI: 10.1007/s11046-008-9121-4.

CRUZ-BAHIENSE ROCHA, I. da. *et al.* Molecular-based assessment of diversity and population structure of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Espírito Santo-Brazil. **Mycoses**, [S. l.], p. myc.13230, 2020. DOI: 10.1111/myc.13230. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/myc.13230>. Acesso em: 22 dez. 2020.

DAVIS, B. A. Sporotrichosis. [S. l.], v. 14, n. 1, p. 69–76, 1996.

DE BEER, Z. *et al.* Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, England, v. 95, n. 3, p. 434–441, 2003.

DE BEURMANN, L.; MACKENNA, R. W. On sporotrichosis. **The British Medical Journal**, [S. l.], v. 2, n. 2693, p. 289–296, 1912. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/25298134>.

DE HOOG, G. S. *et al.* Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. **Journal of Clinical Microbiology**, American Society for Microbiology, 2015. DOI: 10.1128/JCM.02016-14.

DIAS, N. M. *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 17, n. 10, p. 1975–1976, 2011. DOI: 10.1128/AAC.01012-07.

DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 108, n. 2, p. 113–116, 1989. DOI: 10.1007/BF00436061.

DIXON, D. M. *et al.* Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 1106–1113, 1991. DOI: 10.1128/jcm.29.6.1106-1113.1991.

DOOLEY, D. P.; BOSTIC, P. S.; BECKIUS, M. L. Spook house sporotrichosis: A point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. **Archives of Internal Medicine**, [S. l.], v. 157, n. 16, p. 1885–1887, 1997. DOI: 10.1001/archinte.157.16.1885.

DUANGKAEW, L. *et al.* Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical Mycology Case Reports**, [S. l.], v. 23, p. 46–49, 2019. DOI: 10.1016/j.mmcr.2018.12.003.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [S. l.], v. 61, n. 10, 2017. DOI: 10.1128/AAC.01057-17.

ESPINEL-INGROFF, A. History of medical mycology in the United States. *In*: **Clinical Microbiology Reviews**. [s.l.: s.n.]. v. 9p. 235–272. DOI: 10.1128/cmr.9.2.235-272.1996.

ETCHECOPAZ, A. N. *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de Mycologie Medicale**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 100908, 2020. DOI: 10.1016/j.mycmed.2019.100908. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.100908>.

FALCÃO, E. M. M. *et al.* Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 141–143, 2020. DOI:

10.1093/mmy/myz024.

FALQUETO, A.; MAIFREDE, S. B.; RIBEIRO, M. A. Unusual clinical presentation of sporotrichosis in three members of one family. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 434–438, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-4632.2011.5085.x.

FERNANDES, G. F. *et al.* Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, [S. l.], v. 147, n. 3–4, p. 445–449, 2011. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.07.007.

FERREIRA, P. G. *et al.* Investigation of a Microemulsion Containing Clotrimazole and Itraconazole for Transdermal Delivery for the Treatment of Sporotrichosis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 109, n. 2, p. 1026–1034, 2020. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.10.009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.009>.

FREITAS, D. F. S. *et al.* Sweet syndrome associated with sporotrichosis. **British Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 166, n. 1, p. 212–213, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2133.2011.10496.x.

GALHARDO, M. C. G. *et al.* Erythema nodosum associated with sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 41, p. 114–116, 2002.

GARCÍA DUARTE, J. M. *et al.* Sporotrichosis transmitted by domestic cat. A family case report. **Del Nacional**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 67–76, 2017. DOI: 10.18004/rdn2017.0009.02.067-076.

GEORG, L. K. Details - Public Health Image Library(PHIL). 1964. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3063>. Acesso em: 28 set. 2020.

GIUFFRIDA, R. *et al.* Pulse itraconazole in the treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: A case report from Southern Italy and review of the literature. **Dermatologic Therapy Blackwell Publishing Inc.**, 2020. DOI: 10.1111/dth.13716.

GONSALES, F. F. *et al.* Direct PCR of lesions suggestive of sporotrichosis in felines. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], v. 72, n. 5, p. 2001–2006, 2020. DOI: 10.1590/1678-4162-11743. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11743>. Acesso em: 23 jan. 2021.

GONSALES, F. F. *et al.* Feline *Sporothrix* spp. detection using cell blocks from brushings and fine-needle aspirates: Performance and comparisons with culture and histopathology. **Veterinary Clinical Pathology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 143–147, 2019. DOI: 10.1111/vcp.12708.

GORDHAN, A. *et al.* Disseminated cutaneous sporotrichosis: A marker of osteoarticular sporotrichosis masquerading as gout. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 717–719, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-4362.2001.01300.x.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], 2020. a. DOI: 10.1007/s42770-020-00365-3.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 346–351, 2011. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2011.00804.x.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 15–21, 2014. DOI: 10.1093/mmy/myu061.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 621–624, 2020. b. DOI: 10.3201/eid2603.190803.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS Pathogens**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 2–8, 2017. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006077.

GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.: s.n.]. v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999. DOI: 10.1128/cmr.12.3.454.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. *et al.* Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. **Current Fungal Infection Reports**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 238–245, 2015. DOI: 10.1007/s12281-015-0237-y.

HAN, H. S. *et al.* Comparison of two in vitro antifungal sensitivity tests and monitoring during therapy of *Sporothrix schenckii sensu stricto* in Malaysian cats. **Veterinary Dermatology**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 156-e32, 2017. DOI: 10.1111/vde.12417.

HAN, H. S.; KANO, R. Feline sporotrichosis in Asia. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00274-5.

HAJJEH, R. *et al.* Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 176, n. 2, p. 499–504, 1997. DOI: 10.1086/514070. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/514070>.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 77–89, 1900.

HONSE, C. O. *et al.* Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 166, n. 7, p. 208–209, 2010. DOI: 10.1136/vr.b4768.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 464–469, 1961. DOI: 10.1128/jb.81.3.464-469.1961.

ITL 100 mg: o antifúngico para cães e gatos | Petz. [s.d.]. Disponível em: [https://www.petz.com.br/produto/itl-100mg-cepav-10-capsulas-77125?utm\\_source=google&utm\\_medium=flp&gclid=Cj0KQCQjwyN-DBhCDARIsAFOELTIlfNYGireVI2xcd4ac-9uqunOeIIIngVrIRvYoOGC4j8nSqRnK728waAICEEALw\\_wcB](https://www.petz.com.br/produto/itl-100mg-cepav-10-capsulas-77125?utm_source=google&utm_medium=flp&gclid=Cj0KQCQjwyN-DBhCDARIsAFOELTIlfNYGireVI2xcd4ac-9uqunOeIIIngVrIRvYoOGC4j8nSqRnK728waAICEEALw_wcB). Acesso em: 16 abr. 2021.

JAHAM, C. D.; PARADIS, M.; PAPICH, M. G. Antifungal dermatologic agents: azoles and allylamines. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, [S. l.], v. 22, n. 6, p. 548–559, 2000.

KAADAN, M. I. *et al.* One health education for future physicians: a case report of cat-transmitted sporotrichosis. **Oxford University Press**, [S. l.], p. 1–40, 2020.

KAMAL AZAM, N. K. *et al.* Molecular epidemiology of *Sporothrix schenckii* isolates in Malaysia. **Medical mycology**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 617–625, 2020. DOI: 10.1093/mmy/myz106.

KANO, R. *et al.* Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 156, n. 15, p. 484–485, 2005. DOI: 10.1136/vr.156.15.484.

KANO, R. *et al.* Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. **Mycoses**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 220–224, 2015. a. DOI: 10.1111/myc.12302.

KANO, R. *et al.* The MAT1-1:MAT1-2 Ratio of *Sporothrix globosa* Isolates in Japan. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 179, n. 1–2, p. 81–86, 2015. b. DOI: 10.1007/s11046-014-9808-7.

KAUFFMAN, C. A. State of the art clinical article: sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 48105, n. 29, p. 231–237, 1999.

KAUFFMAN, C. A. *et al.* Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 1255–1265, 2007. DOI: 10.1086/522765.

LACERDA FILHO, A. M. *et al.* High-virulence cat-transmitted ocular sporotrichosis. **Mycopathologia Springer Netherlands**, , 2019. DOI: 10.1007/s11046-019-00347-6.

LARSSON, C. E. Sporotrichosis. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 250–259, 2011. DOI: 10.1016/j.medcli.2015.01.027.

LARSSON, C. E. *et al.* Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonóticos. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 351–358, 1989.

LECCA, L. O. *et al.* Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 176, 2020. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.104939.

LERNER, H.; BERG, C. A comparison of three holistic approaches to health: one health, ecohealth, and planetary health. **Frontiers in Veterinary Science**, [S. l.], v. 4, n. SEP, p. 1–7, 2017. DOI: 10.3389/fvets.2017.00163.

LING, J. L. L. *et al.* A case of acute granulomatous conjunctivitis caused by cat-transmitted *Sporothrix schenckii*. **Cureus**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 8–12, 2018. DOI: 10.7759/cureus.3428.

LIU, T. T.; ZHANG, K.; ZHOU, X. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University: Science B**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 100–108, 2014. DOI: 10.1631/jzus.B1300136.

LOPES-BEZERRA, L. M. *et al.* Sporotrichosis between 1898 and 2017: the evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 56, n. March, p. S126–S143, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx103.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 293–308, 2006.

LÓPEZ-ROMERO, E. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. **Future Microbiology**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–18, 2011.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, [S. l.], v. 21, p. 433–450, 1907. DOI: 10.7476/9788575412831.

MACÊDO-SALES, P. A. *et al.* Coinfection of domestic felines by distinct *Sporothrix brasiliensis* in the Brazilian sporotrichosis hyperendemic area. **Fungal Genetics and Biology**, [S. l.], v. 140, 2020. DOI: 10.1016/j.fgb.2020.103397.

MACÊDO-SALES, P. A. *et al.* Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 13–19, 2018 a. DOI: 10.5123/s2176-62232018000200002.

MACÊDO-SALES, P. A. *et al.* Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 1–10, 2018 b. DOI: 10.1186/s12917-018-1340-4.

MADRID, I. M. *et al.* Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande Do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, [S. l.], v. 57, n. 2, p. 151–154, 2010. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01227.x.

MADRID, I. M. *et al.* Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 173, n. 4, p. 265–273, 2012. DOI: 10.1007/s11046-011-9509-4.

MAGAND, F. *et al.* Sporotrichose cutanée autochtone française. **Annales de Dermatologie et de Venerologie**, [S. l.], v. 136, n. 3, p. 273–275, 2009. DOI: 10.1016/j.annder.2008.09.021.

MAKRI, N. *et al.* First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix* species) in a cat in the UK. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 1–5, 2020. DOI: 10.1177/2055116920906001.

MARIMON, R. *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 44, n. 9, p. 3251–3256, 2006. DOI: 10.1128/JCM.00081-06.

MARIMON, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007. DOI: 10.1128/JCM.00808-07.

MARIMON, R. *et al.* *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 621–625, 2008. DOI: 10.1080/13693780801992837.

MARQUES, M. E. A. *et al.* Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. **Journal of Clinical Pathology**, [S. l.], v. 45, n. 12, p. 1089–1093, 1992. DOI: 10.1136/jcp.45.12.1089.

MEDEIROS, K. B. *et al.* Disseminated cutaneous sporotrichosis associated with ocular lesion in an immunocompetent patient. **An Bras Dermatol.**, [S. l.], v. 91, n. 4, p. 537–9, 2016.

MEYER, K. F. The relation of animal to human sporotrichosis: studies on american sporotrichosis III. **Jour. A. M. A.**, [S. l.], v. 65, n. 7, p. 579–584, 1915.

MIRANDA, L. H. M. *et al.* Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 425–432, 2013. DOI: 10.1016/j.cimid.2013.03.005.

MONNO, R. *et al.* Infection caused by *Sporothrix schenckii*: an autochthonous case in Bari, Southern Italy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 2457–2460, 2020. DOI: 10.1007/s10096-020-03939-z.

MONTENEGRO, H. *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, [S. l.], v. 10, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/s12917-014-0269-5.

MORRISON, A. S. *et al.* An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical Mycology Case Reports**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 88–90, 2013. DOI: 10.1016/j.mmcr.2013.03.002.

MOUSSA, T. A. A. *et al.* Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. **Journal of Medical Microbiology**, [S. l.], v. 66, n. 5, p. 560–569, 2017. DOI: 10.1099/jmm.0.000451.

NAKASU, C. C. T. *et al.* Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00290-5.

NICOT, J.; MARIAT, F. Caractères morphologiques et position systématique de *Sporothrix schenckii*, agent de la sporotrichose humaine. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, [S. l.], v. 49, p. 53–65, 1973.

OLIVEIRA, E. *et al.* Sporotrichosis infection in equine. I. Utilization the delayed hypersensitivity test. **Rev. Fac. Med. Vet. Zotec. Univ. S. Paulo**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 23–28, 1981.

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in Microbiology**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015. DOI: 10.1016/j.resmic.2014.12.008.

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 388–390, 2014. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.023. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.023>.

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S. l.], v. 108, n. 7, p. 936–938, 2013. DOI: 10.1590/0074-0276130239.

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 172, n. 4, p. 257–267, 2011. DOI: 10.1007/s11046-011-9437-3.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow up of 13 months. **Mycoses**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 81–83, 2010. DOI: 10.1111/j.1439-0507.2008.01661.x.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [S. l.], v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017. DOI: 10.1590/abd1806-4841.2017279.

PAIVA, M. T. *et al.* Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. **Preventive Veterinary Medicine**, [S. l.], v. 183, n. May, 2020. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105125.

Panótico Rápido: Laborclin. [s.d.]. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/panotico-rapido/>. Acesso em: 15 abr. 2021.

PAPPAS, P. G. *et al.* Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 65–70, 2000. DOI: 10.1086/313607.

PASSOS, J. S. *et al.* Development, skin targeting and antifungal efficacy of topical lipid nanoparticles containing itraconazole. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 149, p. 105296, 2020. DOI: 10.1016/j.ejps.2020.105296. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105296>.

PEREIRA, S. A. *et al.* Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, [S. l.], v. 166, n. 10, p. 290–294, 2010. DOI: 10.1136/vr.166.10.290.

PEREIRA, S. A. *et al.* Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 220–223, 2011. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.10.007.

PEREIRA, S. A. *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014. DOI: 10.1590/0037-8682-0092-2013.

PEREIRA, S. A. *et al.* Therapeutic aspects of feline sporotrichosis. *Acta Scientiae Veterinariae*, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 311–321, 2009.

PEREIRA, S. A.; GREMIÃO, I. D. F.; MENEZES, R. C. Sporotrichosis in animals: zoonotic transmission. *In*: Zeppone Carlos I, editor. **Sporotrichosis: new developments and future prospects**. Cham: Springer; [s.l: s.n.]. p. 83–102. DOI: 10.1007/978-3-319-11912-0.

PIJPER, A.; PULLINGER, B. D. An outbreak of sporotrichosis among south african native miners. **The Lancet**, [S. l.], v. 210, n. 5435, p. 914–916, 1927. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)35176-0.

PREFEITURA DE BELO HORIZONTE - Esporotricose. [s.d.]. Disponível em: <https://prefeitura.pbh.gov.br/saude/informacoes/vigilancia/vigilancia-epidemiologica/doencas-transmissiveis/esporotricose>. Acesso em: 20 maio. 2020.

QUEIROZ-TELLES, F.; BUCCHERI, R.; BENARD, G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi MDPI AG**, v. 5, n. 8, 2019. DOI: 10.3390/jof5010008.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Mycoses of implantation in Latin America: An overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 225–236, 2011. DOI: 10.3109/13693786.2010.539631.

QUINTAL, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 51–54, 2000. DOI: 10.1177/120347540000400113.

REED, K. D. *et al.* Zoonotic transmission of sporotrichosis: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, [S. l.], v. 16, n. 3, p. 384–387, 1993. DOI: 10.1093/clind/16.3.384.

REIS, E. G. *et al.* Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 54, n. 7, p. 684–690, 2016. DOI: 10.1093/mmy/myw027.

REIS, E. G. *et al.* Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 399–404, 2012. DOI: 10.1177/1098612X12441317.

RIOS, M. E. *et al.* Zoonotic sporotrichosis related to cat contact: first case report from Panama in Central America. **Cureus**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1–5, 2018. DOI: 10.7759/cureus.2906.

ROCHA, R. F. D. B. *et al.* Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. **Journal of Small Animal Practice**, [S. l.], v. 59, n. 11, p. 720–721, 2018. DOI: 10.1111/jsap.12852.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 51, n. 4, p. 405–412, 2013. DOI: 10.3109/13693786.2012.719648.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis. *In*: **Emerging and epizootic fungal infections in animals**. [s.l.: s.n.]. p. 199–231, 2018. DOI: 10.1007/978-3-319-72093-7\_10.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, [S. l.], v. 78, n. 4, p. 383–387, 2014. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004>.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; CAMARGO, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 9, n. 12, 2015. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004190.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 6, 2013. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002281.

RODRIGUES, A. M. *et al.* *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, [S. l.], v. 120, n. 2, p. 246–264, 2016. DOI: 10.1016/j.funbio.2015.05.006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.05.006>.

RODRIGUES, A. M. *et al.* *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolated from soil in an armadillo's burrow. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 177, n. 3–4, p. 199–206, 2014. DOI: 10.1007/s11046-014-9734-8.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 0, 2020. DOI: 10.1007/s11046-020-

00425-0.

RODRIGUES, A. M.; FERNANDES, G. F.; CAMARGO, Z. P. Sporotrichosis. In: BAYRY, J. (org.). **Emerging and Re-emerging Infectious Diseases of Livestock**. [s.l.] : Springer, Cham, 2017. p. 391–421. DOI: 10.1007/978-3-319-47426-7.

RODRIGUES, A. M. Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*. 2010. Dissertação de mestrado em Ciências. Universidade Federal de São Paulo, [S. l.], 2010.

ROMEO, O.; SCORDINO, F.; CRISEO, G. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of italian isolates. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 172, n. 3, p. 179–186, 2011. DOI: 10.1007/s11046-011-9420-z.

ROSA, A. C. M. *et al.* Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [S. l.], v. 52, n. 3 Pt 1, p. 451–459, 2005. DOI: 10.1016/j.jaad.2004.11.046.

ROSSOW, J. A. *et al.* A One Health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. **Journal of Fungi**. MDPI AG, v. 6, n. 4, p. 1-27, 2020. DOI: 10.3390/jof6040247. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33114609/>. Acesso em: 22 jan. 2021.

SANCHOTENE, K. O. *et al.* *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. **Mycoses**, [S. l.], v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015. DOI: 10.1111/myc.12414.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Johns Hopkins Hospital Bulletin**, [S. l.], v. 9, n. 93, p. 286–290, 1898. Disponível em: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10020340577/en/>. Acesso em: 17 abr. 2020.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B. L; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 129–133, 2008.

SCHUBACH, T. M. P. *et al.* Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 Cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 224, n. 10, p. 1623–1629, 2004. DOI: 10.2460/javma.2004.224.1623.

SCHUBACH, T. M. P. *et al.* *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 153, n. 2, p. 83–86, 2002. DOI: 10.1023/A:1014449621732.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESPÍRITO SANTO. FormSus - Esporotricose animal. [s.d.]. Disponível em: [http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id\\_aplicacao=39710](http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=39710). Acesso em: 31 janeiro. 2021.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO ESPÍRITO SANTO. Nota Técnica

NESIS/SESA 002/2020, 2020, p. 1–7.

SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DO RIO DE JANEIRO. Resolução SES Nº 674 DE 12/07/2013 - LegisWeb. [s.d.]. Disponível em: <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=256527>. Acesso em: 19 maio. 2020.

SILVA, G. M. *et al.* Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 38, n. 9, p. 1767–1771, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-5027.

SILVA, J. N. *et al.* Comparison of the sensitivity of three methods for the early diagnosis of sporotrichosis in cats. **Journal of Comparative Pathology**, [S. l.], v. 160, p. 72–78, 2018. DOI: 10.1016/j.jcpa.2018.03.002.

SILVA, J. N. *et al.* Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical Mycology**, [S. l.], v. 53, n. 8, p. 880–884, 2015. DOI: 10.1093/mmy/myv038.

SONG, Y. *et al.* Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 313–318, 2013. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x.

SOUZA, C. P. *et al.* Cryosurgery in association with itraconazole for the treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 137–143, 2016. DOI: 10.1177/1098612X15575777.

SOUZA, E. W. *et al.* Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-27447-5.

SYMMERS, W. S. Sporotrichosis in Ireland - A Review. **The Ulster Medical Journal**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 85–101, 1968.

TÉLLEZ, M. D. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology (United Kingdom)**, [S. l.], v. 160, n. June 2019, p. 2352–2365, 2014. DOI: 10.1099/mic.0.081794-0.

THOMSON, J. *et al.* An atypical cause of sporotrichosis in a cat. **Medical Mycology Case Reports**, [S. l.], v. 23, p. 72–76, 2019. DOI: 10.1016/j.mmcr.2019.01.004.

VALERIANO, C. A. T. *et al.* Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008151.

VENTIN, M. *et al.* A significant geographical area for the study of the epidemiological and ecological aspect of mediterranean sporotrichosis. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 41–43, 1987. DOI: 10.1007/BF00436679.

VISMER, H. F.; HULL, P. R. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. **Mycopathologia**, [S. l.], v. 137, n. 3, p. 137–143, 1997. DOI: 10.1023/A:1006830131173.

WALLER, S. B. *et al.* Chemical and cytotoxic analyses of brown brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, [S. l.], v.105, p.117–121, 2017. DOI: 10.1016/j.micpath.2017.02.022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.022>.

WELSH, R. D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, [S. l.], v. 223, n. 8, p. 1123–1126, 2003. DOI: 10.2460/javma.2003.223.1123.

WERNER, A. H.; WERNER, B. E. Sporotrichosis in Man and Animal. **International Journal of Dermatology**, [S. l.], v. 33, n. 10, p. 692–700, 1994. DOI: 10.1111/j.1365-4362.1994.tb01512.x.

ZANCOPÉ-OLIVEIRA, R. M. *et al.* New diagnostic applications in sporotrichosis. **Skin Biopsy - Perspectives**, [S. l.], n. 4, p. 53–72, 2011. DOI: 10.5772/23590.

ZHANG, Y. *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 1–20, 2015. DOI: 10.3767/003158515X687416.

ZHOU, X. *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Fungal Diversity**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 153–165, 2014. DOI: 10.1007/s13225-013-0220-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0220-2>.

## ANEXOS

## Anexo 1 – Ficha de investigação de esporotricose animal do município de Anchieta – ES

		Secretaria Municipal de Saúde Gerência Operacional de Vigilância em Saúde Unidade de Vigilância de Zoonoses				
<b>FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE ESPOROTRICOSE ANIMAL</b>					Nº	
<p><b>CASO SUSPEITO:</b> todo animal (em especial, gatos) com lesão cutânea (localizada e/ou disseminada), sendo muito comum em áreas da face (focinho e orelhas) e membros, compatível com transmissão por inoculação durante briga com outros animais infectados ou doentes. Inicialmente a lesão é sólida, circunscrita, avermelhada e levemente elevada, aumentando lentamente para se tornar um nódulo que, posteriormente pode ulcerar e apresentar secreção sero-sanguinolenta, crostas e prurido.</p>						
<b>Dados Gerais</b>	1 Tipo de notificação		2- Individual			
	2 Agravado/doença		<b>ESPOROTRICOSE ANIMAL</b>		3 Data Notificação/Investigação	
	4 UF	5 Município de Notificação			6 Código (IBGE)	
	E	S				3 2 0 0 4 0 9
7 Unidade de Saúde notificadora		8 Código				
		7		6 0 5 4 6 3		
<b>Dados do Proprietário</b>	9 Há responsável pelo animal? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não				11 Data de nascimento	
	10 Nome:					
	12 Idade	13 Sexo	14 Gestante		15 Raça/cor	
		1- Masculino 2- Feminino	1- 1º trimestre Idade gestacional ignorada	2- 2º trimestre 5- Não Ignorada	3- 3º trimestre 6- Não se aplica	4- 1- Branca 2- Preta 3- Amarela 4- Parda 5- Indígena 9- Ignorado
	16 Ocupação	17 Número do cartão SUS	18 Nome da mãe		19 UF	
20 Município de residência		21 código (IBGE)		22 Bairro		
23 Logradouro (rua, av. ....)				24 Número		
25 Complemento (apto, casa.)		26 Distrito		27 Geocampo 1		
28 Geocampo 2		29 Ponto de referência				
30 CEP		31 Telefone				
32 Zona 1- Urbana 2- Periurbana 3- Rural 9- Ignorado		33 País (se reside fora)				
<b>Dados do Animal</b>						
34 Nome do animal:						
35 Espécie		36 Raça:		37 Pelagem		
1- Canina 2- Felina 3- Outra:		1- SRD 2- Outra:		38 Idade 1- Ano 2- Mês		
39 Sexo		40 Esterilizado?		41 Hábito		
1- Macho 2- Fêmea		1-Sim 2-Não 9- Ignorado		1-Domiciliado 2- Semi-domiciliado 3-Sem controle		
42 1ª vez que tem lesões?		43 Início das lesões				
1-Sim 2-Não 9- Ignorado		1- Menos de uma semana 2- Entre uma semana e um mês 3- Mais de um mês				
44 Local e quantidade das lesões cutâneas:						
1-Sim 2-Não 9- Ignorado		Cabeça: _____		Pescoço: _____		
Torax: _____		Membros torácicos: _____		Membros pélvicos: _____		
Abdome: _____		Cauda: _____				
45 Aspecto das lesões		46 Prurido?		47 Presença de sinais sistêmicos		
1-Sim 2-Não 9- Ignorado		1-Sim 2-Não 9- Ignorado		1-Sim 2-Não 9- Ignorado		
Popular _____ Ukerado _____ Crostoso _____ Apresenta secreção _____		Sinais respiratórios _____ Outros: _____		Linfonodos aumentados _____		

	48 Tratamento <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	49 Tipo <input type="checkbox"/> Antibiótico sistêmico <input type="checkbox"/> Antifúngico sistêmico <input type="checkbox"/> Pomada/creme <input type="checkbox"/> Spray cicatrizante <input type="checkbox"/> Outro: _____
	50 Tempo <input type="checkbox"/> 1- Menos de uma semana <input type="checkbox"/> 2- Mais de uma semana	51 Observou-se algum efeito? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado
	52 Existem animais contactantes <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	
	53 Presença e quantidade de animais com lesões semelhantes <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado <input type="checkbox"/> Gatos com lesões semelhantes: _____ <input type="checkbox"/> Cães com lesões semelhantes: _____	
	54 Pessoas com lesões cutâneas semelhantes? <input type="checkbox"/> 1-Sim 2-Não 9-Ignorado	
Dados Laboratoriais	55 Exames laboratoriais <input type="checkbox"/> 1- Citopatológico 2- Cultura Fúngica Solicitante: (Assinatura/ carimbo) _____ <input type="checkbox"/> Data da coleta: [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] <input type="checkbox"/> Data da coleta: [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]	
	56 Resultado Citopatológico: <input type="checkbox"/> 1- Compatível 2- Inconclusivo 3- Não compatível 4- Não realizado Data: [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] Laboratório: _____	
	57 Resultado cultura <input type="checkbox"/> 1- Compatível 2- Inconclusivo 3- Não compatível 4- Não realizado Data: [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ] Laboratório: _____	
Conclusão	58 Classificação final <input type="checkbox"/> 1- Confirmado 2- Descartado	
	59 Critério de confirmação <input type="checkbox"/> 1- Clínico-epidemiológico 2- Laboratorial	
	60 Encaminhamento: <input type="checkbox"/> 1- Tratamento 2- Eutanásia	
	61 Evolução do tratamento: <input type="checkbox"/> 1- Cura 2- Recidiva 3- Perda de seguimento 4- Óbito	
	62 Motivo para realização da eutanásia: <input type="checkbox"/> 1- Bem-estar do animal comprometido de forma irreversível 2- O animal constitui-se em ameaça à saúde pública 3- O animal constitui-se em risco à fauna nativa ou ao meio ambiente 4- Custos do tratamento incompatíveis com os recursos financeiros do proprietário	
63 Destino da carcaça <input type="checkbox"/> 1- Incinerada 2- Aterro sanitário 3- Enterrada 4- Lixo comum 5- Outro: _____		
64 Observações: _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____ _____		
Dados do investigador	65 Nome: _____	
	66 Cargo/função: _____	67 Tel: _____
	68 E-Mail: _____	69 Instituição _____
	70 Município _____	71 Data: [ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ][ ]

