



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
TESE**

**ALLANA FREITAS BARROS**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, CITO-HISTOMORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DA ESPOROTRICOSE FELINA NA ILHA DE SÃO  
LUÍS-MA**

**SÃO LUÍS - MA**

**2024**



**UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
TESE**

**ALLANA FREITAS BARROS**

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, CITO-HISTOMORFOLÓGICA E  
MOLECULAR DA ESPOROTRICOSE FELINA NA ILHA DE SÃO  
LUÍS-MA**

Tese apresentada à Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (PPGC/UEMA), como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Coorientadora: Larissa Sarmiento dos Santos

SÃO LUÍS - MA

2024

Barros, Allana Freitas.

Caracterização clínica, cito-histomorfológica e molecular da esporotricose felina na Ilha de São Luís-MA./ Allana Freitas Barros. – São Luís(MA), 2024.

80p.

Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - PPGCA) Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva.

**Elaborado por Luciana de Araújo - CRB 13/445**



**Universidade Estadual do Maranhão**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ATA N° 15**

Aos dezessete dias do mês de junho de dois mil vinte e quatro, às quatorze horas, compareceu em sala de aula PPGCA/LAMP-UEMA, a Pós-Graduanda Allana Freitas Barros (CPF ), para apresentar e defender a Tese intitulada "Caracterização clínica, citohistomorfológica e molecular da esporotricose felina na Ilha de São Luís-MA", perante a Banca Examinadora de TESE abaixo relacionada. Após a apresentação e arguição pelos membros da Banca, a Pós-Graduanda foi considerada (Aprovada /Reprovada), APROVADA, conferindo-a o título de "Doutora em Ciência Animal", conforme as normas vigentes na Universidade Estadual do Maranhão-UEMA. Encerrados os trabalhos foi lavrado a presente ATA que foi lida por mim, professora Dra. Ana Lucia Abreu Silva (Orientadora), e após aprovada, recebeu a assinatura dos membros da Banca. A versão final da TESE, deverá ser entregue ao Programa, no prazo de 60 dias, contendo as modificações sugeridas pela banca examinadora e constantes na folha de correção anexa. Conforme o Art. 59º §3º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCA/UEMA, a Pós-graduanda não terá o título, se não cumprir as exigências acima.

**Dr. (a) CRISTINA DE ANDRADE MONTEIRO, IFMA**

Examinador(a) Externo à Instituição

**Dr. (a) JOICY/CÓRTEZ DE SA SOUSA, UFMA**

Examinador(a) Externo à Instituição

**Dr. (a) ALCINA VIEIRA DE CARVALHO NETA, UEMA**

Examinador(a) Interno

**FERNANDO ALMEIDA DE SOUZA, UEMA**

Examinador(a) Interno

**Dr. (a) ANA LÚCIA ABREU SILVA, UEMA**

Presidente(a)

**ALLANA FREITAS BARROS**

Doutorando

*“Assim diz o Senhor: Eu não perdi o controle da tua vida, está tudo no meu tempo, não há nada atrasado. Aquietai-vos e sabei que eu sou Deus.”  
(Salmos 46:10)*

*A todos pacientes e tutores, que mesmo em um momento de angústia e aflição aceitaram participar deste estudo.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela concretização deste sonho, pela força concedida nos momentos difíceis e por cada aprendizado obtido ao longo desta minha caminhada.

À meus pais Valbenir Silva Barros, Maria dos Remédios Freitas Barros, por todo conhecimento, amor e apoio de vocês, pois é muito importante ter alguém que acredite e invista no nosso potencial, obrigado por todo incentivo.

À minha irmã amiga Ariella Freitas Barros agradeço pelo companheirismo e apoio incondicional aos meus sonhos e projetos.

À Wendel Fragoso de Freitas Moreira por toda parceria e companheirismo todos os dias.

À Professora Ana Lucia Abreu Silva, minha orientadora, por sua contribuição na minha formação profissional, a quem admiro por sua incansável dedicação ao ensino e pesquisa, por seu incentivo e paciência ao longo do desenvolvimento e conclusão deste projeto, muito obrigada.

À minha co-orientadora professora Larissa Sarmento dos Santos muito obrigada por todo auxílio e confiança para o desenvolvimento e conclusão do projeto, sua ajuda foi essencial.

Ao Laboratório de Micologia da UEMA pela colaboração na pesquisa, em especial a Juliana Sá Vitor, Yanara Régia Cunha Monteiro Esposito e Nayara Silva Oliveira.

Ao Laboratório de Patologia Molecular da UEMA pelo apoio na realização das técnicas moleculares, em especial a professora Alcina Viera de Carvalho Neta, Ellainy Maria Conceição Silva e Anna Letícia da Silva Pinto.

Obrigada a toda equipe do setor de felinos Hospital Veterinário Universitário – UEMA e dermatologista veterinária Luana Madureira pela colaboração durante a realização da pesquisa, sempre me auxiliaram nas coletas e contato com os tutores.

Ao Laboratório de Anatomopatologia da UEMA por todo apoio oferecido durante a realização do trabalho e por todos os anos que aprendi com essa equipe maravilhosa, verdadeiramente minha segunda casa, em especial ao professor Fábio

Henrique Evangelista de Andrade, Gabriel Xavier Silva, Carolina Silva Costa e Helen Silva Ribeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) e Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) pelo suporte técnico e financeiro para realização da pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>CAPITULO 1 – Considerações gerais e referencial teórico .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Histórico da esporotricose.....	18
2.2 Epidemiologia .....	18
2.3 Gênero <i>Sporothrix</i> .....	20
2.4 Morfologia.....	22
2.5 Patogenia .....	23
2.6 Fatores de virulência .....	24
2.7 Formas clínicas.....	25
2.8 Diagnóstico .....	26
2.8.1 Citológico.....	27
2.8.3 Histopatológico .....	27
2.8.4 Imuno-histoquímica .....	27
2.8.5 Cultivo fúngico.....	28
2.8.6 Técnicas moleculares .....	28
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Geral.....	31
3.2 Específicos .....	31
<b>CAPÍTULO 2 - Feline sporotrichosis an emerging disease in Maranhao State .....</b>	<b>43</b>
Introduction.....	45
Case report .....	45
Discussion .....	46
Conclusion.....	47
References .....	47
<b>CAPÍTULO 3 - Phylogenetic analysis of <i>Sporothrix brasiliensis</i> isolated from feline sporotrichosis in the Amazon region.....</b>	<b>53</b>
<b>(Submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira – Qualis A3) .....</b>	<b>53</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>56</b>
<b>2. Materials and Methods.....</b>	<b>58</b>
2.1 Ethics Statement.....	58
2.2 Study site.....	58
2.3 Animals .....	58

2.4 Cytology .....	58
2.5 Fungal culture and phenotypic evaluation .....	59
2.6 DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) applied to <i>S. brasiliensis</i> based on the <i>cal</i> gene.....	59
2.7 Amplified products purification and sequencing .....	60
2.8 Phylogenetic Analysis .....	60
<b>3. Results .....</b>	<b>61</b>
3.1 Clinical assessment .....	61
3.2 Cytology .....	64
3.3 Phenotypic assessment of fungal culture .....	64
3.4 Polymerase chain reaction (PCR) molecular detection of <i>S. brasiliensis</i> based on the <i>cal</i> gene.....	65
3.5 BLASTn analysis of sequenced products .....	65
3.6 Phylogenetic analysis applied to <i>S. brasiliensis</i> based on the <i>cal</i> gene.....	66
<b>4. Discussion .....</b>	<b>68</b>
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>70</b>
<b>References.....</b>	<b>71</b>
<b>CAPÍTULO 4 – Conclusão.....</b>	<b>79</b>



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

Centro de Ciências Agrárias  
Curso de Medicina Veterinária  
Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA)  
Credenciamento Provisório - CONCEA/MCT  
Processo 01200.002200/2015-06 (449) - Emissão 19/06/2015

---

**DECLARAÇÃO – PROTOCOLO Nº 060/2021-01200.002200/2015-06**  
**CEEA/CMV/UEMA**  
**EMISSÃO 2º VIA – 08.02.2024**

Declaramos aos devidos fins, para atividade de pesquisa, que o projeto intitulado “Caracterização epidemiológica, cito-histomorfológica e molecular da esporotricose felina na Ilha de São Luis-MA.” teve aprovação da Comissão de Ética e Experimentação Animal-CEEA do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão-UEMA, conforme protocolo nº 0018/2020 e execução pela pós-graduanda do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal-PPGCA/UEMA, a médica veterinária Allana Freitas Barros, sob a orientação do Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva, docente do Departamento de Patologia/CCA/UEMA e do PPGCA/UEMA. O projeto submetido atende as normas de Bem-Estar Animal da Resolução do CFMV nº 1000/2012, Lei 11.794/2008 e do CONCEA/MCTI, com execução de 36 meses (06/2022-06/2025), em um número amostral casualizado de felinos em atendimento no Hospital Universitário “Francisco Edilberto Uchoa Lopes” da UEMA.

São Luis, 08 de janeiro de 2024.

---

Profa. Dra. Alana Lislea de Sousa  
Presidente do CEEA/CMV/UEMA  
Matricula 6503-CPF 27873609391

## CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA, CITO-HISTOMORFOLÓGICA E MOLECULAR DA ESPOROTRICOSE FELINA NA ILHA DE SÃO LUÍS-MA

**RESUMO** - A esporotricose é uma micose cutânea zoonótica causada por fungos saprófitos do gênero *Sporothrix* spp., que acomete gatos, tatus, cavalos, cães e humanos. O felino no meio urbano é o principal responsável pela transmissão da doença para o homem, por meio de mordidas e arranhões. As formas clínicas apresentadas pela doença são: a forma cutânea fixa, cutânea disseminada, extracutânea e linfocutânea. O objetivo do presente estudo foi realizar a caracterização clínica, fenotípica e molecular da esporotricose em gatos residentes na Ilha de São Luís, Estado do Maranhão. No período de outubro de 2022 a julho de 2023, foram realizadas avaliações clínicas e exames citológicos em gatos com suspeita de esporotricose atendidos no Hospital Veterinário Francisco Edilberto Uchôa Lopes da Universidade Estadual do Maranhão. Foram selecionados felinos que apresentavam lesões sugestivas para esporotricose, sem critérios de raça, sexo, idade e estado reprodutivo. O exsudato das lesões foi coletado para cultivo fúngico e exame citológico. As amostras positivas foram isoladas e encaminhadas para identificação fenotípica e molecular do gênero do fungo. No total, foram selecionados 46 animais: 33 machos e 13 fêmeas. A forma clínica cutânea disseminada foi observada em 70% dos gatos avaliados. As regiões do corpo que mais apresentaram lesões foram a face, orelhas, dorso da região torácica e membros dos animais. No cultivo fúngico foram observadas colônias de coloração branca, que progressivamente tornaram-se enegrecidas e com textura coriácea compatível com a espécie *Sporothrix* spp. A análise micromorfológica evidenciou hifas hialinas com conídios redondos e conidióforos semelhantes a margaridas. As amostras positivas na avaliação micromorfológica foram encaminhadas para análise molecular. A PCR foi realizada com primers específicos para espécie de *S. brasiliensis*. Todas as 46 amostras amplificaram com sucesso o gene CAL. Foram selecionadas 5 amostras para a análise filogenética. Na análise no BLASTn observou-se isolados com percentuais de identidade genética variando entre 90 a 100% com sequências de *S. brasiliensis* (gene *cal*), previamente depositadas no genbank de isolados de diferentes hospedeiros e locais, como felinos, cães e seres humanos. *S. brasiliensis* é responsável por causar doenças em felinos residentes na Ilha de São Luís – MA.

**Palavras-chave:** micose, *Sporothrix* spp., zoonose.

## CHARACTERIZATION CLINICAL, CYTOHISTOMORPHOLOGIC AND MOLECULAR OF FELINE SPOROTRICHOSIS ON THE ISLAND OF SÃO LUÍS-MA

**RESUMO** - Sporotrichosis is a zoonotic cutaneous mycosis caused by saprophytic fungi of the genus *Sporothrix* spp. which affects cats, armadillos, horses, dogs and humans. In urban areas, cats are the main transmitters of the disease to humans, through bites and scratches. The clinical forms of the disease are: fixed cutaneous, disseminated cutaneous, extracutaneous and lymphocutaneous. The aim of this study was to carry out the clinical, phenotypic and molecular characterization of sporotrichosis in cats living on the island of São Luís, in the state of Maranhão. From October 2022 to July 2023, clinical assessments and cytological examinations were carried out on cats suspected of having sporotrichosis seen at the Francisco Edilberto Uchôa Lopes Veterinary Hospital of the State University of Maranhão. Felines with lesions suggestive of sporotrichosis were selected, without criteria of breed, sex, age or reproductive status. Exudate from the lesions was collected for fungal culture and cytological examination. The positive samples were isolated and sent for phenotypic and molecular identification of the fungal genus. A total of 46 animals were selected: 33 males and 13 females. The disseminated cutaneous clinical form was observed in 70% of the cats evaluated. The regions of the body with the most lesions were the face, ears, back of the thoracic region and limbs. In the fungal culture, white colonies were observed, which progressively became blackish and had a leathery texture compatible with the species *Sporothrix* spp. The micromorphological analysis showed hyaline hyphae with round conidia and daisy-like conidiophores. The samples that tested positive in the micromorphological evaluation were sent for molecular analysis. PCR was carried out using primers specific to the *S. brasiliensis* species. All 46 samples successfully amplified the CAL gene. Five samples were selected for phylogenetic analysis. The BLASTn analysis found isolates with percentages of genetic identity ranging from 90 to 100% with sequences of *S. brasiliensis* (cal gene), previously deposited in the genbank of isolates from different hosts and locations, such as felines, dogs and humans. *S. brasiliensis* is responsible for causing disease in felines living on the island of São Luís - MA.

**Key-words:** mycoses, *Sporothrix* spp, zoonosis

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 - Formas leveduriformes de <i>Sporothrix</i> spp.	20
Figura 2 - Feline sporotrichosis.	52
Figura 3 - Skin lesions in cat presenting the localized cutaneous clinical form of feline sporotrichosis.	67
Figura 4 - Cat affected by the disseminated form of feline sporotrichosis.	68
Figura 5 - Swab from feline lesion showing free and intracytoplasmic yeast forms suggesting <i>Sporothrix</i> sp. in macrophages.	69
Figura 6 - Macro and microscopic analysis applied to <i>Sporothrix brasiliensis</i> culture.	69
Figura 7 - Agarose gel electrophoresis (1.5%) of PCR for the cal gene of <i>S. brasiliensis</i> from samples collected in cats with sporotrichosis.	70
Figura 8 - The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method.	70

## **CAPITULO 1 – Considerações gerais e referencial teórico**

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea causada por fungos saprófitos ambientais e dimórficos que compõem o gênero *Sporothrix* (Rippon 1988; Gondim e Leite, 2020), acomete diversas espécies animais, tais como cavalos, camelos, bovinos, suínos, primatas, cão e o gato doméstico (Larsson, 2011; Caus, 2013).

A transmissão da esporotricose pode ocorrer com a inoculação direta do fungo na pele, por meio de arranhadura e/ou mordedura de animais infectados, ou pelo contato com o agente no solo, durante a realização de atividades de jardinagem que podem causar pequenas lesões cutâneas facilitando a implantação do fungo (Schubach *et al.*, 2015; Lopes-Bezerra *et al.*, 2018).

Nos ambientes urbanos, os gatos são os principais responsáveis pela transmissão zoonótica, uma vez que têm maior facilidade de entrar em contato com o patógeno devido aos hábitos de afiar as unhas em plantas ou escavar o solo, e por ser uma espécie muito presente no ambiente familiar (Brum *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2020). Os felinos são também a principal vítima da doença, pois evoluem geralmente para o quadro mais severo da doença devido à alta adaptação do fungo à espécie (Rodrigues *et al.*, 2013) e à desistência de tratamento dos animais doentes por parte dos tutores (Chaves *et al.*, 2013; Nakasu *et al.*, 2021).

A esporotricose pode se manifestar nas seguintes formas clínicas: cutânea localizada ou disseminada, linfocutânea, extracutânea e sistêmica (Orofino-Costa *et al.*, 2017; Rabello *et al.*, 2022). Os felinos, por sua vez, apresentam desde lesão única na pele até múltiplas lesões arredondadas, ulceradas com presença de crostas, que podem se localizar na região cranial, extremidade dos membros e cauda (Gremião *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2024).

Inicialmente, *Sporothrix schenckii* foi considerado o único agente responsável pela esporotricose, no entanto, a partir de estudos clínicos realizados em humanos e animais, verificou-se a existência de um complexo *Sporothrix schenckii* (Rossato, 2017). Atualmente, quatro espécies são classificadas como patogênicas: *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* (De Beer; Duong; Wingfield, 2016). No Brasil, a espécie *S. brasiliensis* é a responsável pelos surtos epidêmicos (De Oliveira Bento *et al.*, 2021) e, de acordo com pesquisas, a alta virulência e a sua capacidade de evasão da resposta imunológica são os fatores associados a maior frequência desse fungo no país (Rossato, 2017; Queiroz-Telles, 2019).

O diagnóstico da esporotricose em felinos é feito por meio do histórico, sinais clínicos e exames complementares, sendo a citologia o mais utilizado na rotina clínica, e a cultura fúngica a mais utilizada para identificação do gênero (Jessica *et al.*, 2015; De Macêdo-Sales *et al.*, 2018). As técnicas moleculares para diagnóstico e identificação das espécies fúngicas demonstram resultados mais eficientes e rápidos, uma vez que não dependem de elevada carga fúngica e podem ser aplicadas com os mais diversos materiais como pele, cultura fúngica e até mesmo secreção das lesões dos animais infectados (Zhang *et al.*, 2019a; Gonsales *et al.*, 2020; Luiz, 2021).

A prevenção da esporotricose é a principal forma de combate da doença. A orientação dos tutores por médicos veterinários quanto à posse responsável, castração, isolamento e tratamento dos animais doentes, e cremação dos animais que vem a óbito durante o tratamento (Rossow *et al.*, 2020), reduzem a disseminação da doença para outros animais, pessoas e desenvolvimento do fungo no ambiente. O combate da esporotricose é possível a partir de esforços multidisciplinares que integrem profissionais da área da saúde humana, animal e ambiental, reforçando a necessidade cada vez mais frequente da implementação da Saúde Única para o combate desta zoonose (Rüegg; Häsler; Zinsstag, 2018; Carneiro e Pettan-Brewer, 2021).

Desta forma, considerando que a esporotricose é uma micose subcutânea de importância para a saúde animal e humana, e sua expansão considerável para região nordeste e consequentemente relatos de sua ocorrência em felinos da nossa região, o presente trabalho se justifica devido a ausência de registros em nossa região, buscamos identificar as características epidemiológicas, moleculares e filogenéticas do *Sporothrix* spp em felinos na Ilha de São Luís.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Histórico da esporotricose

O primeiro caso de esporotricose foi descrito em 1898 pelo médico Benjamin Robinson Schenck, que isolou o fungo de nódulos ulcerados nos dedos e antebraço de um paciente de 36 anos, atendido no Johns Hopkins Hospital em Baltimore-EUA. A identificação do agente foi realizada pelo micologista Erwin Frink Smith que classificou o fungo como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (Schenck, 1898; Téllez *et al.*, 2014).

Hektoen e Perkins relataram o segundo caso de esporotricose, que ocorreu em Chicago em 1990, em uma criança que se machucou com um martelo. A lesão regrediu naturalmente, sendo proposto por esses pesquisadores a criação da nomenclatura *Sporothrix schenckii* para a nova espécie (Hektoen e Perkins, 1990).

Em 1962, o pesquisador Carmichael sugeriu a mudança de nomenclatura da espécie, pois percebeu que nas publicações a terminologia *Sporotrichum* era a mais utilizada, e respaldou a sua sugestão ao identificar diferenças morfológicas entre a espécie de *Sporothrix schenckii* descritas em comparação com o fungo *Sporotrichum aureum* (Carmichael, 1962).

No Brasil, o primeiro relato de infecção natural por *S. schenckii* ocorreu em 1907, foi observado por Adolfo Lutz e Alfonso Splendore, em ratos-de-esgoto (*Mus decumanus*) na cidade de São Paulo, que na época passava por um surto de peste (Lutz e Splendore, 1907).

O primeiro relato da doença em felinos foi realizado por Singer e Muncie, em 1952, nos EUA. O Brasil teve o primeiro caso confirmado por Freitas, Migliano e Zani-Neto (1956) que relataram a doença em um gato macho adulto procedente da cidade de Cambuquira no Estado de Minas Gerais, que apresentava pequenos nódulos nos membros torácicos que evoluíram progressivamente para o quadro disseminado da doença, com múltiplas lesões ulceradas nos membros e cabeça. Os casos de esporotricose em gatos até 1980 eram raros e a transmissão para humanos, ocorriam geralmente em veterinários, técnicos e proprietários de animais doentes (Barros *et al.*, 2008). A maioria dos casos em seres humanos no Brasil está relacionado à transmissão zoonótica, que tem o gato com principal responsável e vinculado a espécie *S. brasiliensis* (Gremião *et al.*, 2021).

### 2.2 Epidemiologia

A esporotricose é uma doença endêmica na África, Índia, Japão, Estados Unidos da América e em diversos países latino-americanos como Peru, Brasil, Argentina, México,

Colômbia, Uruguai, Costa Rica e Guatemala (Oyarce, *et al.*, 2016; Dos Santos *et al.*, 2024; Santiso *et al.*, 2023; Hernández-Castro *et al.*, 2022;).

No Brasil, a maioria dos isolados identificados são oriundos de felinos e cães, respectivamente 158 e 52 isolados. Na identificação molecular, a espécie *S. brasiliensis* (199 isolados) foi a mais prevalente, seguida pelo *S. schenckii* (6 isolados). Na Argentina o isolamento do fungo ainda é escasso e sua ocorrência está restrita a felinos, onde foram identificados 4 isolados de *S. brasiliensis*. No entanto, em outros animais, como equinos e ratos foram identificados 2 isolados de *S. schenckii* (Morgado *et al.*, 2022).

No Brasil, os surtos de origem zoonótica são muito frequentes nas regiões Sudeste e Sul do país (Madrid *et al.*, 2012; Sanchotene, *et al.*, 2015; Poester, *et al.*, 2018). Na região Nordeste, existem poucos estudos sobre a esporotricose, porém é possível encontrar relatos da doença nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Alagoas e Pernambuco (Bento *et al.*, 2021; França *et al.*, 2022).

No Rio de Janeiro, a esporotricose é considerada uma doença negligenciada e hiperendêmica e, desde julho de 2013, a notificação da doença em animais passou a ser obrigatória nesse estado. O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI) no período de 1997 a 2011 notificou 4.188 casos de esporotricose em humanos; de 1998 a 2014, 244 casos em cães e de 1998 a 2015, 4.703 gatos foram diagnosticados com esporotricose (Gremião *et al.*, 2017).

O Rio Grande do Sul é o segundo estado com maior incidência da doença e os municípios Rio Grande e Pelotas são os que apresentam o maior número de casos da esporotricose felina (Poester, *et al.*, 2018; Zamboni *et al.*, 2022).

No Estado de São Paulo, Maia *et al.* (2023) avaliando dados da Divisão de Vigilância de Zoonoses do município de São Paulo no período de 2011 a 2022 identificaram o registro de 5.677 casos confirmados de esporotricose em felinos e nestes animais 811 óbitos caracterizados por indicação de eutanásia, óbito pela doença ou outras razões como atropelamento.

No estado de Pernambuco, na Região Metropolitana do Recife no período de março de 2014 a fevereiro de 2016 foi observado que do total de 115 amostras de swabs coletados de lesões de felinos com a suspeita de esporotricose, em 59 (51,3%) foram identificadas as formas leveduriforme do *Sporothrix* spp. (Silva *et al.*, 2018), um percentual alto para a população avaliada.

No estado do Maranhão, Marques *et al.* (2013) relataram um caso de esporotricose felina, em gato macho, que apresentava lesões cutâneas e sintomas respiratórios como

espirros e secreção nasal. Foi realizada cultura fúngica do exsudado das lesões e foi identificado gênero *Sporothrix* spp como a responsável pela infecção. Deste então, não foram realizados novos estudos ou registrados novos casos da doença no estado do Maranhão.

Foram registrados até o ano de 2020, casos de esporotricose humana em todos os estados brasileiros, com exceção de Roraima (Orofino-Costa *et al.*, 2022). Alguns Estados visando rastrear e auxiliar nas políticas de saúde pública tornaram obrigatória a notificação dos casos de esporotricose humana em Minas Gerais (SES-MG, 2018), Pernambuco (SES-PE, 2019), Paraíba (SES-PB, 2019), município de Guarulhos (SS-GRU, 2016), Camaçari (Bahia, 2018) e os que incluem a notificação de casos em animais são os estados do Rio de Janeiro (SES-RJ, 2019), Amazonas (Amazonas,2021), Rio Grande do Norte(SESAP-RN, 2020), Paraná (SESA-PR, 2022) e municípios de São Paulo (SMS-SP, 2020), Salvador (SMS-BA, 2018).

A doença apresenta uma variação no seu perfil epidemiológico, sendo mais frequente no ambiente urbano (Bimbi & Brzezinski, 2017). Os felinos são os animais mais acometidos, que consequentemente com transmissão zoonótica geram mais casos em humanos, sendo um grave problema de saúde pública (Cavalcanti *et al.*, 2018).

### 2.3 Gênero *Sporothrix*

Os fungos do gênero *Sporothrix* pertencem ao reino Fungi, Divisão Ascomycota, Classe Pyrenomycetes, Ordem Ophiostomatales e Família Ophiostomataceae. Caracterizam-se por serem saprófita imóveis e dimórficos (Guarro *et al.*, 1999).

Por muitos anos, *S. schenckii* foi considerado o único responsável pela esporotricose, todavia, pelo fato de acometer diferentes hospedeiros e o seu desenvolvimento está associado às variações geográficas e ambientais. Todavia estudos de análise filogenética foram realizados, utilizando cepas de diversas regiões do mundo e os resultados dessas pesquisas identificaram a existência de um complexo do gênero *Sporothrix* (Marimon *et al.*, 2006; Mora-Montes *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Essas características permitiram a divisão do gênero *Sporothrix* em dois clados, um patogênico composto por *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* (antigo *S. schenckii* var. *luriei*), responsáveis por causar doença em humanos e animais, e o clado ambiental constituído pelo complexo *S. pallida* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. humicola* e *S. pallida* ex- *S. albicans*) e o complexo *S. stenoceras* (De Beer *et al.*, 2016).

As espécies de *Sporothrix* spp. variam em relação a sua distribuição geográfica, fatores de virulência, frequência, características ambientais, formas de transmissão e susceptibilidade antifúngica (Fernandes *et al.*, 2013; Rodrigues *et al.*, 2016).

*S. brasiliensis* é a espécie de maior ocorrência na América do Sul, e usualmente a responsável por causar surtos epidêmicos devido a sua maior virulência e a habilidade de evasão da resposta imunológica (Rossato, 2017). Apresenta maior resistência ao tratamento com antifúngicos da classe dos azóis, e possui como principais mecanismos associados à sua virulência a produção de melanina e maior termotolerância quando comparada a outras espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Por muito tempo, foi uma espécie restrita ao Brasil, porém existem relatos de identificação da espécie em casos de esporotricose felina e humana na Argentina, caracterizando a dispersão da espécie devido a fronteira com o Brasil (Gremião *et al.*, 2017; Etchecopaz *et al.*, 2020).

*Sporothrix schenckii sensu stricto*, a segunda espécie mais virulenta do clado patogênico (Corrêa-Moreira *et al.*, 2021), possui uma distribuição mundial, com maior ocorrência registrada nas Américas do Norte, Central e do Sul, África do Sul, Austrália e Europa (Hernández-Castro *et al.*, 2022; Queiroz-Telles *et al.*, 2022).

*Sporothrix globosa* é uma espécie com relatos de doença em humanos no Reino Unido, Espanha, Itália, EUA, China, Japão, Índia, México, Guatemala, Colômbia e Portugal (Marimon *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014b). No Brasil, já foram descritos quatro casos das espécies nos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Ceará e Goiás (De Oliveira *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2013).

*Sporothrix luriei* foi inicialmente classificado como *Sporothrix schenckii* var. *luriei*. e teve sua designação alterada após análises filogenéticas que identificaram uma separação genética entre *S. luriei* e as demais espécies do complexo (Marimon *et al.*, 2008). Existem poucos relatos da sua ocorrência, isolada apenas na África do Sul (Marimon *et al.*, 2008), Índia (Padhye *et al.*, 1992) e um caso no Brasil envolvendo um canino (Oliveira *et al.*, 2011b). Morfológicamente, esta espécie se distingue das outras por possuir a levedura com o maior tamanho, formato globoso com parede fina e com a reprodução por septação ou brotamento simples, ou múltiplo (Rippon, 1988).

*Sporothrix pallida* é uma espécie ambiental não patogênica, com poucos relatos na literatura em felinos (Oliveira *et al.*, 2011b; Thomson *et al.*, 2019) e um em humano (Morrison *et al.*, 2013). Estudos genéticos demonstraram a similaridade entre *S. pallida*, *S.*

*albicans* e *S. nivea* sendo proposto que as espécies fossem chamadas de *S. pallida* (De Beer; Duong; Wingfield *et al.*, 2016; D'Alessandro *et al.*, 2016).

*Sporothrix stenoceras* é a espécie mais importante do complexo *S. stenocera* (*S. africana*, *S. narcissi*, *S. protearum*, *S. splendens*, *S. stenoceras* e *S. zambiensis*) (De Beer; Duong; Wingfield, 2016), pois é a única responsável por causar doença em humanos e animais, porém com raros relatos (Mariat e De Bievre, 1968; Rodrigues *et al.*, 2015a; Rodrigues *et al.*, 2015b). É uma espécie encontrada no ambiente, geralmente isolada de solos e madeiras em diversos continentes (De Beer *et al.*, 2003; Novotný e Šrůtka, 2004; Musvuugwa *et al.*, 2016).

## 2.4 Morfologia

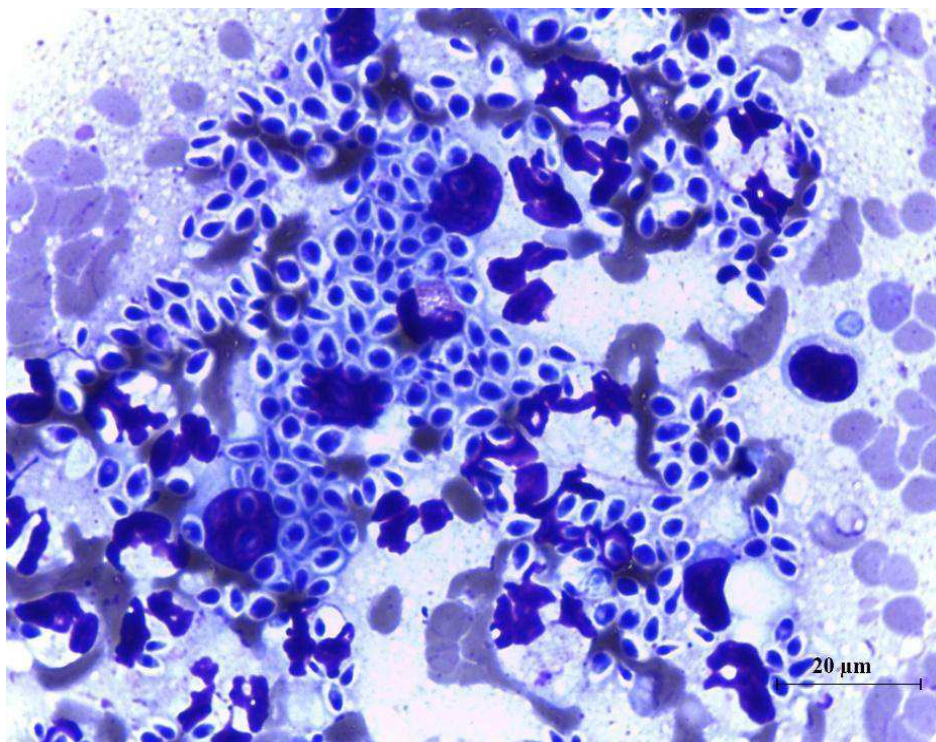
As espécies do complexo *Sporothrix schenckii* são classificadas como dimórficas, isto é, apresentam variação na sua morfologia, com formas filamentosa e leveduriforme, respectivamente no estágio saprofítico e na fase infecciosa no hospedeiro (Han, 2020).

A forma filamentosa é observada em temperaturas mais amenas como 25-27°C no ambiente ou cultivada *in vitro*. Microscopicamente, são observados conídios, com a forma elíptica e o tamanho variando de 2 a 3 µm, em forma de margarida, inseridos nos pequenos conidióforos ou sobre hifas ramificadas e septadas (Oliveira, 2014a). Os conídios têm uma morfologia que varia de globosos, ovais ou triangulares e não produzem cadeias, estão geralmente ligados individualmente ao longo da hifa, na forma de conídios sésseis (Marimon *et al.*, 2007).

Macroscopicamente, a cultura tem o aspecto micelial branco, com colônias filamentosas que podem ser lisas, enrugadas ou cremosas, porém nunca cotonosas. A coloração se converte em marrom a preto devido à produção de melanina pelos conídios, dispostos em floretes em uma hifa (conidióforo) (Guirado *et al.*, 2018). A produção de melanina diferencia as espécies patogênicas das não patogênicas (Rossato, 2017; Téllez-Martínez *et al.*, 2019). O crescimento possui um período variável, pois pode ocorrer em 5 a 7 dias, ou durar várias semanas (Gremião *et al.*, 2021).

O formato leveduriforme pode variar de redondo, oval ou até em forma de charuto, com tamanho de 2 a 6 µm de diâmetro (Figura 1), observadas em lesões de animais infectados ou quando cultivadas *in vitro* a 37 °C (Silva *et al.*, 2018). As colônias leveduriformes macroscopicamente são lisas com coloração creme ou levemente amarronzada (Arenas *et al.*, 2018).

**Figura 1** - Formas leveduriformes de *Sporothrix* spp. Panótico rápido.



Fonte: Laboratório de Patologia Veterinária da UEMA

## 2.5 Patogenia

A transmissão do fungo ocorre quando há inoculação de conídios ou leveduras no tecido subcutâneo com solução de continuidade, o animal ou ser humano entram em contato com vegetais em decomposição “contaminados” ou pela arranhadura de gatos, que alberguem o fungo em suas unhas (Orofino-Costa, *et al.*, 2017).

Na transmissão da forma clássica, que ocorre quando o animal sofre um ferimento traumático de origem vegetal, como o solo ou madeira contaminados com fungo (De Oliveira Bento *et al.*, 2021), é necessário ocorrer a diferenciação do fungo da fase filamentosa para a forma celular de levedura e assim inicie a sua multiplicação. Por este motivo, o período de incubação da doença é mais prolongado quando comparado com casos de transmissão zoonótica (Cruz *et al.*, 2013).

A ocorrência da doença por inalação de fungos na terra é rara, e quando ocorre pode evoluir para uma infecção benigna restrita a pele e tecido subcutâneo, ou progredir para um quadro grave disseminado, atingindo os ossos e órgãos internos (Nelson e Couto, 2015).

A esporotricose humana é uma zoonose, geralmente transmitida pelo gato (Rodrigues *et al.*, 2016; Gonçalves *et al.*, 2019) e pode ser considerada uma doença ocupacional porque normalmente acomete indivíduos que manuseiam à terra, como, por exemplo, floristas e

jardineiros ou aqueles que lidam diretamente com os animais (De Oliveira Bento *et al.*, 2021; Schubach *et al.*, 2003).

## 2.6 Fatores de virulência

O fator de virulência é o conjunto de mecanismos desenvolvidos por um patógeno para sobreviver às condições hostis e promover seu crescimento no hospedeiro. Nesse processo, o agente patogênico se torna mais virulento e capaz de produzir doença no seu hospedeiro (Casadevall, 2012). Os fungos desenvolveram mecanismos que permitiram a sua sobrevivência às variações climáticas e nutricionais para que estes se adaptassem tanto ao meio ambiente quanto ao organismo de seus hospedeiros. Os principais mecanismos desenvolvidos pelos fungos, inclusive o gênero *Sporothrix* são a adesão, o dimorfismo fúngico, a termotolerância, a produção de melanina, formação de biofilmes e a evasão do sistema imunológico (Téllez *et al.*, 2014; Tamez-Castrellón *et al.*, 2020).

Dimorfismo é a capacidade que alguns fungos têm de modificar a sua morfologia por meio de um processo de diferenciação celular, geralmente relacionado a resposta do fungo a um estímulo térmico ou outras condições ambientais, que induzem a troca entre as fases leveduriforme e filamentosa de um fungo (Bonifaz; Tirado-Sánchez, 2017; García Carnero, 2018a). No caso dos fungos do gênero *Sporothrix*, o dimorfismo está diretamente relacionado à termotolerância, que é a habilidade dos fungos em suportar e crescer na temperatura corpórea dos hospedeiros endotérmicos (Hogan; Klein; Levitz, 1996). No meio ambiente, o fungo apresenta a forma filamentosa (25 °C) entretanto, ao parasitar o corpo humano ou o corpo do animal, este se desenvolve na forma de conídio. Uma vez no organismo de seu hospedeiro à temperatura de 37 °C, se diferencia em levedura, permitindo a instalação da infecção no corpo do hospedeiro (Téllez *et al.*, 2014; Sizar e Talati, 2022).

A produção de melanina é um importante fator de virulência para os fungos, que pode ocorrer por três vias: DHN-melanina (1,8-di-hidroxinaftaleno), a eumelanina e a piomelanina. No fungo do gênero *Sporothrix*, a produção de melanina ocorre pelos conídios e é visualizada macroscopicamente nas colônias pigmentadas na fase micelial e também por leveduras na fase patogênica (García-Carnero *et al.*, 2022). O pigmento tem como funções: aumentar a permanência do microrganismo no hospedeiro, melhorar a sua resistência a processos de fagocitose, diminuir a susceptibilidade de degradação enzimática, a toxicidade dos metais pesados, a radiação UV, mudanças extremas de temperatura e a ação dos radicais livres de oxigênio e nitrogênio (Almeida-Paes *et al.*, 2012; Téllez *et al.*, 2014). Outra importante função da melanização é a redução da suscetibilidade do fungo aos antifúngicos

como a anfotericina B (García Carnero, *et al.*, 2018a) e a terbinafina (Almeida-Paes *et al.*, 2016).

Outro fator que contribui para a habilidade de evasão da resposta do sistema imunológico é a produção do peróxido de ergosterol em leveduras. O Ergosterol é encontrado na membrana celular do fungo e ao reagir com o peróxido de hidrogênio, produzido pelo macrófago, gera o peróxido de ergosterol, que funciona como um mecanismo de proteção à fagocitose (Sgarbi *et al.*, 1997; Carlos *et al.*, 2009).

A adesão do fungo às células endoteliais e epiteliais é essencial para o estabelecimento da infecção. No caso do *Sporothrix* spp., as adesinas realizam a ligação de leveduras na matriz extracelular da derme (Aung; Spelman; Thompson, 2015; García Carnero *et al.*, 2018a). A adesina mais conhecida é a glicoproteína de 70 kDa, ou GP 70 (Conceição-Silva *et al.*, 2018). Essa proteína é importante para a modulação da resposta imunológica do hospedeiro, pois realiza a ligação do fungo na derme e na matriz subendotelial do hospedeiro (Téllez *et al.*, 2014; Aung; Spelman; Thompson, 2015), além de ser altamente imunogênica. A GP 70 já foi relatada nas espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis* e *S. globosa* (Mora-Montes *et al.*, 2015; García-Carnero *et al.*, 2018b).

As proteases são enzimas extracelulares produzidas para auxiliar no processo nutrição, crescimento, invasão tecidual e evasão do sistema imunológico. As proteases identificadas no *S. schenckii* tem a habilidade de hidrolisar substratos naturais da pele, como o colágeno, a elastina e o estrato córneo (Tsuboi *et al.*, 1987; Yoshiike *et al.*, 1993), e também atuam diretamente nas fibras do citoesqueleto no processo infeccioso (Sabanero López *et al.*, 2018). É importante ressaltar que apesar da eficiente atividade enzimática, os fungos do gênero *Sporothrix* não conseguem penetrar na pele íntegra (Chakrabarti *et al.*, 2015; Lopes-Bezerra *et al.*, 2018).

## 2.7 Formas clínicas

A esporotricose é uma micose cutânea causada pelo *Sporothrix* spp., um fungo de ampla distribuição mundial que afeta várias espécies animais tais como: cães, gatos, cavalos, mulas, bovinos, aves e seres humanos (Lacaz, *et al.*, 1991; Aillo, 2001; Cruz, 2010). A doença pode se manifestar nas formas: cutânea, localizada ou disseminada, linfo cutânea e extracutânea (Téllez *et al.*, 2014; Macedo-Sales, 2018).

Na forma cutânea localizada, as lesões se restringem apenas ao local da inoculação, com bordas hiperêmicas e geralmente ulceradas, podendo se apresentar também como pápulas que fistulam, úlceras, placas achatadas e lesões eritemato-escamosas (Song *et al.*,

2011; Orofino-Costa *et al.*, 2017). A forma cutânea disseminada se apresenta como múltiplas lesões cutâneas, disseminadas na pele e podem estar associadas ou não a múltiplos traumas. Ocorre principalmente em pacientes imunossuprimidos, que após a inoculação o patógeno, invade a corrente sanguínea e se dissemina (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Na forma linfocutânea, as lesões se iniciam no local de inoculação do fungo, mas a lesão evolui para os vasos linfáticos, no qual são formados múltiplos nódulos novos ao longo dos vasos linfáticos formando uma espécie de colar. É apresentação mais comum em humanos, se manifestando em cerca de 75% dos casos da doença (Rodrigues *et al.*, 2020).

A forma extracutânea da esporotricose se manifesta com o comprometimento de, ossos e olhos, meninges e outras mucosas (Araujo e De Santana Leal, 2016; Poester *et al.*, 2018) sem necessariamente a presença de lesões na pele. O tecido ósseo é o mais acometido depois do cutâneo (Ramos *et al.*, 2021), com o envolvimento dos ossos e as articulações, em geral, devido ao trauma direto, por invasão de lesão cutânea preexistente ou disseminação hematogênica secundária (Orofino-Costa *et al.*, 2017).

Nos felinos, os sinais clínicos são semelhantes aos observados no homem, que variam desde uma única lesão até lesões múltiplas e formas sistêmicas, que evoluem quase sempre para um quadro de óbito (Gonçalves *et al.*, 2019; Gondim & Leite, 2020). Macroscopicamente, as lesões apresentam um padrão ulcerados com liberação de exsudato castanho-escuro ou nodulares com comprometimento de vasos linfáticos adjacentes, ou eritematosas (Pires, 2017). Em alguns animais são observados sinais como linfadenite, linfangite nodular ascendente, áreas teciduais com necrose e exposição de musculatura e ossos (Larsson, 2011; Santos, 2019).

## 2.8 Diagnóstico

O diagnóstico da esporotricose é realizado pela avaliação clínica do paciente, a epidemiologia local e a realização de exames laboratoriais (Lopes-Bezerra *et al.*, 2018). A confirmação do diagnóstico pode ser feita por várias técnicas, tais como: citologia, cultura fúngica, histopatologia e as técnicas moleculares realizados com o material de secreção ou raspado das lesões, que permitirão direta e/ou indiretamente verificar a presença do fungo no material coletado ou em tecidos das lesões (Gremião *et al.*, 2014; Bazzi *et al.*, 2016). A escolha do exame deve considerar o quadro clínico do paciente, pois em alguns casos o resultado pode ser inconclusivo devido à pouca quantidade de células fúngicas no material ou pela predominância de outros agentes nas lesões (Hygino Da Cruz, 2013).

A realização do diagnóstico diferencial é muito importante, pois as lesões de esporotricose são semelhantes às observadas em outras doenças de cães e gatos, como criptococose, leishmaniose, micobacteriose, neoplasias e piodermites (Mauldin; Peters-Kennedy, 2016).

### **2.8.1 Citológico**

O exame citopatológico é realizado a partir da análise do material exsudativo das lesões. Na análise microscópica, são observadas leveduras com formato oval a arredondadas, ou com a morfologia semelhante a um “charuto”, forma mais característica, que podem estar no citoplasma de macrófagos ou livres. Os felinos apresentam uma elevada carga fúngica de estruturas leveduriformes em suas lesões, fator que favorece a utilização do exame citológico para o diagnóstico da doença (Miranda *et al.*, 2013). As vantagens desta técnica são o baixo custo, a rapidez no resultado e sensibilidade diagnóstica de até 87% (Jéssica *et al.*, 2015; Macêdo-Sales *et al.*, 2018).

### **2.8.3 Histopatológico**

O exame histopatológico consiste na coleta de pequenos fragmentos das lesões cutâneas, por biópsia ou na necropsia do animal, que após fixação em formalina tamponada a 10%, são submetidos ao processamento histológico. Microscopicamente, são observadas leveduras com um centro basofílico e um halo claro, associadas a um infiltrado inflamatório granulomatoso com necrose caseosa ou de liquefação (De Souza *et al.*, 2018).

As colorações de rotinas, como a Hematoxilina e Eosina (HE) podem ser empregadas, porém, a aplicação de colorações especiais como o Ácido Periódico-Schiff (PAS) e metenamina de prata de Grocott-Gomori (GMS) facilitam o diagnóstico com a visualização mais detalhada do fungo no tecido (Mauldin; Peters-Kennedy, 2016; Castro *et al.*, 2017). O histopatológico é uma alternativa de diagnóstico quando não é possível se realizar a cultura fúngica. É indicado para diagnóstico da esporotricose em cães e humanos, que por apresentarem baixa carga de leveduras fúngicas nas lesões cutâneas, podem ser avaliadas a partir das alterações inflamatórias nos tecidos, associadas também as marcações histoquímicas dos corantes especiais (Morgado *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013).

### **2.8.4 Imuno-histoquímica**

A técnica de imuno-histoquímica também pode ser utilizada, apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 88% em gatos (Silva *et al.*, 2018), porém não é uma

realidade para muitos locais devido à necessidade de anticorpos comerciais que apresentam um elevado custo, limitando o uso da técnica a apenas alguns centros diagnósticos que o produzem (Bazzi *et al.*, 2016; Gremião *et al.*, 2021).

### 2.8.5 Cultivo fúngico

O cultivo fúngico é considerado o diagnóstico definitivo, pois é possível realizar isolamento e identificação morfológica da espécie nas formas micelial e leveduriforme (Almeida *et al.*, 2018), a partir de crostas, secreções ou fragmentos de biopsias de lesões. Os meios de cultura mais utilizados são Ágar Sabouraud simples, Ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol ou ainda o Ágar Sabouraud acrescido de Cloranfenicol e Cicloheximida. (Rudramurthy e Chakrabarti, 2017). A técnica também tem suas limitações como o tempo para o crescimento do fungo e a identificação da espécie, que é geralmente classificada em *Sporothrix spp.* ou *Sporothrix schenckii sensu lato*, pois a caracterização das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* só é possível com a aplicação conjunta de técnicas morfológicas, fisiológicas e moleculares (Lozoya-Pérez *et al.*, 2020).

### 2.8.6 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares possuem melhor especificidade, sensibilidade e precisão para identificação da espécie (Zhang *et al.*, 2019b). Permitem a identificação do agente a partir de culturas fúngicas, em fragmento de tecido fresco, congelado ou parafinado. Os ensaios moleculares têm como premissa à amplificação do DNA para detectar *Sporothrix spp.* em amostras clínicas sem a necessidade de posterior sequenciamento, com mais sensibilidade e reduzindo consideravelmente o tempo do diagnóstico (Rodrigues; De Hoog; De Camargo, 2015).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica utilizada para a caracterização molecular da espécie (Marimon *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2013), e tem como referência o gene da calmodulina (CAL) para identificação das espécies do gênero *Sporothrix* (Marimon *et al.*, 2007; New, *et al.*, 2019). Marimon *et al.* (2006), ao avaliarem 60 isolados de *S. schenckii lato sensu* identificaram espécies críticas, analisando o gene de 3 proteínas (quitina sintase,  $\beta$ -tubulina e calmodulina). Em 2007, os mesmos pesquisadores realizaram a caracterização fenotípica e análise genética comparando as sequências do gene da calmodulina em 127 isolados e confirmaram a existência de 3 novas espécies, propondo uma nova chave de caracterização fenotípica e validação do gene da calmodulina como um marcador para identificação das espécies que compõem o complexo (Marimon *et al.*, 2007).

De Oliveira *et al.* (2012) utilizando a técnica PCR *fingerprinting* de T3B conseguiram distinguir de 15 cepas clínicas de *Sporothrix* spp. com 100% de concordância quando comparada a técnica com avaliação das sequências de calmodulina. Posteriormente, em 2015, a viabilidade da técnica foi confirmada com avaliação de cepas ambientais e propôs a aplicação da técnica em laboratórios clínicos de micologia (Oliveira *et al.*, 2015a).

Outra técnica utilizada por Oliveira *et al.* (2015b) para identificação da espécie foi a espectrometria de massa, *matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS), que demonstrou capaz de distinguir os isolados de *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. pallida*. Os resultados foram satisfatórios, pois a técnica permitiu identificar espécies tanto de origem ambiental quanto clínicas, além de possuir um preparo e análise mais simples e rápido facilitando a sua aplicação por laboratórios de micologia e reclassificação de isolados de coleções (Lima-Neto *et al.*, 2014).

Na busca de estabelecer a RCA (*Rolling Circle Amplification*) para a identificação das espécies de *Sporothrix* spp., Rodrigues *et al.* (2015b) desenvolveram uma técnica baseada no polimorfismo no gene da calmodulina a identificação de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. pallida*, com alta de especificidade e sensibilidade. Os benefícios dessa técnica quando comparado a uma PCR é que pode ocorrer à temperatura ambiente, por se tratar de uma reação isotérmica, não sendo necessário a utilização de equipamentos como termocicladores para sua realização. Além de possuir alta especificidade e sensibilidade de detectar as sequências do DNA alvo mesmos em baixas concentrações (Goo e Kim, 2016).

Recentemente, Zhang *et al.* (2019 a) desenvolveram um novo protocolo utilizando a PCR Real-Time Multiplex para diagnóstico da esporotricose causada por *S. brasiliensis*, *S. schenckii stricto sensu* e *S. globosa*, correlacionando os resultados com os da cultura e da PCR espécie-específica verificaram bons resultados na detecção do fungo e classificaram como eficiente, aplicável e de rápida replicação para o diagnóstico.

## **2.9 Medidas profiláticas e de controle da esporotricose**

No controle da esporotricose felina, as principais medidas de prevenção são a castração, isolamento e tratamento de animais doentes, descarte correto dos cadáveres de animais que vieram a óbito e a orientação do tutor para reduzir os riscos de contaminação.

A principal medida de controle da esporotricose é a castração dos felinos, pois reduz o comportamento territorial do animal que constantemente entram em conflito com outros animais por controle do território e por fêmeas, facilitando a disseminação da doença por animais doentes por meio de arranhões e mordidas (Barros *et al.*, 2010; Almeida e Almeida, 2015).

O descarte dos cadáveres dos animais que vieram a óbito ou foram eutanasiados, deve ser realizado de forma correta, uma vez que o fungo apresenta capacidade de crescer no meio ambiente. Segundo a Resolução nº5, de agosto de 2003, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, resíduos que apresentem risco potencial a saúde pública e ao meio ambiente pela presença de agentes biológico como cadáveres de animais infectados por agentes do complexo *S. schenckii* é indicada a realização de esterilização ou incineração desses resíduos (Andrade *et al.*, 2002).

A eutanásia é indicada para pacientes com resposta terapêutica insatisfatória após avaliação de um médico veterinário ou no caso de formas graves da doença em que o tutor não demonstra interesse em prosseguir com o tratamento do animal (Barros *et al.*, 2010; Gremião *et al.*, 2021).

É importante orientar os tutores sobre o isolamento dos animais doentes durante o tratamento, para reduzir o risco de disseminação no meio ambiente e para outros animais. A utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) como luvas descartáveis, máscara, óculos e jalecos são necessários para manipulação dos animais doentes, limpeza do ambiente e dos utensílios do animal e inibir acidentes como mordidas e arranhões (Silva *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2018).

A orientação da população sobre posse responsável é uma grande medida de prevenção. Pois os tutores recebem orientações sobre manejo dos animais, vacinação, controle populacional e orientações sobre saúde (Silva *et al.*, 2020). A conscientização sobre posse responsável é essencial nos casos de esporotricose felina, uma vez que é responsabilidade do tutor não abandonar o animal, realizar o tratamento e manter o isolamento neste período (Gremião *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Caracterizar a esporotricose felina do ponto de vista clínico, cito-histomorfológico e molecular na Ilha de São Luís.

#### 3.2 Específicos

- Descrever as alterações cito-histomorfológica das lesões da esporotricose em felinos;
- Realizar o diagnóstico micológico a partir de exame direto de felinos com esporotricose e obtenção do agente etiológico em cultura;
- Identificar as espécies de *Sporothrix* spp. pela técnica molecular;
- Avaliar a diversidade genética dos isolados de *Sporothrix* spp.;

## REFERÊNCIAS

- Aiello, S.E. **Manual Merck de Veterinária**. 8. ed. São Paulo: Roca 2001. p. 307, 308, 447, 448, 855-857, 864, 925, 926.
- Almeida, Adriana J. *et al.* Esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) em Campos dos Goytacazes, RJ. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1438-1443, 2018.
- Almeida, L.G.F., Almeida, V. G. F. Uma revisão interdisciplinar da esporotricose. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v.4, n.2, p.180-192, 2015.
- Almeida-Paes, R. *et al.* Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and environmental microbiology*, v. 78, n. 24, p. 8623-8630, 2012.
- Almeida-Paes, R. *et al.* Melanins Protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the Antifungal Effects of Terbinafine. **PLoS one**, v. 11, n. 3, p. e0152796, 2016.
- Amazonas. Lei nº 5.411, de 24 de fevereiro de 2021. **DISPÕE** sobre a notificação compulsória de todos os casos confirmados de esporotricose no âmbito do Estado do Amazonas. Manaus: Assembleia Legislativa do Estado do Amazonas, [2021]. Disponível em: <[https://legis.la.imprensaoficial.am.gov.br/diario\\_am/12/2021/3/5482](https://legis.la.imprensaoficial.am.gov.br/diario_am/12/2021/3/5482)>. Acesso em: 23 de out. 2023.
- Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p.
- Araujo, A. K. L.; De Santana Leal, C. A. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. **Pubvet**, v. 10, p. 795-872, 2016.
- Arenas, R.; Sanchez-Cardenas, C. D.; Ramirez-Hobak, L.; Ruiz Arriaga, L. F.; Vega Memije, M. E. Sporotrichosis: from KOH to molecular biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 1-10, 2018.
- Aung, A. K.; Spelman, D. W.; Thompson, P. J. Pulmonary sporotrichosis: An evolving clinical paradigm. **Seminars in respiratory and critical care medicine**, v. 36, n. 5, p. 756–766, 2015.
- Barros, M. B. *et al.* Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic. **Revista Panamericana de Salud Publica= Pan American Journal of Public Health**, v. 27, n. 6, p. 455-460, 2010.
- Barros, M. B. L. *et al.* An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology and infection**, v. 136, n. 9, p. 1192–1196, 2008.
- Bazzi, T.; Melo, S.M.P.; Figuera, R.A.; Kommers, G.D. Características clínico-epidemiológicas e histoquímicas da esporotricose felina. *Pesq. Vet. Bras.*, v.36, n.4, p.303-311, 2016.
- Bento, Aurélio de Oliveira. **Propagação da esporotricose zoonótica causada por *sporothrix brasiliensis* em direção à região nordeste do Brasil**. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Bimbi, C.; Brzeziński, P. Cutaneous sporotrichosis as an occupational disease: Case report. **Our Dermatology Online**, v. 8, n. 1, p. 37, 2017.

Bonifaz, A.; Tirado-Sánchez, A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. **J. Fungi**, v. 3, n. 6, p. 1–13, 2017.

Brum, L. C. *et al.* Revista: Clínica veterinária. Principais dermatoses zoonóticas de cães e gatos, Pg. 29-46, V. 69, 2017. Disponível em: <https://issuu.com/clinicavet/docs/clinicavet69>. Acesso em: 20 set. 2022.

Carlos, I. Z. *et al.* Current research on the immune response to experimental sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 168, n. 1, p. 1–10, 2009.

Carmichael, J. W. Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 8, p. 1137-1173, 1962.

Carneiro, Liliane Almeida; PETTAN-BREWER, Christina. One health conceito, história e questões relacionadas –revisão e reflexão. In: MIRANDA, Antônio Marcos Mota. Pesquisa em saúde & ambiente na Amazônia: perspectivas para sustentabilidade humana e ambiental na região. Guarujá: Científica Digital. 2021.332 p. p. 219–240.

Casadevall, A. Amoeba provide insight into the origin of virulence in pathogenic fungi. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 710, p. 1–10, 2012.

Castro, N.B., Rolim, V.M., Nascimento, L.C. *et al.* Doenças micóticas em gatos no Rio Grande do Sul. **Pesq. Vet. Bras.** v.37, n.11, p. 1313-1321. 2017.

Caus, A.L.O. 2013. Esporotricose no estado do espírito santo: um estudo de três décadas. Dissertação de Mestrado, **Universidade Federal do Espírito Santo**. Disponível em: [http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese\\_6764\\_Dissertac%26%23807%3Ba%26%23771%3Bo%20Mestrado%20Antonio%20Caus.pdf](http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_6764_Dissertac%26%23807%3Ba%26%23771%3Bo%20Mestrado%20Antonio%20Caus.pdf). Acesso em: 06/03/24

Cavalcanti, E. A. N. L. D. *et al.* Esporotricose: Revisão. **PUBVET**, v. 12, n. 11, p. 1–5, 2018

Chakrabarti, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 2015.

Chaves, A. R. *et al.* Treatment abandonment in feline sporotrichosis—Study of 147 cases. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 2, p. 149-153, 2013.

Chaves, A. R. *et al.* Treatment abandonment in feline sporotrichosis - study of 147 cases: Feline sporotrichosis abandonment therapy. **Zoonoses and public health**, v. 60, n. 2, p. 149–153, 2013.

Conceição-Silva, F.; Morgado, F. N. Immunopathogenesis of human sporotrichosis: What we already know. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, p. 89, 2018.

Corrêa-Moreira, Danielly *et al.* Clinical and anatomopathological evaluation of balb/c murine models infected with isolates of seven pathogenic *Sporothrix* species. **Pathogens**, v. 10, n. 12, p. 1647, 2021.

Cruz, L.C.H. *Sporothrix schenckii*. In: Micologia Veterinária. 2ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. p. 142-151

- D'alessandro, Enrico *et al.* Draft genome sequence of the dimorphic fungus *Sporothrix pallida*, a nonpathogenic species belonging to *Sporothrix*, a genus containing agents of human and feline sporotrichosis. **Genome Announcements**, v. 4, n. 2, p. 10.1128/genomea.00184-16, 2016.
- De Beer, Z. W. *et al.* Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 434–441, 2003.
- De Beer, Z. Wilhelm; Duong, Tuan A.; Wingfield, Michael J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in mycology**, v. 83, n. 1, p. 165-191, 2016.
- De Farias, Marconi Rodrigues *et al.* Canine bone sporotrichosis: a case report. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 1445-1450, 2015.
- De 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**, v. 9, n. 2, p. 7-7, 2018.
- De Oliveira Bento, Aurélio *et al.* The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009693, 2021.
- De Oliveira, M. M. E. *et al.* Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 6, p. 2159–2162, 2012.
- De Oliveira, M. M. E. *et al.* Sporotrichosis Caused By *Sporothrix globosa* in Rio De Janeiro, Brazil: Case Report. **Mycopathologia**, v. 169, n. 5, p. 359–363, 4 fev. 2010.
- De 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**, v. 8, n. 1, 2018.
- Dos Santos, A. R. *et al.* Emergence of zoonotic sporotrichosis in Brazil: a genomic epidemiology study. **The Lancet Microbe**, 2024.
- Fernandes, G. F. *et al.* Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 241-249, 2013.
- França, H. E. P. *et al.* SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DA ESPOROTRICOSE HUMANA NO NORDESTE BRASILEIRO. **Revista Eletrônica da Estácio Recife**, v. 8, n. 1, 2022.
- Freitas, D. C.; Migliano, M. F.; Zani-Neto, L. Esporotricose. Observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v. 5, p. 601-604, 1956.
- García Carnero, L. C. *et al.* Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 4, n. 3, p. 100, 2018a.
- García-Carnero, L. C. *et al.* Current trends to control fungal pathogens: exploiting our knowledge in the host–pathogen interaction. **Infection and drug resistance**, v. 11, p. 903–913, 2018b.

García-Carnero, L.C.; Martínez-Álvarez, J.A.. Virulence factors of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, p. 318, 2022.

Gonçalves, J.C.; Gremião, I.D.F.; Kölling, G.; Duval, A.E.A.; Ribeiro, P.M.T. Esporotricose, o gato e a comunidade. *Enciclopédia Biosfera*, v.16, n.29, p.769-787, 2019.

Gondim, A.L.C.L.; Leite, A.K.A. Aspectos gerais da esporotricose em pequenos animais e sua importância como zoonose. *Revista Brasileira de Educação e Saúde*. v.10, n.2, p.37-44, 2020.

Gonsales, F. F. *et al.* Direct PCR of lesions suggestive of sporotrichosis in felines. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 2002-2006, 2020.

Goo, N. I.; Kim, D. E. Rolling circle amplification as isothermal gene amplification in molecular diagnostics. **Biochip journal**, v. 10, n. 4, p. 262–271, 2016.

Gremião, I.D.F.; Miranda, L.H.M.; Reis, E.G, Rodrigues, A.M.; Pereira, S.A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v.13, n.1, 2017.

Gremião, I. D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Sabouraudia**, v. 53, n. 1, p. 15-21, 2014.

Gremião, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 52, p. 107-124, 2021.

Guarro, J.; Gené, J.; Stchigel, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical microbiology reviews**. V. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.

Guirado, G. M. De P. *et al.* Analysis of laser therapy effects in *Sporothrix schenckii* inactivation in vivo. **Research on Biomedical Engineering**, v. 34, n. 2, p. 93–101, 2018.

Han, H. S. Sporotrichosis. In: Noli, C.; Colombo, S. (Eds.). *Feline Dermatology*. Cham: Springer International Publishing, 2020. p. 329–343.

Hektoen, L.; Perkins, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **J. Exp. Med.**, v.5, n.1, p.77–89, 1900.

Hernández-Castro, R. *et al.* Epidemiology of clinical sporotrichosis in the Americas in the last ten years. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 588, 2022.

Hernández-Castro, R. *et al.* Epidemiology of clinical sporotrichosis in the Americas in the last ten years. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 588, 2022.

Hogan, L. H.; Klein, B. S.; Levitz, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 4, p. 469–488, 1996.

Hygino Da Cruz, C. L. COMPLEXO *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Vet. Zoot.**, p. 08–28, 2013.

Jessica, N. *et al.* Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 8, p. 880-884, 2015.

Lacaz, C.S. *et al.* Esporotricose e outras micoses gomosas. In: **Micologia médica**. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 233-247.

Larsson, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.48, n.3, p.250-259, 2011

Lima-Neto, R. *et al.* Application of MALDI-TOF MS for requalification of a *Candida* clinical isolates culture collection. **Brazilian journal of microbiology**, v. 45, n. 2, p. 515–522, 2014.

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**, v. 56, n. suppl\_1, p. S126-S143, 2018.

Lozoya-Pérez, N. E. *et al.* Influences of the culturing media in the virulence and cell wall of *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis*, and *Sporothrix globosa*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 323, 2020.

Luiz, R. L. F. Avaliação da sensibilidade da técnica de PCR para diagnóstico da esporotricose felina e canina em peles emblocadas em parafina. 2021. 76 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) - Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2021.

Lutz, A.; Splendore, A. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Rev Med, São Paulo**, v. 10, p. 443-450, 1907.

Macedo-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. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 9, n 2. p. 13-19, 2018.

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**, v. 173, n. 4, p. 265–273, 2012.

Maia, M. A. *et al.* Perfil Epidemiológico de Gatos com Esporotricose no Município de São Paulo (SP), 2011 a 2022. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-7, 2023.

Mariat, F.; De Bievre, C. "Caracteres de la croissance et évolution de la teneur en constituants cellulaires des phases levure et filamenteuse de *Sporotrichum schenckii*, champignon dimorphique pathogene pour l'homme." **In Annales de l'Institut Pasteur**. Vol. 115, pp. 1082-1098, 1968.

Marimon, R. *et al.* Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-3256, 2006.

Marimon, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

Marimon, R. *et al.* *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621–625, 2008.

- Marques, C. J. R. *et al.* *Sporothrix schenckii* in feline in the state of Maranhão-case report. **Acta Veterinária Brasilica**, v. 7, n.1, p. 297-298, 2013.
- Mauldin, A. E., Peters-Kennedy, J. Integumentary System. In: Maxie MG, ed. Jubb, Kennedy and Palmers Pathology of Domestic Animals. 6th ed. Vol 1. New York, NY: Elsevier Saunders; 2016. 509 -736p.
- Milan, E. P. *et al.* Estudo clínico e epidemiológico dos pacientes com esporotricose No Estado Do Rio Grande do Norte entre outubro de 2016 e março de 2023. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, p. 103286, 2023.
- Miranda, L.H.M.; Silva, J.N.; Gremião, I.D.F. *et al.* Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. **Journal of Fungi**, v.4, n.92, p.1-11, 2018.
- Miranda, L.H. *et al.* Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology Microbiology & Infection Disease**. v. 36: p. 425-432, 2013.
- Mora-Montes, H. M. *et al.* Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 6, p. fov065, 2015.
- Morgado, D. S. *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. **Current Research in Microbial Sciences**, v. 3, n. 100140, p. 100140, 2022.
- Morgado, F. *et al.* The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. **Medical Mycology**. v. 49: p. 612–620, 2011.
- Morrison, A. S. *et al.* An environmental *Sporothrix* as a cause of corneal ulcer. **Medical mycology case reports**, v. 2, p. 88-90, 2013.
- Musvuugwa, T. *et al.* Wounds on *Rapanea melanophloeos* provide habitat for a large diversity of *Ophiostomatales* including four new species. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 109, n. 6, p. 877–894, 2016.
- Nakasu, C. C. T. *et al.* Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 163-171, 2021.
- Nelson, R. W.; Couto, C.G. Medicina interna de pequenos animais, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., 2015, 1512p.
- New, D. *et al.* Identification of multiple species and subpopulations among Australian clinical *Sporothrix* isolates using whole genome sequencing. **Medical mycology: official publication of the International Society for Human and Animal Mycology**, v. 57, n. 7, p. 905–908, 2019.
- Novotný, D.; Šrůtka, P. *Ophiostoma stenoceras* and *O. grandicarpum* (Ophiostomatales), first records in the Czech Republic. **Czech mycology**, v. 56, n. 1–2, p. 19–32, 2004.

- Oliveira, D. C. *et al.* Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, 2011b.
- Oliveira, J. C. Tópicos em Micologia Médica. Editora: Rio de Janeiro; 2014a, 230 págs.
- 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**, v. 166, n. 2, p. 102–110, 2015b.
- Oliveira, M. M. E. *et al.* Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 6, 2015a.
- Oliveira, M. M. E.; Almeida-Paes, R.; Gutierrez-Galhardo, M. C.; Zancoppe-Oliveira, R. M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 31, n. 1, p. 2–6, 2014b.
- Orofino-Costa, R. *et al.* Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, p. 757-777, 2022.
- Orofino-Costa, R. *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, p. 606-620, 2017.
- Oyarce, J. A.; García, C.; Alave, J.; Bustamante, B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. **Revista Chilena de Infectología**, v. 33, n. 3, p. 315-321, 2016.
- Padhye, A. A. *et al.* Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2492–2494, 1992.
- Pires, C. Esporotricose felina: revisão de literatura. **Revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia do Conselho Regional de Medicina Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 16-23, 2017.
- Poester, V. R. *et al.* *Sporothrix* spp. evaluation in soil of a hyperendemic area for sporotrichosis in southern Brazil. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 19, p. 1-8, 2018.
- Queiroz-Telles, F.; Buccheri, R.; Benard, G. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 8, 2019.
- Queiroz-Telles, F. *et al.* *Sporothrix* and sporotrichosis. **Encyclopedia of Infection and Immunity**, v. 2, p. 376-396, 2022.
- Rabello, V. B. S. *et al.* The historical burden of sporotrichosis in Brazil: a systematic review of cases reported from 1907 to 2020. **Brazilian journal of microbiology**, v. 53, n. 1, p. 231-244, 2022.
- Ramos, V. *et al.* Bone sporotrichosis: 41 cases from a reference hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009250, 2021.
- Rippon, J. W. **Medical mycology: Pathogenic fungi and the pathogenic Actinomycetes**. 3. ed. Londres, England: W B Saunders, 1988.

- Rodrigues, A. M. *et al.* Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1385, 2015b.
- Rodrigues, A. M.; Choappa, R. C.; Fernandes, G. F.; *et al.* *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fung Biol.**, v. 120, p. 246-264, 2020.
- Rodrigues, A. M.; De Hoog, G. S.; De Camargo, Z. P. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015a.
- Rodrigues, A. M.; De Hoog, G. S.; De Camargo, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, p. e1005638, 2016.
- Rodrigues, A. M.; De Hoog, S.; De Camargo, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.
- Rodrigues, A.M.; Della Terra, P.P.; Gremião, I.D.; Pereira, S.A.; Orofinocosta, R.; De Camargo, Z.P.. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.
- Rossato, L. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. **São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2017.
- 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**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.
- Rudramurthy, S. M.; Chakrabarti, A. Sporotrichosis: Update on diagnostic techniques. **Current fungal infection reports**, v. 11, n. 3, p. 134–140, 2017.
- Rüegg, S. R.; Häsler, B.; Zinsstag, J. Integrated Approaches to Health: A Handbook for the Evaluation of One Health. Wageningen: Academic Publishers, 2018.
- Sabanero López, M. *et al.* Proteases of *Sporothrix schenckii*: Cytopathological effects on a host-cell model. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 35, n. 1, p. 32–38, 2018.
- Santiso, G. *et al.* Sporotrichosis in Argentina: clinical and epidemiological analysis. **Biomedica**, v. 43, p. 109-119, 2023.
- Santos, A. F. *et al.* Feline sporotrichosis: Characterization of cutaneous and extracutaneous lesions using different diagnostic methods. **Veterinary Pathology**, v. 61, n. 2, p. 221-231, 2024.
- Santos, A. F. *et al.* Esporotricose felina: distribuição das lesões e caracterização anatomopatológica em gatos utilizando diversos métodos de diagnóstico. 2019.
- SANTOS, A. F. *et al.* Guia prático para enfrentamento da esporotricose felina em Minas Gerais. **Revista Veterinária & Zootecnia em Minas**, v. 137, n. 38, p. 16-27, 2018.
- Schenck, B.R. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* v.9, p. 286-290, 1898.
- Schubach, T. M. P. *et al.* Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **The veterinary record**, v. 152, n. 6, p. 172–175, 2003.

Schubach, T. M. P.; Menezes, R. C.; Wanke, B. Esporotricose. In: Greene, C. E. **Doenças Infeciosas em cães e gatos**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. Cap. 61, p. 678- 684.

SESA/RN - SECRETARIA DE ESTADO DA SAUDE PUBLICA DO RIO GRANDE DO NORTE. NOTA TÉCNICA Nº 9/2020/SESA: Orientações sobre a notificação da esporotricose no Rio Grande do Norte, 2020. Disponível em:<

[https://sei.rn.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&codigo\\_verificador=7225259&codigo\\_crc=0202EB2B&hash\\_download=d6af97c76ff68e3461864d8f7296f3ea26b215726394d9b18a5f437de69322638ad9bae7b776e1c419647c04c8a655f39dcab6b6aa69ab7a57e5600410bb8818&visualizacao=1&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.rn.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&codigo_verificador=7225259&codigo_crc=0202EB2B&hash_download=d6af97c76ff68e3461864d8f7296f3ea26b215726394d9b18a5f437de69322638ad9bae7b776e1c419647c04c8a655f39dcab6b6aa69ab7a57e5600410bb8818&visualizacao=1&id_orgao_acesso_externo=0)>. Acesso em: 30 de outubro de 2023.

SESA-PR. Resolução SES nº093/2022. Define a Esporotricose Humana e Animal como doenças de interesse estadual e de notificação compulsória nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território estadual. Paraná, 2022. Disponível em: <[http://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/file:///C:/Users/Allan/Downloads/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20n%C3%A9%20093\\_2022%20%20Define%20esporotricose%20de%20Interesse%20estadual%20e%20de%20notifica%C3%A7%C3%A3o%20compuls%C3%B3ria%20\(2\).pdf](http://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/file:///C:/Users/Allan/Downloads/Resolu%C3%A7%C3%A3o%20n%C3%A9%20093_2022%20%20Define%20esporotricose%20de%20Interesse%20estadual%20e%20de%20notifica%C3%A7%C3%A3o%20compuls%C3%B3ria%20(2).pdf)>. Acesso em: 25 de outubro de 2023.

SES-MG. Resolução SES nº 6.532 de 05 de dezembro de 2018. Acrescenta Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública de Interesse Estadual à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Minas Gerais, 2018. Disponível em: <[chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/RESOLU%C3%87%C3%83O\\_6532%20SES%20MG.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/saude/RESOLU%C3%87%C3%83O_6532%20SES%20MG.pdf)>. Acesso em: 25 de outubro de 2023.

SES-PB. Resolução CIB/SES-PB nº 80 de 07 de Agosto de 2018. SES-PB acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Diário Oficial do Estado da Paraíba. 07 ago 2018. Disponível: <<http://static.paraiba.pb.gov.br/2018/08/Diario-Oficial-22-08-2018.pdf>>. Acesso em 02 de janeiro de 2024.

SES-PE. Portaria nº 390 de 14 de Setembro de 2016. SES-PE acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de Pernambuco. 14 set 2016. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=328576>>. Acesso em 25 de outubro de 2023.

SES-RJ. Cenário epidemiológico: esporotricose no estado RJ. 2019. Boletim epidemiológico esporotricose nº 001/2019. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br/Publico/MostrarArquivo.aspx?C=qEn%2BgM71w8A%3D>>. Acesso em: 25 de outubro de 2023.

Sgarbi, D. B. *et al.* Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 139, n. 1, p. 9–14, 1997.

Silva, D. C. B. C. da, 2020. A importância da implantação de programas sociais de castração de felinos: o que os tutores e veterinários sabem a respeito da relação da reprodução desses animais com a saúde pública e o que tem sido feito? Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCA.

- Silva, J. N. *et al.* Comparison of the sensitivity of three methods for the early diagnosis of sporotrichosis in cats. **Journal of comparative pathology**, v. 160, p. 72-78, 2018.
- Sizar, O.; Talati, R. Sporotrichosis (*Sporothrix schenckii*). StatPearls. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532255/>>. Acessado dia 21/06/2022.
- SMS-BA. Portaria Secretaria Municipal da Saúde nº191 de 27 de março de 2018. Institui a inclusão da esporotricose na lista de doenças e agravos de notificação compulsória no município de Salvador e dá outras providências. Salvador, 2018. Disponível em: <[efaidnbmnfnbcajpcgklcfeinmkaj/https://emevz.ufba.br/sites/emevz.ufba.br/files/portaria-municipal-191-de-2018-inclusao-da-esporotricose-na-lista-de-doencas-e-agravos-de-notificacao-compulsoria.pdf](https://efaidnbmnfnbcajpcgklcfeinmkaj/https://emevz.ufba.br/sites/emevz.ufba.br/files/portaria-municipal-191-de-2018-inclusao-da-esporotricose-na-lista-de-doencas-e-agravos-de-notificacao-compulsoria.pdf)>. Acesso em: 30 de novembro de 2023.
- SMS-SP. Portaria Secretaria Municipal da Saúde nº470 de 30 de novembro de 2020. Inclui, no município de São Paulo, a notificação compulsória de esporotricose. São Paulo, 2020. Disponível em: <<https://legislacao.prefeitura.sp.gov.br/leis/portaria-secretaria-municipal-da-saude-sms-470-de-30-de-novembro-de-2020>>. Acesso em: 30 de novembro de 2023.
- Song, Y.; Yao, L.; Zhong, S. X.; Tian, Y. P.; Liu, Y. Y.; Li, S. S. Infant sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases. **International Journal of Dermatology**, v. 50, n. 5, p. 522-529, 2011
- Tamez-Castrellón, A. K.; Romeo, O.; García-Carnero, L. C.; Lozoyapérez, N. E.; Mora-Montes, H. M. Virulence Factors in *Sporothrix schenckii*, One of the Causative Agents of Sporotrichosis. **Curr. Protein Pept. Sci.**, v. 21, n. 3, p. 295– 312, 2020.
- Téllez, M. D. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, n. 11, p. 2352-2365, 2014.
- Téllez-Martínez, D. *et al.* Adaptive stress response induced by toluene increases *Sporothrix schenckii* virulence and host immune response. **bioRxiv**, p. 539775, 2019.
- Thomson, J. *et al.* An atypical cause of sporotrichosis in a cat. **Medical mycology case reports**, v. 23, p. 72-76, 2019.
- TSUBOI, R. *et al.* Isolation and properties of extracellular proteinases from *Sporothrix schenckii*. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4104–4109, 1987.
- Yoshiike, T. *et al.* Antibody raised against extracellular proteinases of *Sporothrix schenckii* in *S. schenckii* inoculated hairless mice. **Mycopathologia**, v. 123, n. 2, p. 69–73, 1993.
- Yu, X. *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 67–74, 16 jun. 2013.
- Zamboni, R. *et al.* Estudo retrospectivo de esporotricose em felinos domésticos (*Felis catus domesticus*) errantes na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, em um período de 10 anos (2012-2022). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e55911226102-e55911226102, 2022.
- Zhang, M. *et al.* Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007219, 2019a.

Zhang, Shu; Zhang, Yong-Jie; Li, Zhi-Liang. Complete mitogenome of the entomopathogenic fungus *Sporothrix insectorum* RCEF 264 and comparative mitogenomics in *Ophiostomatales*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, p. 5797-5809, 2019b.

Zhang, Y. *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia**, v. 35, n. 1, p. 1–20, 2015

## **CAPÍTULO 2 - Feline sporotrichosis an emerging disease in Maranhao State**

(Submetido a revista Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical – Qualis B1)

## Feline Sporotrichosis an Emerging Disease in Maranhao State

Allana F. Barros<sup>1</sup>, Juliana S. Vitor<sup>2</sup>, Yanara R. C. M. Esposito<sup>2</sup>, Wendel F. F. Moreira<sup>1</sup>,  
Nayara S. Oliveira<sup>1</sup>, Luana A. Madureira<sup>1</sup>, Fábio H. E. Andrade<sup>1</sup>, Fernando Almeida-  
Souza<sup>1,3</sup>, Larissa S. Santos<sup>1</sup>, Ana L. Abreu-Silva<sup>1\*</sup>

- 1 Post-Graduation Program in Animal Science, State University of Maranhão, São Luis - 65055-310, Brazil; allana.fbarros@gmail.com; nayara.vet15@gmail.com; ellainymaria@hotmail.com; wendelmoreira1997@hotmail.com; fabioandrade@professor.uema.br; larissa.sarmiento@uema.br; abreusilvaana@gmail.com.
- 2 Graduate student in Veterinary Medicine, State University of Maranhão, São Luis - 65055-310, Brazil; julianasavet@gmail.com; monteiroyanara@gmail.com.
- 3 Protozoology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21041-250, Brazil; fernandoalsouza@gmail.

Registrid ORCID:

<https://orcid.org/0000-0002-8850-0987>

<https://orcid.org/0009-0003-4261-6321>

<https://orcid.org/0009-0005-1416-1985>

<https://orcid.org/0000-0001-5777-6326>

<https://orcid.org/0000-0002-3626-4943>

<https://orcid.org/0000-0002-6420-2002>

<https://orcid.org/0000-0001-8237-1988>

<https://orcid.org/0000-0003-0047-6159>

<https://orcid.org/0000-0003-2167-3725>

**ABSTRACT.-** Sporotrichosis is a cutaneous mycosis caused by saprophyte fungi of the genus *Sporothrix* spp. *Sporothrix brasiliensis* is responsible for endemic outbreaks in felines and humans in Brazil. This report describes a case of feline sporotrichosis referred to the dermatology sector of the Veterinary Hospital Francisco Edilberto Uchôa Loes of the State University of Maranhao, Sao Luis, Brazil. The owner reported that the 3-year-old male feline had a small lesion, which was nonhealing and ulcerated in the right thoracic limb. In the cytological examination, fungal yeasts were observed, and a sample of the lesion's secretion was collected for a fungal culture. Oral treatment with itraconazole 100mg/S.I.D. was indicated for 30days. However, after 30days of treatment, no signs of improvement were observed, and potassium iodide 20mg/kg/S.I.D was added, orally for another 30days. In the fungal culture, hyaline hyphae and round conidiophores were organized in daisy format, confirming the presence of *Sporothrix* spp on morphological examination. After 60days, the clinical picture of the patient worsened, new skin lesions emerged, and dyspnea occurred; the owner refused to continue treatment, and euthanasia was requested. During necropsy, multiple skin lesions were observed in the snout, ears, eyelids, thorax, and pelvic limbs. The histopathological examination of these lesions exhibited an abundance of yeasts in the superficial and deep dermis, associated with an intense lymph-histiocyte inflammatory process. No lesions were found in the other organs. The polymerase chain reaction confirmed that *S. brasiliensis* was the agent responsible for the clinical picture of the cat.

INDEX TERMS: Sporotrichosis, zoonosis, feline, *Sporothrix* spp, fungal resistance.

**RESUMO.- [Esporotricose felina: uma doença emergente no estado do Maranhão.]** A esporotricose é uma micose cutânea causada por fungos saprófitas do gênero *Sporothrix* spp. No Brasil, a espécie *Sporothrix brasiliensis* é responsável por surtos endêmicos em felinos e humanos. Este relato descreve um caso de esporotricose felina encaminhado ao setor de dermatologia do Hospital Veterinário Francisco Edilberto Uchôa Lopes da Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brasil. O proprietário relatou que um felino macho de 3 anos apresentava uma pequena lesão ulcerada, que não cicatrizava no membro torácico direito. No exame citológico, foram observadas leveduras fúngicas, e uma amostra da secreção da lesão foi coletada para cultura fúngica. Foi indicado tratamento oral com itraconazol 100mg/S.I.D. por 30 dias. No entanto, após 30 dias de tratamento, não foram observados sinais de melhora, e foi

adicionado ao tratamento iodeto de potássio 20mg/kg/S.I.D., via oral, por mais 30 dias. Na cultura fúngica foram observadas hifas hialinas e conidióforos redondos que se organizavam em formato de margarida, confirmando a espécie *Sporothrix* spp no exame morfológico. Após 60 dias, o quadro clínico do paciente piorou, surgiram novas lesões cutâneas e um quadro de dispneia, o proprietário demonstrou recusa em continuar o tratamento e foi solicitada a eutanásia. Durante a necropsia, foram observadas múltiplas lesões cutâneas no focinho, orelhas, pálpebras, tórax e membros pélvicos. O exame histopatológico dessas lesões mostrou abundância de leveduras na derme superficial e profunda, associadas a um intenso processo inflamatório linfo-histiocitário. Não foram encontradas lesões nos outros órgãos. A reação em cadeia da polimerase confirmou que o *S. brasiliensis* era o agente responsável pelo quadro clínico do gato.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Esporotricose, zoonose, felino, *Sporothrix* spp, resistência fúngica.

## INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by pathogenic fungi of the complex *Sporothrix schenckii*, often found in vegetation and soil, and mainly affect cats, dogs, and humans (Pires, 2017; Ramírez-Soto *et al.*, 2018). *Sporothrix* spp. are considered pathogenic (Rodrigues *et al.*, 2020), with greater attention to *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, and *S. schenckii* (De Beer *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2020), which cause infections in humans and animals, affecting public health. Sporotrichosis is an endemic disease with several cases described in the literature in South America, North America, Central America, Europe, Asia, Africa, and Oceania (one case) (Morgado *et al.*, 2022).

Currently, several cases have been reported in the Northeast region, chiefly in the states of Pernambuco (Spinelli *et al.*, 2021), Paraíba (Angelo *et al.*, 2023), Alagoas (Marques-Melo *et al.* 2014), Rio Grande do Norte (De Oliveira Bento *et al.* 2021), Bahia (Guimarães & Guimarães 2021), and Ceará (Aguiar *et al.* 2023). In Brazil, *S. brasiliensis* is the most predominant species in zoonotic outbreaks (Rossow *et al.* 2020, Valdez *et al.* 2023).

Cats are nocturnal and peridomiciliary, have habits of fighting for territories and females for reproduction, have scratches and bites, and for this reason, are the most frequent forms of transmission (Andrade *et al.* 2021). The high fungal load in lesions is a significant factor in the transmission of the disease in urban environments because of their proximity to humans, hygiene habits, and environmental interactions with soil and trees, which are places where the fungus usually thrives (De Miranda *et al.* 2018, Rodrigues *et al.* 2020). These factors facilitate the maintenance of the fungi in the cat's body, particularly in the oral and nasal cavity, and their dissemination in the environment by acts of sharpening the nails and digging the earth (Macêdo-Sales *et al.* 2018, Schubach *et al.* 2015). Another form of transmission is traumatic inoculation in the subcutaneous tissue of conidia and hyphae in soil or organic matter (Orofino-Costa *et al.* 2017).

Fungal culture is the gold standard diagnosis because of its high sensitivity for samples with low fungal load (Rodrigues *et al.* 2020). However, other tests can be performed as a presumptive diagnosis, such as cytological and histopathological examinations (Gremião *et al.* 2021). Molecular techniques were initially employed for the identification of the responsible *Sporothrix* spp., subsequently adapted for the diagnosis of sporotrichosis in the clinical routine (De Carvalho *et al.* 2022, Rodrigues *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2019).

Treatment of sporotrichosis consists of antifungal drug therapy for a prolonged period, about 2–3 months, which can usually be maintained up to a month after the complete remission of lesions. The most used drugs are itraconazole, potassium iodide, terbinafine, fluconazole, and amphotericin B (Nakasu *et al.* 2021, Rocha *et al.* 2018).

Based on the data cited and the importance for public health, this study aims to report a case of feline sporotrichosis in Sao Luís to alert to the occurrence of the disease in the region and inform veterinarians and the local community as a current challenge in the diagnosis and treatment.

## CASE REPORT

A 3-year-old male feline, crossbreed and noncastrated, was referred to the Dermatology of the Veterinary Hospital of the State University of Maranhão (HVU-UEMA), Sao Luís, Brazil, with a history of an ulcerated non-healing lesion in the digit of the left thorax, which occurred after the animal escape from the home environment.

Hematological and biochemical tests, skin cytology, and feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FELV) tests were requested. No significant clinical changes were observed in the blood count, and the FIV and FELV tests were negative. In the cytological evaluation, yeast structures ranged from round to oval, with a basophilic nucleus and a clear halo, phagocytized by segmented and hypersegmented macrophages and neutrophils (Fig. 1).

Until the definitive diagnosis was reached, therapy with antifungal itraconazole (Itraspor®, Ems Sigma Pharma LTDA, Sao Bernardo do Campo, Brazil) 100mg/S.I.D. for 30days was initiated because the macroscopy of the lesion was suggestive of sporotrichosis, and the presence of fungal structures was observed by cytological examination.

For definitive diagnosis, lesion exudate was collected through a sterile swab, transported in Stuart medium, and sent to the Veterinary Mycology Laboratory of the UEMA for fungal cultures and the identification of the etiological agent. The swab was seeded in a plate with Sabouraud agar plus chloramphenicol and kept in an oven BOD incubator at 25°C for 21days, with periodic monitoring of the fungal colony.

The macroscopic evaluation of the fungal culture showed that with 7days of growth, the culture presented a white-to-cream appearance with a moist and smooth aspect, which progressively changed to brown with a leathery aspect. A micromorphological evaluation was performed in microculture, with hyaline hyphae, slender, septate conidia with a rounded shape, presenting a “daisy” arrangement. Thus, they are compatible with *Sporothrix spp.* (Fig. 2).

The feline returned after 30 days of antifungal therapy, presenting no positive response to treatment, which was confirmed by the appearance of new lesions. The combined treatment with Itraspor® with potassium iodide 20mg/kg/S.I.D. (formulated drug) for 60 days was recommended. After 2 months of combined treatment, the feline presented with a worsening clinical picture, with respiratory symptoms such as sneezing, runny nose, and ulcers in the nostrils, ears, eyelids, thorax, and pelvic limbs, low body score, and slight regression of skin lesions (Fig. 3), presenting the disseminated cutaneous form of sporotrichosis. The owner decided to euthanize the animal because of prolonged treatment and lack of clinical improvement. The animal was later taken to the Veterinary Pathology Laboratory at the UEMA for necropsy.

No gross lesions were observed at the necropsic examination, except in the skin or mucosa. Fragments of cutaneous lesions were collected for histopathological examination and stained with hematoxylin and eosin and Schiff's periodic acid (PAS). The histopathological examination showed an intense lymph–histiocyte inflammatory process and abundant intrahistiocyte or free yeasts in the superficial and deep dermis of the samples (Fig. 4).

Species identification was performed by molecular tests of fungal cultures. DNA extraction was performed using the phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol described by Sambrook and Russell (2001). Polymerase chain reaction (PCR) was performed following the methods described by Rodrigues *et al.* (2015) for the amplification of the calmodulin gene (CAL), using the primers SbraF (CCC CCG TTT GAC GCT TGG) and SbraR (CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT). PCR products were observed in SYBR gel® Safe DNA Gel Stain and visualized under UV light after electrophoresis (60 V, 40 min). The sample presented an amplified product for the C.A.L. gene for *S. brasiliensis*.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first documented case in the Maranhao State. However, other clinicians have reported skin lesions resembling sporotrichosis, a global zoonosis that mainly affects felines (Rossow *et al.* 2020). In this species, the most observed clinical form is the disseminated cutaneous form, similar to that observed in the presented feline, with multiple ulcerated lesions distributed throughout the body. These lesions or ulcerated nodules present hemorrhagic discharge in the face and limbs and can be observed in areas of alopecia and crusts (Boechat *et al.* 2018, Rossow *et al.* 2020). Despite the poor state of the animal, internal organ lesions were not found, which generally occur in immunocompromised animals; in this case, the animal was negative for FIV and FELV, which explains the absence of no lesions in organs.

Histopathology with the application of histochemical staining as PAS was another technique used for the diagnosis of sporotrichosis; in this report, malformed granulomas with an abundance of yeasts in the deep and superficial dermis and lymphohistiocytic inflammatory infiltrate could be visualized. The presence of malformed granulomas and the intense fungal load are factors associated with treatment failure and the longer healing time of the lesion (De Souza *et al.* 2018, Miranda *et al.* 2013). In this study, fungal species identification was performed using the species-specific PCR technique from an isolate of fungal culture, and the result was positive

for *S. brasiliensis*. This species is involved in human and feline infections and is almost always related to cases of high virulence and resistance to antifungal treatments (Gremião *et al.* 2021).

The feline presented with respiratory symptoms such as sneezing and difficulty breathing because lesions were formed on the snout. Respiratory lesions are challenging to treat and are often associated with lesions refractory to antifungal treatment, and some cases end in death (Rocha *et al.* 2018, De Souza *et al.* 2018). De Miranda *et al.* (2018) described that cats with multiple skin lesions are likelier to have failures or more prolonged itraconazole treatment. The treatment of sporotrichosis is based on three points: the clinical disease form, immune status of the host, and species involved (Orofino-Costa *et al.* 2017). In this report, the fungus showed resistance to standard treatment with itraconazole. Melanization is an auxiliary factor in this process because pigment production helps fungi resist environmental and host variations (Almeida-Paes *et al.* 2016, Waller *et al.* 2021). The occurrence of fungal isolates resistant to itraconazole is one of the main difficulties in treating sporotrichosis (Espinell-Ingroff *et al.* 2017). The combination of itraconazole with potassium iodide for the treatment of sporotrichosis in humans with refractory cases showed clinical cure results (Lyra *et al.* 2021, Poester *et al.* 2022), and it has been adapted for use in cats with sporotrichosis (Nakasu *et al.* 2021, Reis *et al.* 2016).

Another factor that directly affects the treatment of animals with sporotrichosis is the involvement of the owners, as they are essential for administering medications and controlling of isolation of sick animals. Gremião *et al.* (2021) assert that tutors often give up the treatment of sick animals because of the cost of medications, duration of treatment, difficulty in the administration of medications for cats, and the high risk of transmission of the disease to the family or the animal handler.

## CONCLUSION

Feline sporotrichosis is a zoonosis that should be included as a differential diagnosis of cutaneous mycoses in humans and animals because the disease is spreading widely. Cats with the widespread form of the disease may be resistant to itraconazole therapy. Atypical conditions related to sporotrichosis in cats, particularly in endemic areas, require special attention from veterinarians for the guidance of tutors, disease risks, and importance of treating sick animals to prevent the spread of the disease to healthy animals. Thus, diagnostic tools with greater precision and accuracy, such as molecular tests, are needed to identify *Sporothrix* through PCR, especially in regions that do not present official notification of sporotrichosis.

**Acknowledgments.-** This study was financed in part by “Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão” (FAPEMA) awarded scholarship to the first author. This study was financed in part by the “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES), Brazil – Finance Code 001” and State University of Maranhão (UEMA).

**Conflict of interest statement.-** The authors declare no conflicts of interest.

## REFERENCES

- Aguiar B. A., Borges I. L., Silva B. W. L., Rodrigues F. R. N., Gonçalves L. D., Casseb A. R., Brito J. S., Pinheiro A. Q., Rocha M. F. G., Viana D. A. 2023. First case report of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in the state of Ceará–Brazil. *Med Mycol Case Rep.* 40: 12-15. <<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2023.02.005>> <PMid: 36915619 >
- Almeida-Paes R., Figueiredo-Carvalho M. H. G., Brito-Santos F., Almeida-Silva F., Oliveira M. M. E., Zancopé-Oliveira R. M. 2016. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One.* 11(3): e0152796. <[10.1371/journal.pone.0152796](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152796)><PMid: 27031728>
- Álvarez-Acevedo L., Zuleta-González M. C., Gómez-Guzmán O. M., Rúa-Giraldo A. L., Hernández-Ruiz O., McEwen-Ochoa J. G., Urán-Jiménez M. E., Arango-Arteaga L. M., Zancopé-Oliveira R. M., Oliveira M. M. E., Jiménez-Alzate M. P. 2023. Phenotypic and genotypic characterization of Colombian clinical isolates of *Sporothrix* spp. *Biomédica.* 43(1): 216-228. <<https://doi.org/10.7705/biomedica.6898>> <PMid: 37721906>
- Andrade E. H. P., Moreira S. M., Paiva M. T., Zibaoui H. M., Salvato L. A., Azevedo M. I., Oliveira C. S. F., Soares D. F. M., Keller K. M., Magalhães S. L., Morais M. H. F. M., Costa J. R. R.,

- Bastos C. V. 2021. Characterization of animal sporotrichosis in a highly urbanized area. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 76: 101651 < <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101651>> <PMid: 33915403>
- Angelo D. F.S., Rabello V. B. S., Maciel M. A. S., Atanázio S. S. L. A., Costa M. C. L. C., Silva S. R., Almeida-Paes R., Bernades-Engemann A. R., Zancopé-Oliveira R. M., Clementino I. J. 2023. *Sporothrix brasiliensis* infecting cats in northeastern Brazil: New emerging areas in Paraíba state. *Cienc Rural.* 53(10): e20220351. < <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220351>>
- Barros M. B. L., Almeida-Paes R., Schubach A. O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 24(4): 633-654. <<https://doi.org/10.1128/cmr.00007-11>> <PMid: 21976602>
- Benedict K., Jackson B. 2020. Sporotrichosis cases in commercial insurance data, United States, 2012–2018. *Emerg Infect Dis.* 26(6): 2783-2785. <<https://doi.org/10.3201%2Fid2611.201693>> <PMid: 33079045>
- Boechat J. S., Oliveira M. M. E., Almeida-Paes R., Gremião I. D. F., Machado A.C. S., Oliveira R.V.C., Figueiredo A. B. F., Rabello V. B. S., Silva K. B. L., Zancopé-Oliveira R. M., Schubach T. M. P., Pereira S. A. 2018. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 113(3): 185-196. < <https://doi.org/10.1590/0074-02760170407>> <PMid: **29412358**>
- Cabeza E., Arrillaga A., Dalcín L., Carbia M., Arteta Z., Perera. 2022. Clinical and Epidemiological Characteristics of Sporotrichosis in a Reference Center of Uruguay. *J Fungi (Basel).* 8(322): 2-9. < <https://doi.org/10.3390/jof8030322> > <PMid: **35330324**>
- Costa M. C., Sá N. P., Johann S., Santos D. A. 2019. Social, environmental and microbiologic aspects of endemic mycoses in Brazil. *New Microbes New Infect.* 29(C):100496. < <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.11.004>> <PMid: 30949344>
- De Beer Z. W., Duong T. A., Wingfield M. J. 2016. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Stud Mycol.* 83: 165-191. < [10.1016/j.simyco.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.07.001)> <PMid: **27616802**>
- De Carvalho J. A., Monteiro R. C., Hagen F., Camargo Z. P., Rodrigues A. M. 2022. Trends in molecular diagnostics and genotyping tools applied for emerging *Sporothrix* species. *J Fungi (Basel).* 8(8): 809 < <https://doi.org/10.3390/jof8080809>> <PMid: **36012797**>
- De Oliveira Bento A., de Sena Costa A.S., Lima S.L., do Monte Alves M., de Azevedo Melo A.S., Rodrigues A.M., Silva-Rocha W. P., Milan E. P., Chaves G. M. 2021. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. *PLoS Negl Trop Dis.* 15(8): e0009693. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009693>> <PMid: 34460830>
- De Souza E. W., Borba C. M., Pereira S. A., Gremião I. D. F., Langohr I. M., Oliveira M. M. E., Oliveira R. V. C., Cunha C. R., Zancopé-Oliveira R. M., Miranda L. H. M., Menezes R. C. 2018. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Sci Rep.* 8: 9074. <[10.1038/s41598-018-27447-5](https://doi.org/10.1038/s41598-018-27447-5)> <PMid: 29899416>
- De Miranda L. H. M., Silva J. N., Gremião I. D. F., Menezes R. C., Almeida-Paes R., Reis E. G., Oliveira R. V. C., Araujo D. S. A., Ferreiro L., Pereira S. A. 2018. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. *J Fungi (Basel).* 4(92): 2-11. <<https://doi.org/10.3390%2Fjof4030092>> <PMid:30087237>
- Espinel-Ingroff A., Abreu D. P. B., Almeida-Paes R., Brilhante R. S. N., Chakrabarti A., Chowdhary A., Hagen F., Córdoba S., Gonzalez G. M., Govender N. P., Guarro J., Johnson E. M. Kidd S. E., Pereira S. A., Rodrigues A. M., Rozental S., Szeszs M. W., Ballesté Alaniz R., Bonifaz A., Bonfietti L. X., Borba-Santos L. P., Capilla J., Colombo A. L., Dolande M., Isla M. G., Melhem M. S. C., Mesa-Arango A. C., Oliveira M. M. E., Panizo M.M., Pires de Camargo Z., Zancopé-Oliveira R. M., Meis J. F., Turnidge J. 2017. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix*

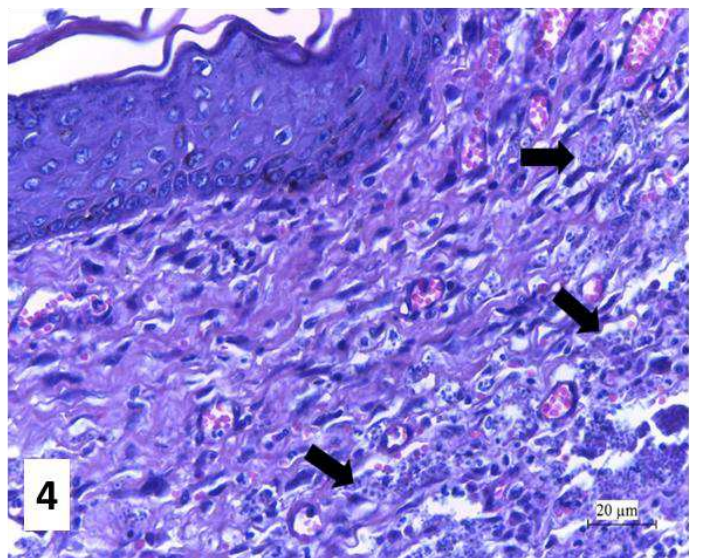
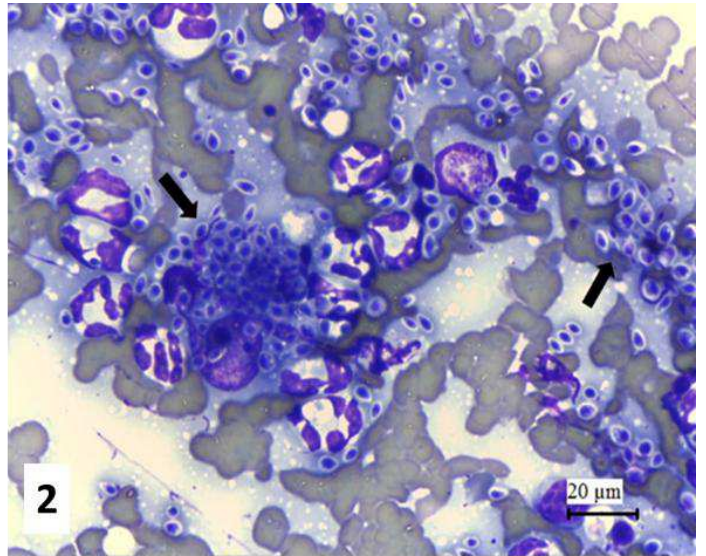
- species identified by molecular methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 61(10): E01057-17. < 10.1128/AAC.01057-17> <PMid: **28739796**>
- Falcão E. M. M., Filho J. B. L., Campos D. P., Valle A. C. F., Bastos F. I., Gutierrez- Galhardo M. C., Freitas D. F. S. 2019. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). *Cad Saude Publica.* 35(4): e00109218. < <https://doi.org/10.1590/0102-311X00109218>>
- Gondim A. L. C. L., Leite A. K. A. 2020. Aspectos gerais da esporotricose em pequenos animais e sua importância como zoonose. *Rev. Bra. Edu. Saúde.* 10(2):37-44. < <https://doi.org/10.18378/rebes.v10i2.7571>>
- Guimarães, T. M., Guimarães, A. B. 2021. Esporotricose felina: Relatos de caso. *Pubvet.* 16(1): 1-6. < <https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n01a1005.1-6>>.
- Gremião I. D. F., Menezes R. C., Schubach T. M. P., Figueiredo A. B. F., Calvacanti M. C. H., Pereira S. A. 2015. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycol.* 53(1): 15–21. < 10.1093/mmy/myu061> <PMid: **25477076**>
- Gremião I. D. F., Oliveira M. M. E., Miranda L. H. M., Freitas D. F. S., Pereira S. A. 2020. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 26(3): 621-624. < 10.3201/eid2603.190803> <PMid: 32091376>
- Gremião I. D. F., Rocha E. M. S., Montenegro H., Carneiro A. J. B., Xavier M. O., Farias M. R., Monti F., Mansho W., Pereira R. H. M. A., Pereira S. A., Lopes-Bezerra L. M. 2021. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Braz J Microbiol.* 52(1): 107-124. <10.1007/s42770-020-00365-3> <PMid: **32990922**>
- Jessica N., Sonia R. L., Rodrigo C., Isabella D. F., Tânia M. P., Jeferson C., Anna B. F., Sandro A. 2015. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Medical Mycology.* 53(8):880-884. < <https://doi.org/10.1093/mmy/myv038>>
- Larsson C. E. 2011. Esporotricose. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 48(3): 250-259. < 10.11606/S1413-95962011000300010>
- Lyra M. R., Sokoloski V., Macedo P. M., Azevedo A. C. P. 2021. Sporotrichosis refractory to conventional treatment: therapeutic success with potassium iodide. *An Bras Dermatol.* 96(2): 231-233. <<https://doi.org/10.1016/j.abd.2020.04.013>> <PMid: **33622634**>
- Marques-Melo E. H., Lessa D., Nunes A. C. B. T., Chaves K. P. C., Porto w. J. N., Notomi M. K., Garrido L. H. A. 2014. Felino Doméstico Como Agente Transmissor De Esporotricoses Para Humano-Relato Do Primeiro Caso No Estado De Alagoas. *Rev. Baiana de Saúde Pública.* 38(2): 490-498. <10.5327/Z0100-0233-2014380200018>
- Macêdo-Sales P. A., Souto S. R. L. S., Destefani C. A., Lucena R. P., Machado R. L. D., Pinto M. R., Rodrigues A. M., Lopes-Bezerra L. M., Rocha E. M. S., Baptista A. R. S. 2018. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet Res.* 14(19): 1-10. <10.1186/s12917-018-1340-4>
- Miranda L. H. M., Conceição-Silva F., Quintella L. P., Kuraie B. P., Pereira S. A., Schubach T. M. P. 2013. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 36(4): 425-432. <10.1016/j.cimid.2013.03.005> <PMid: 23623733>
- Nakasu C. C. T., Waller S. B., Ripoll M. K., Ferreira M. R. A., Conceição F. R., Gomes A. R., Osório L. G., Faria R. O., Cleff M. B. 2021. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. *Braz J Microbiol.* 52(1): 163-171. <10.1007/s42770-020-00290-5> <PMid: 32388779>
- Orofino-Costa R., Macedo P. M., Rodrigues A. M., Bernardes-Engemann A. R. 2017. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 92(5): 606-620. < 10.1590/abd1806-4841.2017279> <PMid: **29166494**>
- Oyarce J. A., García C., Alave J., Bustamante B. 2016. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú,

- entre los años 1991 y 2014. *Rev Chilena Infectol.* 33(3): 315-321. < 10.4067/S0716-10182016000300012>
- Pavlidakey P. G., Huynh T., McKay K. M., Sami N. 2015. *Leishmaniasis panamensis* masquerading as myiasis and sporotrichosis: a clinical pitfall. *Case Rep Pathol.* 2015: 949670. < 10.1155/2015/949670> <PMid:26413365>
- Pires, C. 2017. Revisão de literatura: esporotricose felina. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP.* 15(1): 16-23. < <https://doi.org/10.36440/recmvz.v15i1.36758>>
- Poester V. R., Basso R. P., Stevens D. A., Munhoz L. S., Rabello V. B. S., Almeida-Paes R., Zancopé-Oliveira R. M., Zanchi M., Benelli J. L., Xavier M. O. 2022. Treatment of human sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *J Fungi (Basel).* 8(1): 70. < 10.3390/jof8010070> <PMid: 35050010>
- Rabello V. B. S., Almeida M. A., Bernardes-Engemenn A. R., Almeida-Paes R., Macedo P. M., Zancopé-Oliveira R. M. 2022. The historical burden of sporotrichosis in Brazil: a systematic review of cases reported from 1907 to 2020. *Braz J Microbiol.* 53(1): 231-244. < 10.1007/s42770-021-00658-1> <PMid: **34825345**>
- Ramírez-Soto M. C., Aguilar-Ancori E. G., Tirado-Sánchez A., Bonifaz A. 2018. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. *J Fungi (Basel).* 4(3):2-11. <10.3390/jof4030095> <PMid:30103554>
- Ramírez-Soto M. C., Aguilar-Ancori E. G., Quispe-Ricalde M. A., Muñiz-Duran J. G., Quispe-Flores M. M., Chinen A. 2021. Molecular identification of *Sporothrix* species in a hyperendemic area in Peru. *J Infect Public Health.* 14(5):670-673. < <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.02.005>> <PMid: **33865058**>
- Rasamoelina T., Maubon D., Raharolahy O., Razanakoto H., Rakotozandrindrainy N., Rakotomalala F. A., Bailly S., Sendrasoa F., Ranaivo I., Andrianarison M., Rakotonirina B., Andriantsimahavandy A., Rabenja F. R., Andrianarivelo M. R., Ramarozatovo L. S., Cornet M. 2019. Sporotrichosis in the Highlands of Madagascar, 2013–2017. *Emerg Infect Dis.* 25(10):1893-1902. <<https://doi.org/10.3201/eid2509.190700>> <PMid: 31538565>
- Reis E. G., Schubach T. M. P., Pereira S. A., Silva J. N., Carvalho B. C., Quintana M. S. B., Gremião I. D. F. 2016. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. *Med Mycol.* 54(7): 684-690. < 10.1093/mmy/myw027> <PMid: 27207412>
- Rocha R. F. D. B., Schubach T. M. P., Pereira S. A., Reis E. G., Carvalho B. W., Gremião I. D. F. 2018. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. *J Small Anim Pract.* 59(11): 720-721. <10.1111/jsap.12852> <PMid:29708594>
- Rodrigues A. M., De Hoog G. S., De Camargo Z. P. 2015. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(12): e0004190. < [//doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004190)> <26623643>
- Rodrigues A. M., Terra P. P. D., Gremião I. D. G., Pereira S. A., Orofino-Costa R., Camargo Z. P. 2020. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia.* 185(5): 813-842. <10.1007/s11046-020-00425-0> <PMid:32052359>
- Rossow J.A., Queiroz-Telles F., Caceres D. H., Beer K. D., JACKSON B. R., Pereira J. G., Gremião I. D. F., Pereira S. A. 2020. A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in South America. *J Fungi (Basel).* 6(4): 247. < 10.3390/jof6040247> <PMid: **33114609**>
- Sambrook, J. & Russell, D.W. 2001. *Molecular cloning a laboratory manual.* 3rd ed. CSHL Press, New York.
- Santos A. F., Azevedo M. I., Amaral C. I., Grom N. A., Marinho F., Oliveira C. S. F., Soares D. F. M., Morais M. H. F., Brandão S. T., Menezes R. C., Ecco R. 2024. Feline sporotrichosis: Characterization of cutaneous and extracutaneous lesions using different diagnostic methods. *Vet Pathol.* 61(2): 221-23. < 10.1177/03009858231189448> <PMid: **37515437**>

- Schechtman R. C., Falcão E. M. M. F., Carard M., García M. S. C., Mercado D. S., Hay R. J. 2022. Sporotrichosis: hyperendemic by zoonotic transmission, with atypical presentations, hypersensitivity reactions and greater severity. *An Bras Dermatol.* 97(1): 1-13. <10.1016/j.abd.2021.07.003> <PMid: **34893422**>
- Schubach T., Menezes R., Wanke B. 2012. Esporotricose, p.678-684. In: Greene C., *Doenças Infeciosas Em Cães e Gatos*. 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Sharma R., Mahajan V. K., Chauhan P. S., Mehta K. S., Sharma A., Sharma J. 2021. The clinico-epidemiological characteristics and therapeutic experience of 152 patients with cutaneous sporotrichosis: a 10-year retrospective study from India. *Int J Dermatol.* 60(1): 99-106. <10.1111/ijd.15299> <PMid:33166092>
- Spinelli T. P., Bezerra L. M., Souza B. O. F., Rocha A., Neto J. E., Sá F. B. 2021. Primary conjunctival sporotrichosis in three cats from Northeastern Brazil. *Vet Ophthalmol.* 24(2): 209-215. <10.1111/vop.12865> <PMid: **33608958**>
- Toriello C., Brunner-Mendoza C., Ruiz-Baca E., Duarte-Escarlate E., Pérez-Mejía A., Reyes-Montes M. D. R. 2021. Sporotrichosis in Mexico. *Braz J Microbiol.* 52(1): 49-62. <10.1007/s42770-020-00387-x> <PMid: 33125684>
- Valdez A. F., Corrêa-Junior D., Bonilla J. J. A., Zamith-Miranda D., Frases S., Freitas D. F. S., Almeida-Paes R., Nimrichter L., Nosanchuk J. D. 2023. A Review on Sporotrichosis and the Emergence of *Sporothrix brasiliensis* as a Pathogen. *Curr Trop Med Rep.* 10(4):252-261. <10.1007/s40475-023-00297-6>
- Waller S. B., Lana D. F. D., Quatrin P. M., Ferreira M. R. A., Fuentefria A. M., Mezzari A. 2021. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Braz J Microbiol.* 52(1): 73-80. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00307-z> <PMid: **32476087**>
- Watanabe M., Hayama K., Fujita H., Yagoshi M., Yarita K. 2016. A case of sporotrichosis caused by *sporothrix globosa* in Japan. *Ann Dermatol.* 28(2): 251-252. <https://doi.org/10.5021/ad.2016.28.2.251> <PMid: 27081278>
- Zhang M., Li F., Li R., Gong J., Zhao F. 2019. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(2): e0007219. <10.1371/journal.pntd.0007219> <PMid:30817761>

### Figure Legends

Fig.1-4. Feline sporotrichosis. (1) Ulcerated lesions with crusts on the right lower eyelid and snout. (2) Feline macrophages infected with *Sporothrix brasiliensis* yeast cells in shape ranging from rounded to oval with basophilic nucleus and transparent halo (arrows), 100x. (3) Microscopy of culture *Sporothrix brasiliensis* – thin, hyaline hyphae with conidiophores in a characteristic floral arrangement or “daisy-like” shape, lactophenol blue stain, 100x. (4) Numerous rounded and cigar-shaped yeast structures in the superficial dermis (black arrowhead), HE. 40x.



**CAPÍTULO 3 - Phylogenetic analysis of *Sporothrix brasiliensis* isolated from feline sporotrichosis in the Amazon region**

(Submetido a revista Pesquisa Veterinária Brasileira – Qualis A3)

**Phylogenetic analysis of *Sporothrix brasiliensis* isolated from feline sporotrichosis in  
the Amazon region**

Allana Freitas Barros<sup>1</sup>, Juliana Sá Vitor<sup>2</sup>, Yanara Régia Cunha Monteiro Esposito<sup>2</sup>, Nayara Silva Oliveira<sup>1</sup>, Ellainy Maria Conceição Silva<sup>1</sup>, Ilka Márcia Ribeiro de Souza Serra<sup>3</sup>, Thiago Anchieta de Melo<sup>3</sup>, Elmary da Costa Fraga<sup>4</sup>, Alcina Vieira de Carvalho Neta<sup>5</sup>, Fábio Henrique Evangelista de Andrade<sup>5</sup>, Fernando Almeida-Souza<sup>1,6</sup>, Larissa Sarmiento dos Santos Ribeiro<sup>5</sup>, Ana Lucia Abreu-Silva<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Post-Graduation Program in Animal Science, State University of Maranhão, São Luis - 65055-310, Brazil; allana.fbarros@gmail.com; nayara.vet15@gmail.com; ellainymaria@hotmail.com; wendelmoreira1997@hotmail.com

<sup>2</sup> Graduate student in Veterinary Medicine, State University of Maranhão, São Luis - 65055-310, Brazil; julianasavet@gmail.com; monteiroyanara@gmail.com

<sup>3</sup> Chemistry and Biology Department, Phytopathology Laboratory, State University of Maranhão, São Luis 65055-310, Brazil; ilka.serra@uema.br; thiagoanchieta@gmail.com;

<sup>4</sup> Chemistry and Biology Department, State University of Maranhão, Caxias - 65.604-380, Brazil; elmaryfraga@yahoo.com.br

<sup>5</sup> Veterinary Pathology Department, State University of Maranhão, São Luis - 65055-310, Brazil; alcina.carvalhoneta@gmail.com; fabioandrade@professor.uema.br; larissa.sarmiento@uema.br;

<sup>6</sup> Protozoology Laboratory, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21041-250, Brazil; fernandoalsouza@gmail.

\*Correspondence: abreusilva.ana@gmail.com;

**Abstract:** Sporotrichosis is a zoonotic cutaneous mycosis caused by saprophytic fungi belonging to genus *Sporothrix* spp., which affects cats, horses, dogs and humans. The current study aimed to clinically evaluate sporotrichosis in cats and to characterize phenotypically and molecularly *Sporothrix* spp. in Amazon region of São Luís Island. Clinical assessment and cytological examination were carried out, from October 2022 to July 2023, in cats with suspected cases of sporotrichosis treated at Francisco Edilberto Uchôa Lopes Veterinary Hospital, State University of Maranhão. Exudate from animals lesions was collected through exfoliation or imprinting for fungal culture and species identification. Samples of fungi culture were subjected to species-specific PCR, genetic sequencing and, subsequently, to phylogenetic analysis. In total, 46 animals were selected: 33 males and 13 females. Disseminated cutaneous clinical sporotrichosis was observed in 70% of the assessed cats. The body parts that mostly presented lesions comprised face, ears, back of the thoracic region and limbs. Fungal cultures early presented white color that gradually turned blackish and showed coriaceous texture compatible to *Sporothrix* spp. All the 46 samples from fungi culture successfully amplified the CAL gene by PCR conducted with *S. brasiliensis* species-specific primers. Based on phylogenetic analysis applied to the fungal isolates, rates of genetic identity with sequences of *S. brasiliensis* (cal gene) specimens ranged from 90% to 100%. This is the first report that identified, by phylogenetic analysis, *S. brasiliensis* species causing sporotrichosis in felines living in an Amazon region in Brazil.

**Keywords:** *Sporothrix* spp., phylogeny, zoonosis, epidemiology, sporotrichosis, cats, outbreak

## Introduction

Sporotrichosis is a superficial cutaneous mycosis caused by environmental and dimorphic saprophytic fungi belonging to genus *Sporothrix* [1,2]. These fungi affect several animal species, such as horses, camels, cattle, pigs, primates, dogs and domestic cats [3,4].

Fungi belonging to genus *Sporothrix* have the taxonomic classification of kingdom Fungi, Division Ascomycota, Class Pyrenomycetes, Order Ophiostomatales and Family Ophiostomataceae. They are saprobic, immobile and dimorphic fungi [5]. Species belonging to genus *Sporothrix* are split into two clades. One is the pathogenic clade featuring the *Sporothrix schenckii* complex formed by *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* and *S. luriei* (formerly *S. schenckii* var. *luriei*), which accounts for causing the disease in humans and animals. The other one is the environmental clade, which comprises the *S. pallida* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. humicola* and *S. pallida* ex- *S. albicans*) and *S. stenoceras* complexes [6].

Felines living in urban environments are primary hosts for fungi belonging to the *S. schenckii* complex. They can get sporotrichosis either through contact with contaminated soil or through bites or scratches from other sick felines[7].

Sporotrichosis can clinically manifest itself through localized or disseminated cutaneous, lymphocutaneous and extracutaneous lesions [8–10]. Lesions observed in the localized cutaneous form are limited to the inoculation site and exhibits hyperemic and often ulcerated borders. They can also present themselves as papules, ulcers, flat plaques and erythematous-squamous lesions [11]. The disseminated cutaneous form presents multiple cutaneous lesions widespread on skin, which may, or may not, be associated with multiple traumas [12].

The diagnosis of sporotrichosis can be performed by patients clinical assessment, epidemiology and laboratory tests [13]. Several techniques, such as cytology, fungal culture,

histopathology and molecular techniques applied to secretion or scrapings from lesions can be used to confirm sporotrichosis diagnosis [14,15].

The geographical distribution, virulence factors, frequency, environmental features, transmission forms and antifungal susceptibility vary according to the *Sporothrix* species [16]. *S. brasiliensis* is the most widely distributed species in South America, besides being, oftentimes, accountable for epidemic outbreaks, given its high virulence and remarkable ability to evade hosts immune response [17].

Southern and Southeastern Brazil are the regions registering most sporotrichosis cases, whose main predisposing factors are associated with the hot and humid climate and with dogs and cats abandonment [18,19]. Sporotrichosis cases were mainly reported in these regions for several years. However, this disease has been recorded in the Northeastern region, with emphasis on Rio Grande do Norte [20,21], Pernambuco [22], Paraíba [23], Alagoas [24], Bahia [25] and Ceará [26] states.

The Legal Amazon comprises 5.01 million km<sup>2</sup>, equivalent to the States of Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Mato Grosso and part of the State of Maranhão west of the 44W° Meridian, totaling 772 municipalities [27]. The state of Maranhão has two different biomes, the Amazon and the Cerrado, and is considered a transition area with a high diversity of ecosystems and biodiversity [28]. In these tropical and subtropical regions, the occurrence of neglected diseases is common due to low income, poor housing, large populations of infectious vectors, proximity to domestic animals, destruction of natural resources and poor access to healthcare [29].

Sporotrichosis is a neglected zoonotic disease that frequently happens in areas presenting high population density, poor sanitation and socially vulnerable populations [16]. Therefore, it is a public health issue. The aim of this study was to identify the species of *Sporothrix* spp. responsible for feline sporotrichosis, as well as the clinical, phenotypic and molecular characteristics of the disease cycle in the Amazon region of São Luís Island.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1 Ethics Statement*

The current study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of State University of Maranhão (CEEAA/UEMA), under protocol number 60/2021, and it was conducted in accordance with the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

### *2.2 Study site*

The present study was carried out in São Luís Island metropolitan region, which comprises São Luís, São José de Ribamar, Paço do Lumiar and Raposa cities. This region is located in the Legal Amazon region, in Maranhão State's Coastal Region, at the following geographic coordinates: Latitude 02°22'23" and 02°51'00" South; Longitude 44°26'41" and 43°59'41 west" [30].

### *2.3 Animals*

In total, 46 felines (33 males and 13 females) with no distinction as to age, breed or sex, who presented skin lesions suggestive of sporotrichosis, and who were treated at "Francisco Edilberto Uchôa Lopes" Veterinary Hospital of State University of Maranhão, were included in the current study. Animals undergoing treatment with itraconazole or any other antifungal drug were excluded from the study. After the screening procedure, the assessed animals were sent to the Dermatology department to undergo clinical examination of their lesions, anamnesis and clinical history, as well as to collect sample for cytological and fungal culture tests.

### *2.4 Cytology*

Exudate from animals lesions was collected through exfoliation or imprinting to make the cytology slides, which, in their turn, were stained with Romanowsky-type stain

(Rapid Panoptic-Laborclin) to enable visualizing cell and fungal structures, based on the methodology described by [31].

### *2.5 Fungal culture and phenotypic evaluation*

Animals lesions were disinfected with 2% chlorhexidine. Subsequently, lesion exudate samples were collected with the aid of sterile swab and transported in STUART medium, where they were kept for up to 48 hours for fungal culture purposes. Then, fungi were sown on Sabouraud Dextrose agar with chloramphenicol (S.D.A.; BD, Franklin Lakes, NJ, U.S.A.), incubated in BOD oven at 25 °C, and analyzed on a daily basis to evaluate the colony growth for up to 21 days [1]. Colonies suggestive of *Sporothrix* spp. had their macroscopic features, colony surface topography (flat, irregular and wavy, among others), texture (yeasty, glabrous, granular, powdery and cottony) and pigmentation (on the colony surface, colony reverse and diffusion in the medium) assessed. For the phenotypic evaluation, a colony slide was assembled and stained with lactophenol cotton blue for microscopic assessment focused on investigating conidiophores size, shape and organization [32]. After the morphology of *Sporothrix* genus was confirmed, culture fragments were collected for DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) assay.

### *2.6 DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) applied to S. brasiliensis based on the cal gene*

DNA extraction and purification processes were based on the Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol protocol described by Sambrook et al. [33], with modifications, such as incubation time (overnight) and proteinase K addition (400 ug/mL at the final solution). Species-specific primers were used to amplify the calmodulin (cal) gene, as described by [34]. PCR amplification was carried out at total volume of 25 µL comprising 250 ng of extracted DNA, 12.5 µL of PCR master mix (PROMEGA) and 0.2 µM of each primer. The following cycling parameters were adopted (K960 Thermal Cycler, PCR Gene Mate Series):

initial denaturation at 94 °C, for 15 min; 35 denaturation cycles at 94 °C, for 30 s; annealing at 59 °C, for 90 s; extension at 72 °C, for 1 min; and a final 10-min extension step at 72 °C. PCR products were observed on gel stained with SYBR ® Safe DNA Gel Stain and visualized under UV light, after electrophoresis (60 V, 40 minutes).

### *2.7 Amplified products purification and sequencing*

The amplified product was purified using commercial kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), in compliance with the manufacturer's recommendations. Purified DNA was quantified in NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA). Sequencing was carried out in ABI PRISM 3700 Analyzer sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA), based on the dideoxynucleotide chain termination method [35].

### *2.8 Phylogenetic Analysis*

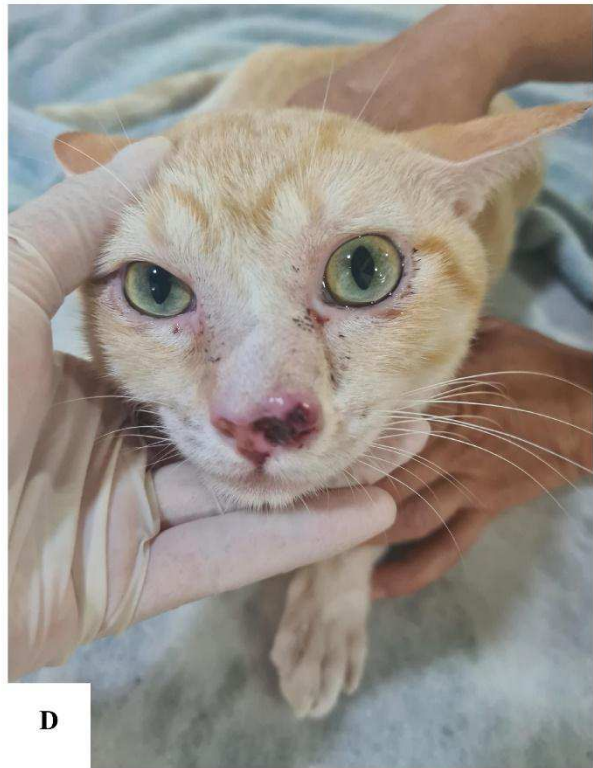
Sequences electropherograms were assessed in FinchTV 1.4 software (Geospiza). The consensus sequence corresponding to forward and reverse DNA strands was generated in CAP3 - Sequence Assembly Program (PRABI-Doua). Then, nucleotide sequences saved in "FASTA" mode were aligned with other homologous sequences of the same sequenced gene, which were taken from the Genbank database. Cal gene sequences were aligned based on using the Clustal/W tool via Bioedit 7.2 [36] and manually adjusted; the adopted alignment size was 460 bp, and the alignment process included gaps. Outgroup sequences deriving from *Histoplasma capsulatum* (U12505.1) were herein used. The phylogenetic tree was built in compliance with the Maximum Likelihood (ML) method, based on using the best Kimura 2-parameter evolutionary model [37]. Clade support used for the analyses was assessed through bootstrap analyses [38] applied to 1,000 repetitions in MEGA10 software [39].

### 3. Results

#### 3.1 Clinical assessment

Fourteen (14) out of 46 (30%) cats presented the localized sporotrichosis, whereas 32 out of 46 (70%) animals presented its disseminated form (Table S1). Lesions found in animals affected by the localized form of this disease were observed on their snout, ear, right thoracic limb, scrotal sac, right pelvic limb and near their caudal abdominal breasts (Figure 1). In total, 26% (12/46) of the assessed cats presented respiratory symptoms, sneezing or nasal secretions. Animals affected by the disseminated cutaneous clinical form of this disease mostly presented lesions distributed on their face, ears, back of the thoracic region, and pelvic and thoracic limbs (Figure 2). The most severe lesions were seen on cats digits and snout.

**Figure 1.** Skin lesions in cat presenting the localized cutaneous clinical form of feline sporotrichosis. **(a)** Feline presenting ulcerated lesion on a palmar pad of the right thoracic limb. **(b)** Ulcerated plaque-like lesions with erythema and crusts near the left ear of a feline diagnosed with sporotrichosis. **(c and d)** Ulcerated lesions on the nasal plane of a feline.



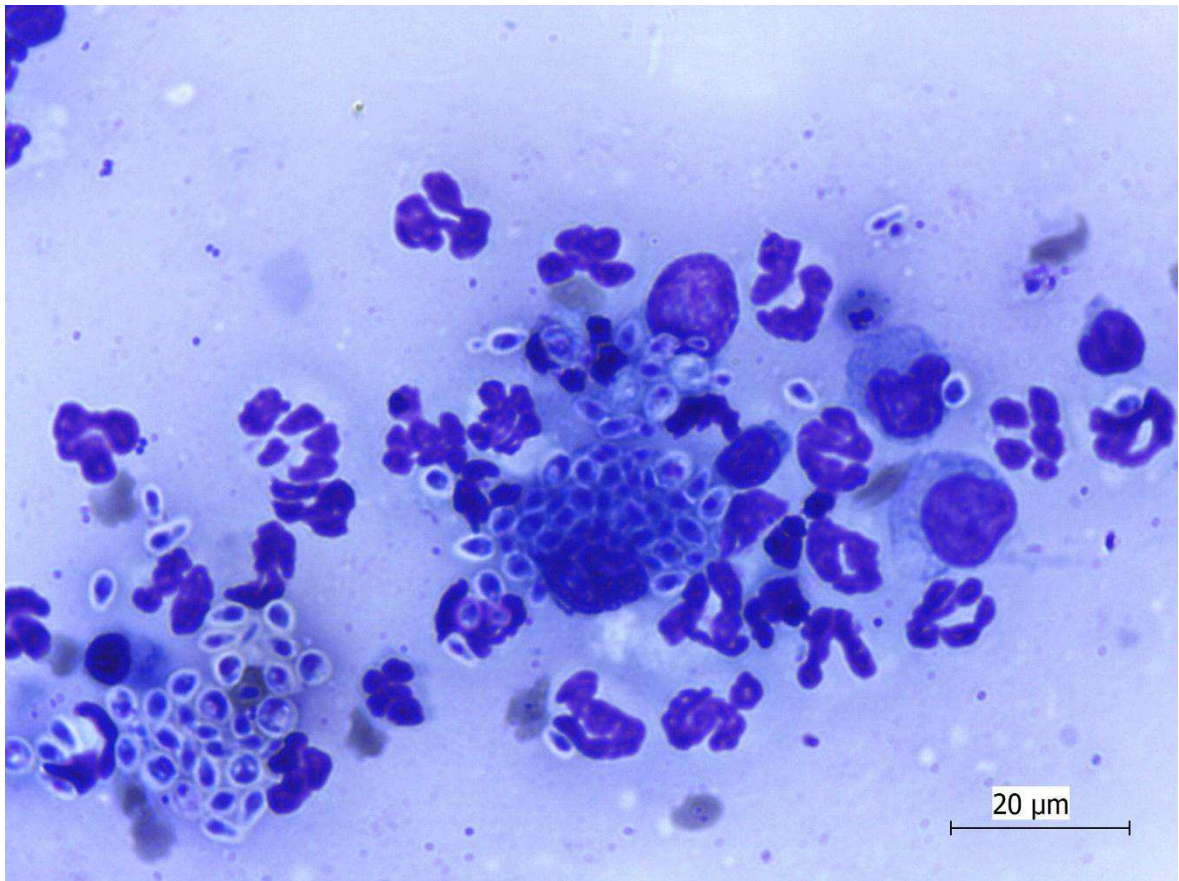
**Figure 2.** Cat affected by the disseminated form of feline sporotrichosis. **(a)** Circular, ulcerated lesion on the back of the pelvic region. **(b)** Multiple ulcerated lesions with gummy appearance on the left thoracic limb. **(c)** Nodular lesion on the snout and small ulcer on the left upper lip. **(d)** Ulcerated lesion on the digit of the right thoracic limb.



### 3.2 Cytology

Microscopic examination has evidenced chronic inflammatory process with prevalent hypersegmented and degenerated macrophages, as well as neutrophils, associated with cigar-shaped yeasts features typical of the *Sporothrix* spp. (Figure 3).

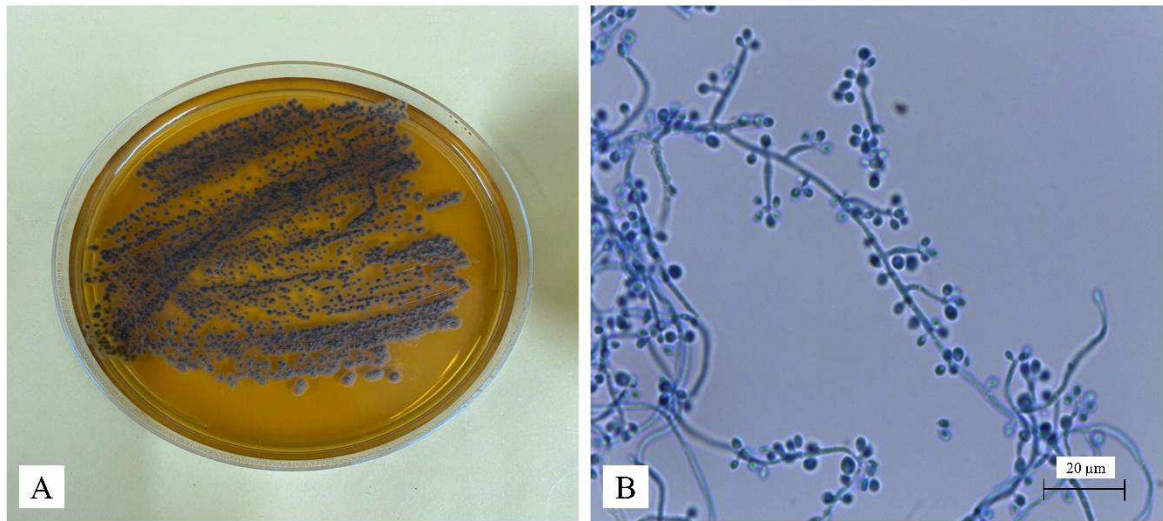
**Figure 3.** Swab from feline lesion showing free and intracytoplasmic yeast forms suggesting *Sporothrix* sp. in macrophages. Rapid panoptic staining. 20µm.



### 3.3 Phenotypic assessment of fungal culture

Colonies color ranged from white to cream after 5-7 days. Colonies presented uneven surface and, later on, their color changed to brownish/blackish (Figure 4). All analyzed samples presented hyaline, septate and branched hyphae, as well as several conidiophores with oval-to-rounded microconidia at their apex, which are organized in daisy bouquet-like arrangement (Figure 4) typical of genus *Sporothrix*.

**Figure 4.** Macro and microscopic analysis applied to *Sporothrix brasiliensis* culture. **(a)** Macromorphology of colonies of a *Sporothrix* spp. isolate. Dark-color colony featuring melanin presence, after 14 days growing on Sabouraud Dextrose Agar added with chloramphenicol, in BOD incubator, at 25 °C. **(b)** Optical microscopy (100x) applied to *Sporothrix* spp. shows hyaline and septate hyphae, as well as conidiophores presenting daisy bouquet-like microconidia at their ends.

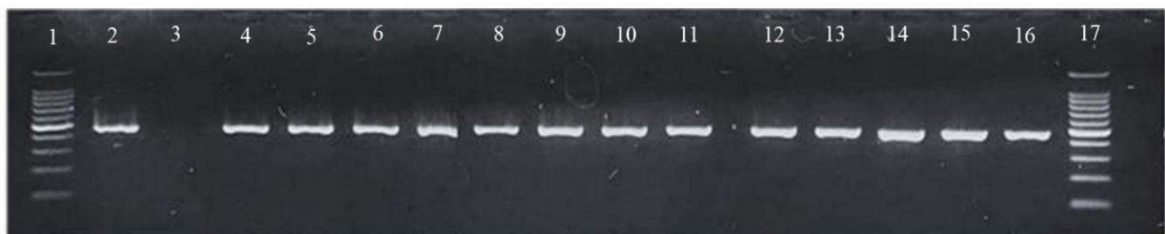


### 3.4 Polymerase chain reaction (PCR) molecular detection of *S. brasiliensis* based on the *cal* gene

All samples presented amplified product of 469 bp for the *cal* gene of *S. brasiliensis*

(Figure 5).

**Figure 5.** Agarose gel electrophoresis (1.5%) of PCR for the *cal* gene of *Sporothrix brasiliensis* from samples collected in cats with sporotrichosis. **1 and 17:** molecular weight, **2:** positive control, **3:** negative control, **4 to 16:** sporotrichosis-positive samples



### 3.5 BLASTn analysis of sequenced products

In total, 15 positive samples deriving from different collection intervals (5 samples from localized clinical cases, and 10 samples from animals presenting the disseminated

cutaneous clinical form of the disease) were selected by considering those presenting the highest DNA concentration for genetic sequencing. Five (5/15) of them were quality sequenced. BLASTn analysis has evidenced isolates genetic identity ranging from 90% to 100% with sequences of *S. brasiliensis* (cal gene) that were previously deposited in the GenBank of isolates collected from different hosts and locations, such as felines, dogs and humans. Isolates location, identity rates, and Query Cover and e-value parameters of the analyzed samples are shown in Table 1. Consequently, only the remaining five samples were used for phylogenetic analysis purposes.

**TABLE 1.** Results of BLASTn analysis applied to *Sporothrix* sequences based on the cal gene.

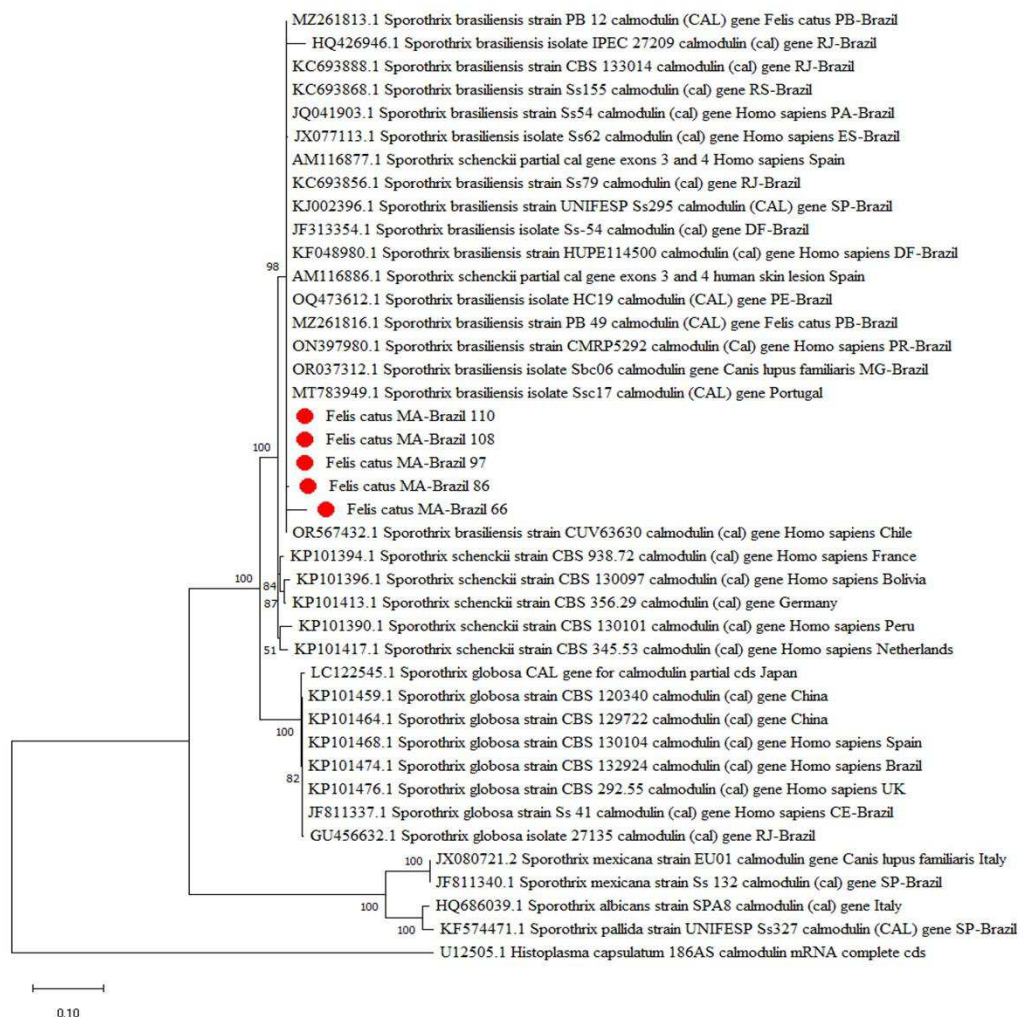
Sample ID	Scientific name	Query Cover	E-value	Identity rate	Local	Host	Access number
<i>Felis catus</i> 66	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	91%	0.0	97.39%	Brazil	<i>Felis catus</i>	MH45393OQ 865519OL953 013
<i>Felis catus</i> 86	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	100%	0.0	98.89%	Brazil	<i>Canis lupus familiaris</i> , <i>Homo sapiens</i> and <i>Felis catus</i>	OR037321ON 397993OL888 138
<i>Felis catus</i> 97	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	99%	0.0	99.54%	Portugal and Brazil	<i>Felis catus</i> and <i>Homo sapiens</i>	MT783949M H453938KJ76 9111
<i>Felis catus</i> 108	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	100%	0.0	98.89%	Portugal and Brazil	<i>Homo sapiens</i> and <i>Felis catus</i>	MT783938OP 811261MH45 3942
<i>Felis catus</i> 110	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	100%	0.0	100.00%	Brazil	<i>Homo sapiens</i> , <i>Canis lupus familiaris</i>	ON398001OR 037312

### 3.6 Phylogenetic analysis applied to *S. brasiliensis* based on the cal gene

In total, 36 homologous sequences were selected and aligned with four consensus sequences obtained in the current research in order to analyze isolates phylogenetic

evolution. DNA sequences deriving from *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. albicans* and *S. pallida* were analyzed. The tree shown in Figure 6 has four clades in its topology, which is formed by *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* and *S. mexicana*; all species recorded high support degree. The five isolates deriving from cats assessed in the current study were grouped in a clade presenting high support degree (*bootstrap* 98%) and sequences deriving from species *S. brasiliensis*, a fact that confirmed their phylogenetic association with this fungal species. The *S. brasiliensis* clade comprises several sequences that were previously detected in *Homo sapiens* (KC693868, JX077113 and KF048980), *Canis lupus familiaris* (OR037312) and *Felis catus* (MZ261816), in Brazil. This clade also presented this microorganism in Portugal (MT783949) and Spain (AM116886 and AM116877).

**Figure 6.** Phylogenetic classification of *Sporothrix brasiliensis* isolated from cats in the Amazon region. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the



bootstrap test (1000 replicates) are shown next to the branches. This analysis involved 28 nucleotide sequences based on the cal gene. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X.

#### 4. Discussion

To the best of to our knowledge, the current study was the first to perform phylogenetic analysis in isolates deriving from São Luis Island (MA), as well as from the entire state, and to confirm *S. brasiliensis* incidence in the analyzed cats. The herein collected samples were grouped to Brazilian sequences deriving from isolates collected in humans, felines and canines from different states, such as Paraíba, Rio de Janeiro, São Paulo, the Federal District, Pará, Pernambuco and Minas Gerais, as well as in countries like Portugal and Spain. *S. brasiliensis* clade is a mixed clade formed by isolates deriving from clinical species that affect both animals and humans [40], and that circulate widely among Brazilian hosts.

*Sporothrix* spp. fungus is found in nature in decaying organic matter, soil and tree bark, occurring frequently in regions with a tropical and subtropical climate [41], similar to that observed in regions of the Amazon biomes that have high humidity, high rainfall and large areas of vegetation, comparable to that observed in the state of Maranhão, which facilitates the development of this species in our region. The herein collected molecular data is used to help clinical, cytological and phenotypic diagnostic techniques, as well as to benefit sporotrichosis treatment. This factor has impact on patients clinical evolution and helps preventing fungal dispersal in both feline and human populations [42, 43].

Sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* leads to severe clinical presentation with abundant fungal cells in lesions, which, in association with cats social behavior, enables the infection outspread to both human and non-human hosts. Disseminated sporotrichosis was the most common clinical manifestation of this disease, more than half of the herein assessed felines, who mainly presented lesions on their face, ears, back of the thoracic region, and pelvic and thoracic limbs. According to Macêdo-Sales et al. [44], lesions on the head and

body extremities, such as ear tips and paws, can happen more often, since these areas are more exposed during fights or come into contact with the soil or plants.

Extracutaneous symptoms, such as lesions in the nasal mucosa, sneezing and dyspnea, were less frequently observed. According to Pereira *et al.* [45], the main extracutaneous signs of sporotrichosis are associated with patients respiratory tract. In addition, they often precede skin lesions or are observed in animals without lesions [46]. Respiratory symptoms can be an important disease transmission route to humans, since they enable fungal outspread due to humans contact with secretions at the time handle sick animals.

Thermal dimorphism, biofilm formation, adhesins and melanin production are the virulence factors previously identified in species *S. brasiliensis* species, which contribute to its more aggressive behavior [47-49]. Progressive culture darkening associated with melanin production was the main feature observed in fungal culture of genus *Sporothrix* specimens. Melanin primary function is to help protecting the fungus from the host, since this pigment can resist reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), besides protecting hosts against UV radiation, as shown in previous studies [50-51].

Although fungal culture and molecular techniques are excellent diagnostic tools, cytological assessment enables the fast, cheap and accessible sporotrichosis diagnosis in cats, mainly in social vulnerability regions, since it enables visualizing a large number of *S. brasiliensis* specimens in smears deriving from skin lesion exudates [15, 52].

Sporotrichosis outspread in the country is associated with different factors, such as lack of active epidemiological surveillance aimed at small animals, lack of national registers for disease notification in both animals and humans, as well as the development of new and more sensitive diagnostic tests to make sick animals notification and treatment easier to help reducing the disease-spreading risk.

## 5. Conclusions

Based on the assessed data, species *S. brasiliensis* accounts for infecting felines living in an Amazon region. The herein assessed felines mostly presented the disseminated cutaneous form of sporotrichosis. Lesions observed in animals presenting the localized cutaneous form of it were limited to their faces. The fungal isolates obtained in this study showed a high degree of support when compared to sequences isolated in other regions of the country, confirming the expansion of the disease. It is necessary developing public policies and providing health education on this disease to guide animal guardians and to mitigate sporotrichosis progression to other regions in the investigated state.

**Funding:** This work was supported by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior do Brazil – CAPES) [Finance Code 001]. Dra. Allana Freitas Barros was doctoral scholarship holder of Foundation to Support Research and Scientific and Technological Development of Maranhão (Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA) [grant number BD-01171/20]. Dr. Fernando Almeida-Souza is a postdoctoral research fellow and scholarship holder of FAPERJ [grant number E-26/203.513/2023]. Dra Ana Lucia Abreu-Silva are researcher productivity fellow of National Scientific and Technological Development Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) [grant number 313348/2019-9].

## References

1. John Willard Rippon *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomyces*; 2nd ed.; Saunders: Londres, 1988; ISBN 0-7216-7586-7.
2. Gondim, A.L. de C.L.; Leite, A.K.A. Aspectos Gerais Da Esporotricose Em Pequenos Animais e Sua Importância Como Zoonose. *Artigo* 2020, 10, 37–44, doi:<https://doi.org/10.18378/rebes.v10i2.7571>.
3. J. Scott Weese; Martha B. Fulford *Fungal Diseases*. In *Companion Animal Zoonoses*; Blackwell Publishing Ltda: Iowa, 2011; pp. 275–298.
4. Lloret, A.; Hartmann, K.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Addie, D.; Belák, S.; Boucraut-Baralon, C.; Egberink, H.; Frymus, T.; Gruffydd-Jones, T.; et al. Sporotrichosis in Cats: ABCD Guidelines on Prevention and Management. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2013, 15, 619–623, doi:[10.1177/1098612X13489225](https://doi.org/10.1177/1098612X13489225).
5. Guarro, J.; Gené, J.; Stchigel, A.M. Developments in Fungal Taxonomy. *Clin Microbiol Rev* 1999, 12, 454–500, doi:[10.1128/CMR.12.3.454](https://doi.org/10.1128/CMR.12.3.454).
6. De Beer, Z.W.; Duong, T.A.; Wingfield, M.J. The Divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma* : Solution to a Problematic Relationship. *Studies in Mycology* 2016, 83, 165–191, doi:[10.1016/j.simyco.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.simyco.2016.07.001).
7. Gremião, I.D.F.; Miranda, L.H.M.; Reis, E.G.; Rodrigues, A.M.; Pereira, S.A. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog* 2017, 13, e1006077, doi:[10.1371/journal.ppat.1006077](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006077).
8. Carlos da Silva Lacaz; Edward Porto; José Eduardo Costa Martins; Elisabeth Maria Heins-Vaccari; Natalina Takahashi de Melo *Esporotricose e outras micoses gomosas*. In *Tratado de Micologia Médica*; Savier: São Paulo, 2002; pp. 479–497 ISBN 85-7378-123-8.

9. Ginn P. E; Mansell J. E. K. L.; Rakich P. M. Sporotrichosis. In Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of domestic of animals; Elsevier Saunders: Philadelphia, 2007; Vol. 2, pp. 703–704.
10. Téllez, M.D.; Batista-Duharte, A.; Portuondo, D.; Quinello, C.; Bonne-Hernández, R.; Carlos, I.Z. *Sporothrix Schenckii* Complex Biology: Environment and Fungal Pathogenicity. *Microbiology* 2014, 160, 2352–2365, doi:10.1099/mic.0.081794-0.
11. Song, Y.; Yao, L.; Zhong, S.; Tian, Y.; Liu, Y.; Li, S. Infant Sporotrichosis in Northeast China: A Report of 15 Cases. *Int J Dermatology* 2011, 50, 522–529, doi:10.1111/j.1365-4632.2010.04724.x.
12. Orofino-Costa, R.; Macedo, P.M.D.; Rodrigues, A.M.; Bernardes-Engemann, A.R. Sporotrichosis: An Update on Epidemiology, Etiopathogenesis, Laboratory and Clinical Therapeutics. *An. Bras. Dermatol.* 2017, 92, 606–620, doi:10.1590/abd1806-4841.2017279.
13. Lopes-Bezerra, L.M.; Mora-Montes, H.M.; Zhang, Y.; Nino-Vega, G.; Rodrigues, A.M.; De Camargo, Z.P.; De Hoog, S. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The Evolution of Knowledge on a Changeable Disease and on Emerging Etiological Agents. *Medical Mycology* 2018, 56, S126–S143, doi:10.1093/mmy/myx103.
14. Almeida, A.J.; Reis, N.F.; Lourenço, C.S.; Costa, N.Q.; Bernardino, M.L.A.; Vieira-da-Motta, O. Esporotricose Em Felinos Domésticos (*Felis Catus Domesticus*) Em Campos Dos Goytacazes, RJ. *Pesq. Vet. Bras.* 2018, 38, 1438–1443, doi:10.1590/1678-5150-pvb-5559.
15. Jessica, N.; Sonia, R.L.; Rodrigo, C.; Isabella, D.F.; Tânia, M.P.; Jeferson, C.; Anna, B.F.; Sandro, A. Diagnostic Accuracy Assessment of Cytopathological Examination of Feline Sporotrichosis. *Med. Myco.* 2015, 53, 880–884, doi:10.1093/mmy/myv038.

16. Rodrigues, A.M.; De Melo Teixeira, M.; De Hoog, G.S.; Schubach, T.M.P.; Pereira, S.A.; Fernandes, G.F.; Bezerra, L.M.L.; Felipe, M.S.; De Camargo, Z.P. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix Brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis* 2013, 7, e2281, doi:10.1371/journal.pntd.0002281.
17. LOPES-BEZERRA, Leila M. et al. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminar structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 3, p. e0006169, 2018, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006169>
18. Alves, A.J.S.E.; Guilloux, A.G.A.; Zetun, C.B.; Polo, G.; Braga, G.B.; Panachão, L.I.; Santos, O.; Dias, R.A. Abandono de Cães Na América Latina: Revisão de Literatura. *Rev. Educ. Cont. Med. Vet. Zootec.* 2013, 11, 34–41, doi:10.36440/recmvz.v11i2.16221.
19. Silva, G.M.; Howes, J.C.F.; Leal, C.A.S.; Mesquita, E.P.; Pedrosa, C.M.; Oliveira, A.A.F.; Silva, L.B.G.; Mota, R.A. Surto de Esporotricose Felina Na Região Metropolitana Do Recife. *Pesq. Vet. Bras.* 2018, 38, 1767–1771, doi:10.1590/1678-5150-pvb-5027.
20. Kilder Dantas Figueira; Geyanna Dolores Lopes Nunes Esporotricose felina: primo relato na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. *MEDVEP. Rev. cient. Med. Vet.* 2010, 8, 715–718.
21. DE OLIVEIRA BENTO, Aurélio et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009693, 2021, doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009693>.
22. Spinelli, T.P.; Bezerra, L.M.; De Souza, B.O.F.; Rocha, A.; Neto, J.E.; Sá, F.B. Primary Conjunctival Sporotrichosis in Three Cats from Northeastern Brazil. *Veterinary Ophthalmology* 2021, 24, 209–215, doi:10.1111/vop.12865.

23. Geyanna Dolores Lopes Nunes; Rosileide dos Santos Carneiro; Kilder Dantas Filgueira; Fabrícia Geovânia Fernandes Filgueira; Thaiza Helena Tavares Fernandes  
ESPOROTRICOSE FELINA NO MUNICÍPIO DE ITAPORANGA, ESTADO DA  
PARAÍBA, BRASIL: RELATO DE UM CASO. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR 2011, 14,  
157–161.
24. Marques-Melo, E.H.; Lessa, D.F.D.S.; Nunes, A.C.B.T.; Chaves, K.P.; Porto,  
W.J.N.; Notomi, M.K.; Garrido, L.H.A. Felino Doméstico Como Agente Transmissor de  
Esporotricose Para Humano: Relato Do Primeiro Caso No Estado de Alagoas. Rev. Baiana  
Saúde Pública 2014, 38, 490–498, doi:10.5327/Z0100-0233-2014380200018.
25. Secretaria de Saúde do Estado do Rio de Janeiro Cenário Epidemiológico:  
Esporotricose No Estado RJ.; 2019;
26. Aguiar, B.A.; Borges, I.L.; Silva, B.W.L.; Rodrigues, F.R.N.; Gonçalves, L.D.; Do  
Rosário Casseb, A.; Da Silva Brito, J.; De Queiroz Pinheiro, A.; Rocha, M.F.G.; De Araújo  
Viana, D. First Case Report of Feline Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis* in  
the State of Ceará – Brazil. Medical Mycology Case Reports 2023, 40, 12–15,  
doi:10.1016/j.mmcr.2023.02.005.
27. Yata Anderson Gonzaga Masullo; José de Ribamar Carvalho do Santos  
GEOPROCESSAMENTO APLICADO A ANÁLISE DO AVANÇO DO PROCESSO DE  
URBANIZAÇÃO E SEUS IMPACTOS AMBIENTAIS NA ILHA DO MARANHÃO.  
Presented at the V Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Belo Horizonte/MG, 2014.
28. SILVA, Fabrício Brito et al. Evidências de mudanças climáticas na região de transição  
Amazônia-Cerrado no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 31, n.  
3, p. 330-336, 2016.

29. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. World Health Organization, p. 1–196, 2020. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>.
- 30, ROCHA, Luana Cristina Sabatinga; RAUBER, Alexandre Luiz. Amazônia legal brasileira: a incidência de focos de calor entre os anos de 2001 e 2020 e a correlação com o desmatamento de corte raso. **Revista Equador**, v. 12, n. 1, p. 199-226, 2023.
31. Silva, J.N.; Miranda, L.H.M.; Menezes, R.C.; Gremião, I.D.F.; Oliveira, R.V.C.; Vieira, S.M.M.; Conceição-Silva, F.; Ferreira, L.; Pereira, S.A. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *Journal of Comparative Pathology* 2018, 160, 72–78, doi:10.1016/j.jcpa.2018.03.002.
32. Marimon, R.; Cano, J.; Gené, J.; Sutton, D.A.; Kawasaki, M.; Guarro, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *J Clin Microbiol* 2007, 45, 3198–3206, doi:10.1128/JCM.00808-07.
33. Joseph Sambrook; E. R. Fritsch; T. Maniatis *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 1989; Vol. 1; ISBN 978-0-87969-309-1.
34. Rodrigues, A.M.; De Hoog, G.S.; De Camargo, Z.P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl Trop Dis* 2015, 9, e0004190, doi:10.1371/journal.pntd.0004190.
35. Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977, 74, 5463–5467, doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
36. Thomas A. Hall *BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT*. *Nucl Acid S No* 1999, 41, 95–98.

37. Kimura, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J Mol Evol* 1980, 16, 111–120, doi:10.1007/BF01731581.
38. Felsenstein, J. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution* 1985, 39, 783, doi:10.2307/2408678.
39. Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software for Microcomputers. *Bioinformatics* 1994, 10, 189–191, doi:10.1093/bioinformatics/10.2.189.
40. Mora-Montes, H.M.; Dantas, A.D.S.; Trujillo-Esquivel, E.; De Souza Baptista, A.R.; Lopes-Bezerra, L.M. Current Progress in the Biology of Members of the *Sporothrix Schenckii* Complex Following the Genomic Era. *FEMS Yeast Research* 2015, 15, fov065, doi:10.1093/femsyr/fov065.
41. HERNÁNDEZ-CASTRO, Rigoberto et al. Epidemiology of clinical sporotrichosis in the Americas in the last ten years. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 6, p. 588, 2022, doi:
42. Arrillaga-Moncrieff, I.; Capilla, J.; Mayayo, E.; Marimon, R.; Marine, M.; Genis, J.; Cano, J.; Guarro, J. Different Virulence Levels of the Species of *Sporothrix* in a Murine Model. *Clinical Microbiology and Infection* 2009, 15, 651–655, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02824.x.
43. Zhang, Y.; Hagen, F.; Stielow, B.; Rodrigues, A.M.; Samerpitak, K.; Zhou, X.; Feng, P.; Yang, L.; Chen, M.; Deng, S.; et al. Phylogeography and Evolutionary Patterns in *Sporothrix* Spanning More than 14 000 Human and Animal Case Reports. *Pers - Int Mycol J* 2015, 35, 1–20, doi:10.3767/003158515X687416.
44. Macêdo-Sales, P.A.D.; Souto, S.R.L.D.S.; Destefani, C.A.; Lucena, R.P.D.; Rocha, E.M.D.S.D.; Baptista, A.R.D.S. 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 2018, 9, doi:10.5123/S2176-62232018000200002.

45. Pereira, S.A.; Gremião, I.D.F.; Menezes, R.C. Sporotrichosis in Animals: Zoonotic Transmission. In Sporotrichosis; Zeppone Carlos, I., Ed.; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 83–102 ISBN 978-3-319-11911-3.

46. Schubach, T.M.P.; Schubach, A.; Okamoto, T.; Barros, M.B.L.; Figueiredo, F.B.; Cuzzi, T.; Fialho-Monteiro, P.C.; Reis, R.S.; Perez, M.A.; Wanke, B. Evaluation of an Epidemic of Sporotrichosis in Cats: 347 Cases (1998–2001). *JAMA* 2004, 224, 1623–1629, doi:10.2460/javma.2004.224.1623.

47. Brilhante, R.S.N.; Fernandes, M.R.; Pereira, V.S.; Costa, A.D.C.; Oliveira, J.S.D.; De Aguiar, L.; Rodrigues, A.M.; De Camargo, Z.P.; Pereira-Neto, W.A.; Sidrim, J.J.C.; et al. Biofilm Formation on Cat Claws by *Sporothrix* Species: An Ex Vivo Model. *Microbial Pathogenesis* 2021, 150, 104670, doi:10.1016/j.micpath.2020.104670.

48. Tamez-Castrellón, A.K.; Romeo, O.; García-Carnero, L.C.; Lozoya-Pérez, N.E.; Mora-Montes, H.M. Virulence Factors in *Sporothrix Schenckii*, One of the Causative Agents of Sporotrichosis. *CPPS* 2020, 21, 295–312, doi:10.2174/1389203720666191007103004.

49. Barros, M.B.D.L.; De Almeida Paes, R.; Schubach, A.O. *Sporothrix Schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev* 2011, 24, 633–654, doi:10.1128/CMR.00007-11.

50. García-Carnero, L.C.; Martínez-Álvarez, J.A. Virulence Factors of *Sporothrix Schenckii*. *JoF* 2022, 8, 318, doi:10.3390/jof8030318.

51. Smith, D.F.Q.; Casadevall, A. The Role of Melanin in Fungal Pathogenesis for Animal Hosts. In *Fungal Physiology and Immunopathogenesis*; Rodrigues, M.L., Ed.;

Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer International Publishing: Cham, 2019; Vol. 422, pp. 1–30 ISBN 978-3-030-30236-8.

52. Gonsales, F.F.; Fernandes, N.C.C.A.; Mansho, W.; Montenegro, H.; Guerra, J.M.; De Araújo, L.J.T.; Da Silva, S.M.P.; Benites, N.R. Feline *Sporothrix* spp. Detection Using Cell Blocks from Brushings and Fine-needle Aspirates: Performance and Comparisons with Culture and Histopathology. *Veterinary Clinical Pathol* 2019, 48, 143–147, doi:10.1111/vcp.12708.

## **CAPÍTULO 4 – Conclusão**

## CONCLUSÃO

- A espécie *S. brasiliensis* é responsável pela infecção de felinos na ilha de São Luís.
- Gatos machos não castrados e com livre acesso à rua representam o principal grupo de risco para aquisição da doença.
- Nos felinos avaliados, observamos predomínio da forma cutânea disseminada, e naqueles que apresentaram a forma cutânea localizada, as lesões ficaram restritas à face.
- É necessário desenvolver políticas públicas e educação em saúde sobre a doença para orientar os tutores e reduzir a progressão da doença para outras regiões do estado.