

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FABIANA DOS SANTOS MONTI

**ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E TERAPÊUTICA DA ESPOROTRICOSE EM
GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus domesticus*) NA REGIÃO METROPOLITANA
DE CURITIBA, PR**

DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACH TO SPOROTRICHOSIS IN
DOMESTIC CATS (*Felis catus domesticus*) IN THE METROPOLITAN REGION OF
CURITIBA, PR

CURITIBA

2019

FABIANA DOS SANTOS MONTI

**ABORDAGEM DIAGNÓSTICA E TERAPÊUTICA DA ESPOROTRICOSE EM
GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus domesticus*) NA REGIÃO METROPOLITANA
DE CURITIBA, PR**

DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC APPROACH TO SPOROTRICHOSIS IN
DOMESTIC CATS (*Felis catus domesticus*) IN THE METROPOLITAN REGION OF
CURITIBA, PR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Doutor em Saúde, Tecnologia e Produção Animal Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Claudia Turra Pimpão

Coorientadora: Profa. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra

CURITIBA

2019

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS	viii
FORMATO DA TESE	xi
RESUMO GERAL	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO 1	14
1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	14
1.1 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA.....	14
1.2 HISTÓRICO.....	14
1.3 ASPECTOS CLÍNICOS.....	15
1.4 DIAGNÓSTICO.....	15
1.5 TRATAMENTO.....	16
1.6 OBJETIVOS	16
CAPÍTULO 2	17
ARTIGO “Desempenho do exame sorológico com antígeno da parede celular do <i>Sporothrix schenckii</i> em gatos (<i>Felis catus domesticus</i>) com esporotricose”	17
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.1 Grupos Experimentais.....	22
2.2 Critérios de Inclusão.....	22
2.3 Avaliação clínica dos animais estudados.....	23
2.4 Estabelecimento do diagnóstico dos animais do Grupo 1.....	23
2.5 Coleta e processamento das amostras para exame sorológico.....	24
2.6 Teste imunoenzimático (ELISA)	25
2.7 Pesquisa de infecções retrovirais.....	25
2.8 Teste de validação.....	25
2.9 Análise estatística.....	25
3. RESULTADOS.....	27
3.1 Aspectos clínicos dos animais do grupo 1.....	28
3.2 Sensibilidade e especificidade do ELISA usando o antígeno SsCBF.....	28

3.3	Análise do ELISA nas apresentações clínicas da esporotricose.....	30
3.4	Análise do ELISA em gatos com esporotricose e coinfeção retroviral.....	31
3.5	Exame citopatológico.....	32
3.6	Concordância entre os testes sorológico, citopatológico e de cultura fúngica.....	32
4.	DISCUSSÃO.....	33
5.	CONCLUSÃO.....	37
	REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 3	43
ARTIGO	“Avaliação de protocolos terapêuticos na esporotricose felina”	43
1.	INTRODUÇÃO.....	44
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
2.1	Critérios de inclusão.....	45
2.2	Critérios de exclusão.....	45
2.3	Avaliação clínica.....	46
2.4	Diagnóstico	46
2.5	Identificação molecular.....	46
2.6	Tratamento.....	47
2.7	Avaliação da resposta terapêutica e dos efeitos colaterais.....	48
2.8	Análise estatística.....	48
3.	RESULTADOS.....	49
3.1	Identificação molecular.....	49
3.2	Monoterapia com ITZ.....	49
3.3	Associação ITZ com KI e terapias coadjuvantes.....	50
4.	DISCUSSÃO.....	53
5.	CONCLUSÕES.....	57
	REFERÊNCIAS.....	57
CAPITULO 4	61
CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	66

Dedicatória

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio e amor incondicional.

Epígrafe

Não sei.....
se a vida é curta
ou longa demais para nós.
Mas sei que nada
do que vivemos
tem sentido, se não tocarmos
o coração das pessoas.

(.....)

É o que faz com que ela
não seja nem curta,
nem longa demais,
mas que seja intensa,
verdadeira e pura...
enquanto durar.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela oportunidade de concluir o doutorado e pelo perfil filantrópico de ensino, que permitiu, com o atendimento gratuito dos gatos com esporotricose, o acesso da população de baixa renda à serviço médico veterinário e orientações a respeito dessa importante zoonose.

Aos meus pais Eduardo Monti (*in memoriam*) e Dilma dos Santos Monti, e minha irmã Monica dos Santos Monti, que sempre apoiaram as minhas decisões e escolhas e me ajudaram a concretizá-las mesmo que, com isso, tivessem que adaptar-se a minha ausência. Vocês são responsáveis por cada uma das minhas conquistas.

A minha orientadora Profa. Dra. Claudia Turra Pimpão, pela oportunidade, orientação e amizade.

A minha coorientadora, Profa. Dra. Leila Maria Lopes Bezerra, pela oportunidade, confiança, ensinamentos, valiosa orientação e pelos momentos agradáveis de convívio durante a condução do experimento na Universidade de São Paulo.

A Drogavet pelo fornecimento gratuito das medicações para tratamento dos gatos enfermos pela doença. Ajuda fundamental que permitiu a continuidade dos projetos, a recuperação de muitos animais e, indiretamente, a redução da transmissão zoonótica.

A Larissa Anuska Zeni Condas, pelo auxílio nas análises, no cuidado com os gatos e pela amizade.

Aos colaboradores da CVE-PUCPR, Sr. Elias Pires, Jéssica Oliveira, Bianca Juliane Batista, Hellen Sauer Moraes, Aline Retlaff e Maria Angélica Pires pela ajuda, disponibilidade e amizade.

A aprimoranda da anestesiologia Andresa Vieira, por estar sempre pronta a ajudar, por sua sensibilidade e empatia com os gatos enfermos e pelos momentos de descontração compartilhados.

Aos meus colegas de doutorado, especialmente às amigas Ana Paula Sarraff e Kung Darh Chi, pelos momentos de convívio, tão agradáveis. Ana Paula, obrigada por sofrer junto comigo nas “lições” de estatística e, Kung, obrigada por compartilhar

do seu conhecimento (muito melhor que o meu) com a língua inglesa e também por dividir as guloseimas durante o trabalho intelectual...

A Ana Paula Mafra, Tatianna Hartin e Cristiane Plahinsce, da Unidade de Vigilância de Zoonoses de Curitiba, pela fundamental parceria na triagem, transporte e agendamento dos casos de esporotricose. Um especial agradecimento à Cristiane, por sua sensibilidade com os pacientes.

Ao Prof. Dr. Carlos Pelleschi Taborda, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, por ter me recebido tão bem em seu laboratório, e aos seus doutorandos, em especial a Aline Santana e Cleison Ledesma Taira, por terem sido tão atenciosos. E, um agradecimento especial ao pós doutorando Leandro Buffoni, por toda a ajuda na condução dos testes de ELISA.

Ao Prof. Dr. Welington Hartmann, coordenador do curso de Medicina Veterinária da Universidade Tuiuti do Paraná, que compreendeu a necessidade das minhas ausências durante o período do doutorado.

Ao Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho, que tanto nos ajudou com a orientação nos casos de transmissão zoonótica.

As minhas queridas amigas Mariana Scheraiber e Jesséa de Fátima França Biz, da Universidade Tuiuti do Paraná, pelos momentos de descontração, que tornaram os meus dias mais agradáveis.

Aos responsáveis pelos animais do meu estudo, que permitiram a sua concretização e aos meus amados pacientes, que tanto sofreram com essa doença.

As queridas amigas Marúcia de Andrade Cruz e Vera Lúcia Cresto França (carinhosamente mais conhecida como “Madrinha”), da Clínica Veterinária Mania de Gato, por sempre nos socorrerem com os gatinhos “sem teto” nos finais de ano, pelas doações de medicamentos e pela valiosa ajuda nas coletas de sangue.

A Equipe da Esporotricose da PUC, composta por alunos voluntários, de iniciação científica, mestrado e doutorado que, por compromisso com o projeto e amor aos animais, se empenharam no cuidado, de domingo a domingo, dos gatos internados. Exemplo de doação e profissionalismo, que permitiu o tratamento e recuperação de tantos pacientes. A vocês, o meu respeito e agradecimento.

Um agradecimento especial a meu marido, Marconi Rodrigues de Farias, pelo companheirismo, paciência e orientação. Obrigada por me proporcionar um tema de doutorado no qual reunisse tantos assuntos que me entusiasмам: gatos,

dermatologia e saúde pública. A você, minha admiração por sua generosidade, sensibilidade e humanidade com que trata seus pacientes e proprietários, e por tornar a PUC referência no tratamento da esporotricose em Curitiba.

FORMATO DA TESE

A presente tese é composta por capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral sobre a esporotricose, a contextualização do tema e os objetivos do estudo.

O capítulo 2 trata-se de um artigo científico completo intitulado: “Desempenho do exame sorológico com antígeno da parede celular do *Sporothrix schenckii* em gatos (*Felis catus domesticus*) com esporotricose”.

O capítulo 3 trata-se de artigo científico completo intitulado: “Avaliação de protocolos terapêuticos na esporotricose felina”.

O capítulo 4 finaliza esta tese, com considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese.

RESUMO GERAL

Esporotricose é uma infecção micótica de implantação, subaguda a crônica, que acomete animais e humanos, causada no Brasil mormente pelo *Sporothrix brasiliensis*. Os gatos domésticos são os animais mais suscetíveis à infecção, geralmente desenvolvendo quadros cutâneos disseminados, com alta carga parasitária e associados a transmissão dermatozoonótica. A presente tese compreende dois estudos. O primeiro avaliou o desempenho de um novo teste imunoenzimático (ELISA), desenvolvido com o antígeno SsCBF isolado e purificado da parede celular do *Sporothrix schenckii*, a partir do soro de 62 gatos com diagnóstico micológico de esporotricose (grupo 1) e de 15 gatos hígidos (grupo controle). O exame resultou em sensibilidade de 80,3%, especificidade de 80%, valor preditivo positivo de 94,2%, valor preditivo negativo de 50% e acurácia de 80,26%, o que demonstrou ser um possível método complementar aos exames citopatológicos e de cultura fúngica no estabelecimento do diagnóstico da esporotricose, independente da sua forma clínica. O segundo estudo teve caráter longitudinal e visou avaliar a efetividade e segurança de múltiplos protocolos terapêuticos utilizados no tratamento da esporotricose em 59 gatos, nos quais 34 utilizaram monoterapia com itraconazol, que resultou na cura de 11 (32%) animais e 1 (3%) foi eutanasiado. Em 22 (65%) destes gatos, somados a outros 25 animais, foi necessária a associação do itraconazol com iodeto de potássio. Destes 47 gatos que foram tratados com itraconazol e iodeto de potássio, a cura foi alcançada em 24 (51%), 7 (15%) evoluíram para óbito e em 14 (29,8%) houve necessidade de instituição de terapia coadjuvante, com a utilização de anfotericina B. Quando a terapia coadjuvante foi associada, 7 (50%) gatos recuperaram-se da doença. Como conclusão, associação terapêutica do itraconazol ao iodeto de potássio foi necessária na maioria dos gatos para se alcançar sucesso terapêutico e, em alguns casos, a terapia coadjuvante foi ainda requerida para melhorar os índices de cura.

Palavras-chave: Micose; ELISA; *Sporothrix* spp; itraconazol; iodeto de potássio; anfotericina B.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an implantation mycosis, subacute to chronic, that affects animals and humans, in Brazil caused by *Sporothrix brasiliensis*. Domestic cats are the most susceptible species, usually evolving to disseminated cutaneous form, with high parasitic burden and associated to dermato-zoonotic transmission. The present thesis is composed by two studies. The first one evaluate the performance of a new immune enzymatic test (ELISA), with ScCBF antigen purified from *Sporothrix schenckii* cell wall using 62 sporotrichotic cats' serum (group 1) and 15 healthy cats' serum (control group). The test achieved 80.3% sensitivity, 80% specificity, 94.2% positive predictive value, 50% negative predictive value, and 80.26% accuracy, proving be a reliable diagnose tool complementary to cytopathology exam and mycological culture. The second study is a longitudinal survey over therapy efficacy and multiple security protocols used in 59 cats, in which 34 used itraconazole (ITZ) monotherapy and 25 itraconazole associated to potassium iodide (KI). Among 34 ITZ monotherapy, 11 (32%) cats were cured, 1(3%) euthanized and 22 (65%) converted to ITZ+KI associated therapy protocol. In the end, the 47 cats under associated therapy protocol, 21 (51%) cats were cured, 7 (15%) deceased and 14 (29,8%) undergone alternative therapy such as amphotericin B, resulting in 7 (50%) cured cases. Concluding, ITZ+KI association therapy was necessary in the majority of the cases to reach therapeutic success, and in some cases alternative therapy was required to improve cure rates.

Keywords: Mycosis; ELISA; *Sporothrix* spp; itraconazole; potassium iodide; amphotericin.

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO E ETIOLOGIA

A esporotricose é a micose de implantação mais prevalente no mundo, com caráter crônico e que acomete animais e humanos (Queiroz-Telles et al. 2017). Até a década passada considerava-se que a esporotricose era causada por uma única espécie de fungo do gênero *Sporothrix* spp. No entanto, estudos moleculares demonstraram que *Sporothrix schenckii* sensu lato trata-se de um complexo de espécies crípticas, com diferentes distribuições geográficas: *S. schenckii* sensu stricto, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. brasiliensis*. (Schubach, et al., 2012; Queiroz-Telles et al. 2017).

S. schenckii sensu lato tem distribuição mundial e é encontrado em solo e material vegetal, musgo, madeira, espinhos de roseiras, bambus, ocos de árvores, dentre outros. Classicamente, as infecções humanas decorrem via inoculação transcutânea de material vegetal contaminados (Lloret et al., 2013; Queiroz-Telles et al. 2017). No Brasil, no entanto, *S. brasiliensis* é o principal agente etiológico da esporotricose e o gato doméstico (*Felis catus domesticus*) a espécie mais vulnerável à infecção por este agente (Lloret et al., 2013; Queiroz-Telles et al. 2017; Rodrigues et al. 2016).

1.2. HISTÓRICO

Historicamente, a doença ocorre sob a forma de surtos epidêmicos como o ocorrido na África do Sul, no período de 1941 a 1944, em que cerca de 3000 mineradores de ouro foram infectados pelo fungo contidos em farpas das vigas de madeiras das minas (Helm e Bermann, 1947). Surtos semelhantes foram observados nos Estados Unidos (Dooley et al., 1997) e na região do Sudoeste da Austrália (Feeney et al., 2007).

Relatos de transmissão zoonótica foram inicialmente descritos no Uruguai, onde, em torno de 61% dos casos de esporotricose humana foram devido a arranhaduras produzidas por tatu (*Dasypus novemcinctus*) (Conti Diaz, 1981).

Lutz e Splendore (1907) relataram a infecção natural da doença em ratos e descreveram o primeiro caso de esporotricose acometendo seres humanos no Brasil. A partir da segunda metade da década de 1990, inúmeros casos de esporotricose foram descritos, principalmente nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul (Lopes et al., 1999; Silva et al., 2012).

O Brasil é o país com o maior número de casos de esporotricose felina e humana (Madrid et al., 2010; Montenegro et al., 2014; Gremião et al., 2017; Miranda et al., 2018) e a transmissão zoonótica da doença está relacionada ao acidente traumático ou contato com exsudato de gatos infectados (Chakrabarti et al., 2015; Gremião et al., 2017).

No Rio de Janeiro, foram diagnosticados na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), desde 1997, 4.188 casos humanos até 2011 e 4703 casos em gatos até 2015. Apesar do expressivo número de casos, esses dados podem não refletir a realidade, uma vez que foram registrados apenas por essa instituição. A doença tem se disseminado para outros estados do país, desde então (Gremião et al., 2017).

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Os gatos geralmente desenvolvem quadros clínicos cutâneo disseminados, de aspecto ulceroso e com alta carga parasitária (Gremião et al., 2015; Macêdo-Sales *et al.*, 2018; Miranda et al., 2018; Souza et al., 2018), associado ao acometimento do trato respiratório, caracterizado por dispneia inspiratória, estrídulos, espirros e secreção óculo-nasal, com possibilidade de disseminação sistêmica da doença (Farias, 2004; Schubach et al., 2004). Lesões cutâneas em apenas uma localização anatômica também podem ocorrer (Souza et al., 2018).

1.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico presuntivo da esporotricose é realizado após anamnese, avaliação do perfil epidemiológico do animal acometido, exame clínico dermatológico e sistêmico; e confirmado pela associação de exames laboratoriais. O método padrão de referência para o diagnóstico da doença é o isolamento do fungo em meio de cultura específico, entretanto, nos gatos,

os exames citopatológico e histopatológico são muito úteis e já permitem tratamento em caso de resultado positivo (Silva et al., 2012; Pereira et al., 2011).

Algumas formas clínicas da esporotricose em gatos, no entanto, como as lesões cutâneas isoladas, podem apresentar menor carga fúngica (Miranda et al., 2018) e conduzir a resultados negativos nos exames convencionais.

1.5 TRATAMENTO

O itraconazol (ITZ) é o fármaco mais utilizado no tratamento da esporotricose felina e humana (Pereira et al., 2010). O fármaco inibe a 14 α -desmetilase, uma enzima dependente do citocromo P450, responsável pela desmetilação do lanosterol em ergosterol, que é o principal esterol das células fúngicas, o que resulta na sua depleção e ruptura da membrana celular do fungo (Giguère, 2013).

Em gatos com esporotricose a resposta ao itraconazol apresenta índices de cura variáveis (Pereira et al., 2010; Souza et al., 2018), sendo, algumas vezes, necessária a conjunção de outros fármacos, como o iodeto de potássio (Reis et al., 2016), ou a aplicação intralesional de anfotericina B (Gremião et al., 2011), para alcançar melhor resposta terapêutica.

1.6 OBJETIVOS

A avaliação de um novo método sorológico para o diagnóstico da esporotricose e de protocolos terapêuticos para o seu controle, foram os objetivos desenvolvidos nos dois artigos desta tese.

CAPITULO 2

“Desempenho do exame sorológico com antígeno da parede celular do *Sporothrix schenckii* em gatos (*Felis catus domesticus*) com esporotricose”

Fabiana dos Santos Monti^a, Suelen Sicuro Ribeiro^a, Luana Beatriz Ballardin^a, Kung Darh Chi^a, Larissa Anuska Zeni Condas^b, Leandro Buffoni Roque da Silva^c, Claudia Turra Pimpão^a, Marconi Rodrigues de Farias^a, Leila Maria Lopes-Bezerra^{d,*}

^a Veterinary Clinic School, Veterinary Medicine, School of Life Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil,

^b Freelance veterinarian,

^c Institute of Biomedical Sciences (ICB), São Paulo University

^d Centro de Inovação, Empreendedorismo e Tecnologia (CIETEC), São Paulo University.

*Corresponding author.

E-mail address: bidiagnostics@cietec.org.br

Resumo

A esporotricose é uma micose de implantação, que acomete animais e humanos, sendo o gato doméstico a espécie mais suscetível. No Brasil, a transmissão está relacionada, principalmente, com o acidente traumático com gatos infectados ou pelo contato com o exsudato das lesões cutâneas. O Brasil é o país que descreve o maior número de casos no mundo. O método padrão de referência para diagnóstico da enfermidade consiste na identificação do agente, por meio do cultivo micológico, entretanto, o desenvolvimento de um método sorológico, com resultado mais rápido e boa acurácia é importante para o início mais breve da terapia e de orientações que possam mitigar a transmissão de *Sporothrix* spp. Além disso, lesões cutâneas com baixa carga fúngica e naquelas as quais é difícil a obtenção de amostra para exames micológicos, podem limitar o diagnóstico. No presente estudo foi avaliado um teste imunoenzimático (ELISA) com o antígeno

SsCBF, isolado da parede celular do *Sporothrix schenckii*, em gatos diagnosticados com diferentes apresentações clínicas da esporotricose. Foram coletadas 62 amostras de soro provenientes de animais com diagnóstico micológico da doença. Os resultados demonstraram sensibilidade de 80,3%, especificidade de 80% e a análise da curva ROC revelou uma área sob a curva (AUC) de 0,802. O exame demonstrou-se acurado nas diferentes apresentações clínicas e pode ser aplicado ao diagnóstico da esporotricose em gatos.

Palavras-chave: ELISA; antígeno SsCBF; sorodiagnóstico, *Sporothrix* spp., micose, curva ROC.

Abstract

Sporotrichosis is a mycosis of implantation that affects animals and humans, as the domestic cat the most susceptible species. In Brazil, the transmission is mainly related to accidental trauma by sick cats or by direct contact to cutaneous lesions exudate. Brazil has the highest number cases in the world. Mycological culture remains the golden standard diagnostic tool, although for early diagnosis, a serological method with good accuracy is important, allowing therapy establishment and mitigating guidelines for transmission. Also, cutaneous lesions with low fungal load and in those in which it is difficult to obtain a sample for mycological exams, may limit the diagnosis. In the present study, an immune enzymatic test (ELISA) with SsCBF antigen from feline-derived *Sporothrix schenckii* cell wall was evaluated. Sixty-eight serum samples from sporotrichotic cats were collected for the test. The results showed 80.3% sensitivity and 80% specificity, and the ROC curve analysis unveil a 0.802 area under the curve (AUC). The test

proves to be accurate and applicable to diagnose feline sporotrichosis in the different clinical presentations.

Keywords: ELISA; SsCBF antigen; serodiagnosis, *Sporothrix* spp., mycoses; ROC curve.

1. Introdução

A esporotricose é uma micose de implantação, de caráter subaguda a crônica, que acomete animais e humanos. No Brasil, *Sporothrix brasiliensis* é o principal agente etiológico da esporotricose e o gato doméstico (*Felis catus domesticus*) a espécie mais vulnerável à infecção por este agente (Lloret et al., 2013; Queiroz-Telles et al. 2017; Rodrigues et al. 2016). Os gatos geralmente desenvolvem quadros clínicos cutâneo disseminados, de aspecto ulceroso e com alta carga parasitária (Lloret et al., 2013; Gremião et al., 2015; Macêdo-Sales et al., 2018; Souza et al., 2018), associado ao acometimento do trato respiratório, caracterizado por dispneia inspiratória, estrímulos, espirros e secreção óculo-nasal, com possibilidade de disseminação sistêmica da doença (Farias, 2004; Schubach et al., 2004).

No Brasil, geralmente, a transmissão de *Sporothrix* spp. está relacionada ao acidente traumático ou contato com exsudato de gatos infectados (Chakrabarti et al., 2015; Gremião et al., 2017), sendo este país o que possui o maior número de casos publicados de esporotricose felina e humana (Madrid et al., 2010; Montenegro et al., 2014; Miranda et al., 2018a), mormente no Rio de Janeiro, onde foram diagnosticados somente pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), desde 1997, 4.188 casos humanos até 2011 e 4703 casos em gatos até 2015 (Gremião et al., 2017).

O diagnóstico da esporotricose felina é presumido após avaliação do perfil epidemiológico do animal acometido, exame clínico e subsidiado por uma associação de exames laboratoriais.

O exame padrão de referência para o diagnóstico da esporotricose é a cultura fúngica (Lloret et al. 2013), porém seu resultado requer, no mínimo, sete dias (Lopes-Bezerra et al., 2018a) e pode resultar negativo, principalmente em quadros cutâneos fixos ou respiratórios, além de poder haver contaminação.

O exame citopatológico no diagnóstico da esporotricose felina apresenta boa sensibilidade entre 78,9% a 87% (Pereira et al., 2011; Silva et al., 2015; Silva et al., 2018), no entanto, leveduras do *Sporothrix* spp. podem ser confundidas com outras espécies de fungos (Silva et al., 2015) e este pode ser negativo quando as infecções apresentam menor carga fúngica. Já o exame dermatohistopatológico apresenta sensibilidade de aproximadamente 91,3% (Silva et al., 2018), tem a vantagem de esclarecer outros diagnósticos diferenciais porém, para sua execução, é necessário submeter o gato a anestesia geral, o que dificulta sua prática ambulatorial cotidiana.

Considerando o exposto, há necessidade de desenvolver novos testes diagnósticos, que sejam práticos e rápidos, sensíveis e específicos, tenham aplicabilidade ambulatorial, bom custo-benefício e permitam o diagnóstico precoce e estabelecimento de protocolos terapêuticos que controlem a doença e reduzam o risco de transmissão.

Desde a década de 1970, testes sorológicos têm sido propostos para a complementação do diagnóstico da esporotricose humana (Blumer et al., 1973; Almeida-Paes et al., 2007; Bernardes-Engemann et al., 2015) e em um estudo prospectivo, o teste de ELISA apresentou sensibilidade e especificidade de 89% e 82%, respectivamente (Bernardes-Engemann et al., 2015).

O peptídeo-ramnomannana é um glicoconjugado da parede celular da fase leveduriforme de *S. schenckii*, composto por 33,5% de ramnose, 57% de manose e um conteúdo protéico em cerca de 10-20% (Lopes-Bezerra, 2011). Esse glicopeptídeo pode ser separado em duas frações, dependendo da sua afinidade com a lectina concanavalina-A (Con-A). A fração ligada à Con-A (SsCBF) é relevante para o diagnóstico sorológico em gatos com esporotricose (Fernandes et al., 2011).

Fernandes e colaboradores (2011), utilizaram o antígeno SsCBF purificado de *Sporothrix schenckii* e um exoantígeno em testes de ELISA para o diagnóstico de esporotricose em gatos domésticos, obtendo 90% de sensibilidade e 96% de especificidade. Excelentes resultados também foram alcançados com um outro tipo de antígeno, extratos brutos de células de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Rodrigues et al., 2015), o que denota que a técnica de ELISA pode ajudar na conclusão do diagnóstico da esporotricose em gatos.

Antígenos proteicos também vem sendo estudados como marcadores de diagnóstico (Alba-Fierro et al., 2014). Recentemente, Martinez-Alvarez e colaboradores (2019), testaram uma glicoproteína recombinante de parede celular de *S. schenckii*, a Gp70, em teste de ELISA para pacientes humanos

com esporotricose, no entanto, não alcançaram sensibilidade e especificidade tão boas no diagnóstico, quanto as relatadas para o antígeno SsCBF.

O objetivo deste estudo foi avaliar a especificidade, a sensibilidade, os valores preditivos e a acurácia do teste imunoenzimático (ELISA) utilizando o antígeno SsCBF de *S. schenckii* no diagnóstico da esporotricose em gatos domésticos, com diferentes apresentações clínicas.

2. Material e Métodos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais em Pesquisa da PUCPR, sob o protocolo número 01219. Foi realizado um estudo transversal, aleatorizado, controlado e com amostras sistematizadas.

2.1 Grupos Experimentais

Para realização do presente estudo foram estabelecidos dois grupos experimentais. O grupo 1 (grupo teste) foi composto por 62 gatos com diagnóstico definitivo de esporotricose e o Grupo 2 (grupo controle), composto por 15 gatos hígidos. Os animais de ambos os grupos foram incluídos independente de raça, sexo, estado reprodutivo ou faixa etária. Os animais do grupo 1 foram provenientes do atendimento clínico da Clínica Veterinária Escola (CVE) da PUCPR e, do grupo 2, de uma Clínica Veterinária de Medicina Felina de Curitiba-PR, Brasil.

2.2 Critérios de inclusão

Os critérios estabelecidos para inclusão dos animais no grupo 1 foram: gatos com diagnóstico presumido de esporotricose pela visualização de leveduras nos exames citopatológico e/ou histopatológico, e subsidiado pelo isolamento e a identificação microbiológica de *Sporothrix* spp. em meio de

cultura específico, e que não tivessem sido tratados previamente com antifúngicos.

Os gatos incluídos no grupo 2 (controle), deveriam ser hígidos, sem histórico progresso de esporotricose ou qualquer doença dermatológica ou sistêmica e serem integralmente domiciliados. Em todos os grupos, os responsáveis deveriam anuir com a participação do animal no estudo, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido.

2.3 Avaliação clínica dos animais estudados

Os gatos do grupo 1 foram submetidos a exame clínico e suas lesões cutâneas classificadas em cutânea fixa, quando a lesão era única, geralmente restrita ao ponto de inoculação fúngica e independente da topografia lesional; linfocutânea, quando havia linfangite e lesões cutâneas contíguas ao trajeto linfático, associada à linfadenite regional e cutâneo disseminada, em animais com lesões ulcerosas ou úlcero-gomosas multifocais ou generalizadas. Lesões extracutâneas foram também registradas a partir do exame das vias aéreas superiores, onde se buscou observar a presença de nódulos ou pólipos intranasais, estrídulos respiratórios ou espirros; pela avaliação oftálmica para a identificação de granulomas conjuntivais ou envolvimento de outras mucosas.

2.4 Estabelecimento do diagnóstico dos animais do Grupo 1

Após o exame clínico, de todos os gatos foi realizada coleta para exame citopatológico das lesões cutâneas, a partir do exsudato obtido, por *imprint* em lâmina de vidro, ou por biópsia aspirativa com agulha fina, os quais eram imediatamente corados com corante hematológico rápido (Panóptico® - Laborclin).

Quando necessário, o animal era anestesiado com protocolo, por via intramuscular de metadona (0,3mg/kg), cetamina (3mg/kg), midazolam (0,15mg/kg) e dexmedetomidina (8mcg/kg), para realização de biópsia de pele, com *punch* de 5mm, sendo as amostras fixadas em formalina tamponada a 10%, emblocadas em parafina, cortadas em micrótomos (4-5 μ m) e coradas em hematoxilina-eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS).

Foram considerados positivos os exames citopatológicos que apresentaram leveduras pleomórficas e corpo celular basofílico, envoltos por um halo claro, ou exames dermatohistopatológicos que evidenciaram leveduras fúngicas margeadas por uma rima vermelha (Farias et al., 2004; Pereira et al., 2011).

Para conclusão do diagnóstico, exsudatos das lesões tegumentares coletados com swab estéril eram semeados em ágar Mycosel ou Sabouraud com cloranfenicol, incubados a 25°C, com observações diárias a partir do 5º dia e, após o crescimento fúngico, este era avaliado em microscopia, onde se observava a morfologia hifóide característica de *Sporothrix* spp., por meio da técnica de coloração com lactofenol.

2.5 Coleta e processamento das amostras para exame sorológico

Amostras sanguíneas de todos os animais participantes do estudo foram coletadas por venopunção jugular, após contenção física, centrifugadas e o soro separado em três alíquotas de 300 μ L, congelados a -20°C, para posterior avaliação sorológica por ELISA.

2.6 Teste imunoenzimático (ELISA)

O teste imunoenzimático (ELISA) foi realizado utilizando-se o antígeno SsCBF, gentilmente disponibilizado pela empresa BIDIAGNOSTICS (São Paulo, Brasil). Resumidamente, placas de ELISA foram sensibilizadas com o antígeno SsCBF, sendo posteriormente bloqueadas e incubadas com soro dos gatos em diluição seriada de 1:2, a partir da diluição de 1:400. Após esta etapa, as placas foram então incubadas com anti-IgG felina conjugada à peroxidase (Sigma Aldrich) e revelada com o substrato OPD FAST (Sigma Aldrich), sendo a densidade óptica de leitura determinada no leitor de ELISA de 490 nm. Algumas modificações de protocolo foram realizadas em função de proteção, devido processo de propriedade intelectual.

2.7 Pesquisa de infecções retrovirais

No soro dos 62 animais do grupo 1 foi realizada pesquisa de antígeno do vírus da leucemia felina (FeLV) e de anticorpos do vírus da imunodeficiência felina (FIV), com teste SNAP® Combo FeLV Ag/FIV Ac, (Laboratório Idexx, São Paulo, Brasil).

2.8 Teste de validação

O preparo das amostras e o teste de ELISA foi realizado por dois pesquisadores diferentes, para confirmação dos resultados.

2.9 Análise estatística

Os dados paramétricos demográficos e clínicos dos animais participantes do estudo foram apresentados descritivamente em percentual, média e desvio padrão, ou em mediana, para variáveis não paramétricas.

Os dados provenientes da sorologia foram avaliados usando-se o teste de Shapiro-Wilk para normalidade (Shapiro & Wilk, 1965), apresentando-se os resultados por meio da mediana, com visualização gráfica *dotplot* ou *boxplot* (Moore et al., 2012). A comparação entre os valores de D.O. obtidos entre grupos de gatos controle e gatos com esporotricose foi realizado pelo teste de Mann-Whitney, com nível de rejeição da hipótese nula fixado em 5% (Moore et al., 2012). O mesmo teste fora aplicado na comparação entre dados sorológicos de animais com diferentes classificações clínicas e na presença de coinfeção viral.

As medidas de desempenho diagnóstico (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, razão de probabilidade positiva, negativa e acurácia) da sorologia foram calculadas em relação a cultura fúngica (teste padrão de referência), diretamente dos dados populacionais obtidos (abordagem em um estágio), por meio de tabelas 2x2, com distribuição binomial determinando os intervalos de confiança a 95% (Dohoo et al., 2010).

A análise da curva ROC (receiver operating characteristic) foi realizada para observar as mudanças nos valores de sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) contra 1-especificidade (taxa de falso-positivos) nos diferentes valores de sorologia encontrados para distinguir animais saudáveis e doentes. A posição da curva em seu ponto mais alto a esquerda determina o melhor ponto de corte da sorologia no diagnóstico da esporotricose em gatos, na qual a sensibilidade e a especificidade melhor se aproximam e, portanto, onde há maior discriminação entre doentes e não doentes (Dohoo et al., 2010). O desempenho da sorologia foi estabelecido por meio do

cálculo da área sob a curva, assumindo as categorias como: acurácia perfeita (AUC=1), acurácia alta ($0,9 < \text{AUC} \leq 1$), acurácia moderada ($0,7 < \text{AUC-ROC} \leq 0,9$) e baixa acurácia ($0,5 < \text{AUC-ROC} \leq 0,7$) (Swets et al., 1988).

Para o cálculo da concordância entre os testes diagnósticos foi realizada a análise Kappa, conforme descrito por Fleiss (1981). A interpretação do valor de Kappa foi feita baseada nos critérios de Landis e Koch (1977), descritos conforme a Tabela 1:

Tabela 1. Interpretação do valor de Kappa baseado nos critérios de Landis & Koch (1977).

Valores de Kappa	Interpretação
<0	não há concordância
0-0,19	pobre
0,20-0,39	justa
0,40-0,49	moderada
0,60-0,79	substantial
0,80-1,00	quase perfeita

3. Resultados

Os dados epidemiológicos dos animais dos grupos 1 e 2, estão representados na Tabela 2:

Tabela 2- Perfil epidemiológico da população dos gatos com e sem esporotricose que participaram da avaliação sorológica, pertencentes aos grupos 1 e 2, respectivamente.

	GRUPO 1 (N=62)	GRUPO 2 (N=15)
Idade (meses)	36,3 ± 31,6	86 ± 57,3
	Raça	
SRD	61 (98,4%)	14 (93,3%)
Persa	1 (1,6%)	-
Maine Coon	-	1 (6,7%)
	Estado reprodutivo	
Não castrados	34 (55%)	0
Castrados	25 (40%)	15 (100%)
Não Informado	3 (5%)	-
	Habitat	
Domiciliados	13 (21%)	15 (100%)
Semidomiciliados	37 (59,7%)	-

Querenciados	9 (14,5%)	-
Não Informado	3 (4,8%)	-
Sexo		
Machos	42 (68%)	9 (60%)
Fêmeas	20 (32%)	6 (40%)

3.1 Aspectos clínicos dos animais do grupo 1

Dos 62 animais diagnosticados com esporotricose e incluídos no grupo 1 (teste), 48 (77,4%) apresentaram quadro cutâneo disseminado e 14 (22,6%), cutâneo fixo. Sinais respiratórios foram identificados em 17 (35,4%) dos 48 pacientes com lesões cutâneas disseminadas e em 5 (35,7%) dos 14 animais com lesões cutâneas fixas. Dois animais apresentaram quadro oftálmico (granulomas conjuntivais) concomitante ao respiratório e cutâneo disseminado.

3.2 Sensibilidade e especificidade do teste de ELISA usando o antígeno SsCBF

Os soros dos gatos saudáveis (grupo 2) resultaram em absorbâncias entre 0,03 a 1,31. A média da absorbância desses soros, com uma vez o desvio padrão, foi de 1,05, valor o qual foi utilizado como ponto de corte, que discriminou entre os animais positivos e negativos para esporotricose.

Em relação aos gatos com esporotricose (grupo 1), 49/62 (79,03%) foram positivos, com absorbância superior ao ponto de corte (D.O. > 1,05), média de D.O. de $1,626 \pm 0,647$ e mediana de 1,78 (Figuras 1 e 2). Os soros dos gatos saudáveis (grupo 2) demonstraram média de D.O. de $0,62 \pm 0,436$ e mediana de 0,65 (Figura 1). A média dos valores sorológicos obtida do

grupo 1 foi significativamente superior à média obtida dos gatos do grupo 2 ($p=0,01$).

Figura 1- Densidade óptica obtidas do soro de gatos com esporotricose confirmada (Grupo 1) e de gatos saudáveis (Grupo 2), na detecção de anticorpos IgG contra antígeno SsCBF do *Sporothrix schenckii*.

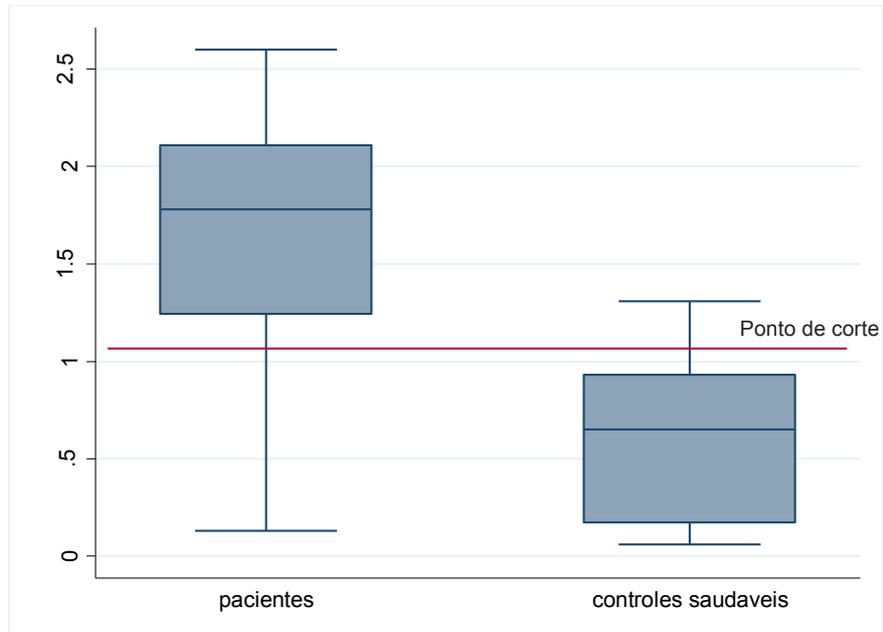
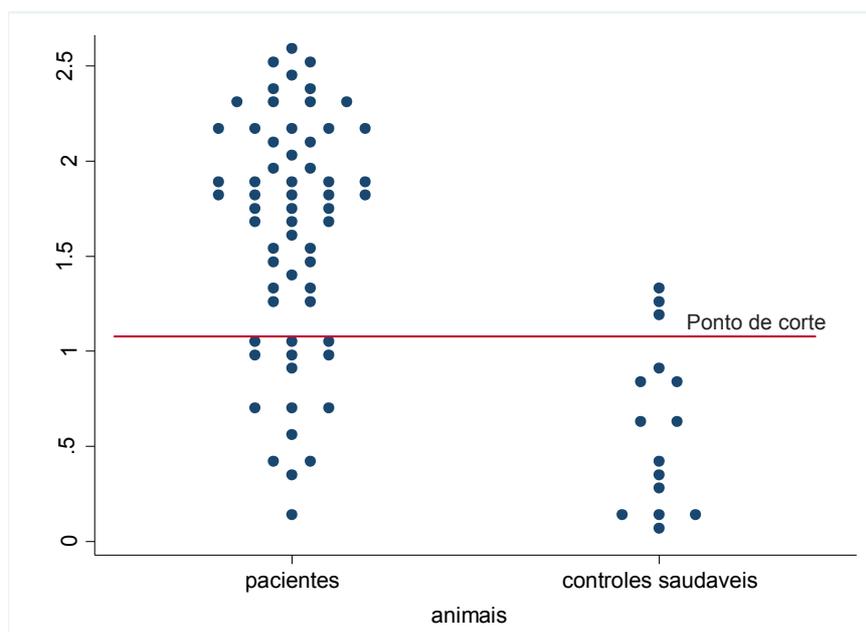
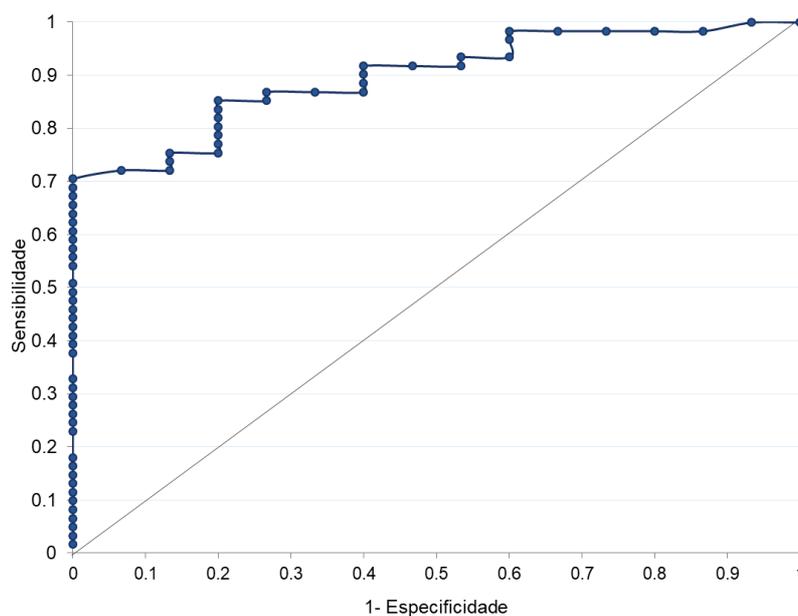


Figura 2- Dot plot de D.O obtidas do soro de gatos com esporotricose confirmada (Grupo 1) e de gatos saudáveis (Grupo 2), na detecção de anticorpos IgG contra antígeno SsCBF do *Sporothrix schenckii*.



Considerando os valores expostos, o ELISA apresentou sensibilidade de 80,3% (95% IC: 68,2-89,4%), especificidade de 80% (95% IC: 51,9-95,7%), determinado pelo ponto de corte na curva ROC, na sua extremidade superior à esquerda (Figura 3). O valor preditivo positivo foi 94,2% (95% IC: 84,1-98,8%) e valor preditivo negativo 50% (95% IC: 29,1-70,9%). A área sob a curva (AUC) foi de 0,802 (95% IC: 0,685-0,918) (Figura 3), classificada como acurácia moderada em relação a cultura fúngica.

Figura 3- Curva ROC para densidades ópticas de gatos com esporotricose confirmada usadas para detectar anticorpos IgG contra o antígeno SsCBF do *Sporothrix schenckii*. No eixo y observa-se a taxa de resultados verdadeiro-positivos, e no eixo x a taxa de falso-positivos (1- especificidade).

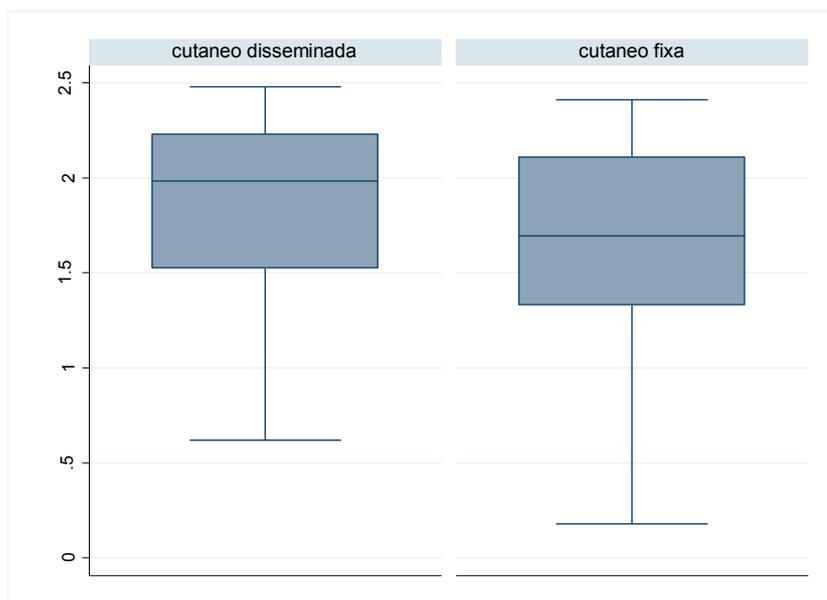


3.3 Análise do ELISA nas apresentações clínicas da esporotricose

Dos 62 animais pertencentes ao grupo 1, 48 (77,4%) apresentavam quadro cutâneo disseminado. A média de D.O. do ELISA desses animais foi de $1,84 \pm 0,52$. Os 14 (22,6%) animais restantes do grupo 1 manifestaram

quadro cutâneo fixo, com média de D.O. $1,59 \pm 0,70$. Nenhuma diferença significativa foi observada na comparação entre as médias de D.O. do ELISA das diferentes apresentações clínicas dos animais do grupo 1 (Figura 4).

Figura 4. Diferença entre as médias de densidade óptica obtidas a partir do soro de gatos com esporotricose com diferentes apresentações clínicas.



3.4 Análise do ELISA em gatos com esporotricose e coinfeção retroviral

Dos 62 animais com diagnóstico de esporotricose, 51 (82,2%) eram soronegativos para retrovíruses, com média de D.O. do teste de ELISA para esporotricose de 1,77 e desvio padrão 0,60. Dos 11 animais restantes, 8 (12,9%) eram soropositivos para infecção pelo FeLV e, 3 (4,9%), para o FIV, com média de D.O. do teste de ELISA de 1,89 e desvio padrão de 0,38. Nenhuma diferença significativa nos valores de D.O. entre os animais com esporotricose e coinfectados ou não por FIV e/ou FeLV foi observada ($p=0,77$) (Tabela 3).

Tabela 3- Média, desvio padrão, mediana e intervalo de confiança a 95% (95% IC), dos valores de D.O. dos gatos com esporotricose coinfectados pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou leucemia felina (FeLV), em comparação aos gatos não coinfectados, no grupo 1.

Grupo	Média ± desvio padrão	Mediana	95% IC
FIV/ FELV +	1,89 ± 0,38	1,95	1,63 – 2,17
Soronegativos	1,77± 0,60	1,96	1,60 – 1,94

3.5 Exame citopatológico

A avaliação citopatológica dos animais do grupo 1, comparado com a cultura fúngica, revelou uma sensibilidade de 77,4%, especificidade de 83,3%, VPP de 93,2% e VPN de 55,6%.

3.6 Concordância entre os testes sorológicos, citopatológico e de cultura fúngica

Avaliando o índice Kappa de concordância entre os exames, a concordância entre a cultura fúngica e o exame sorológico foi de 83,9%, com índice Kappa de 0,11 ($p > 0,05$) e, entre a cultura fúngica e o exame citopatológico foi de 67%, com índice Kappa de -0,07 ($p > 0,05$). Já a concordância do exame sorológico com o citopatológico foi de 73,21%, com índice Kappa de 0,20, o que denota uma correlação entre os dois exames ($p = 0,04$) (Tabela 4).

Em casos onde o exame sorológico ou citopatológico resultar positivo, a sensibilidade dos testes é em torno de 82,4% e, se ambos forem positivos, a especificidade fica em torno de 89,3%, com valor preditivo positivo de 92,5%.

Tabela 4- Valores de Kappa, concordância e nível de significância (p) entre os exames sorológico, citopatológico e cultura fúngica, dos animais do grupo 1.

Exames	Kappa	Concordância	Interpretação	p
Cultura fúngica x Sorológico	0,11	83,9%	Pobre	>0,05
Cultura fúngica x Citopatológico	-0,07	67%	Não há concordância	>0,05
Sorológico x Citopatológico	0,20	73,21%	Justa	0,04

4. Discussão

O grupo de gatos diagnosticados com esporotricose mostrou uma prevalência de machos, não castrados, adultos jovens e com acesso total à rua, perfil este também relatado por outros estudos (Galati et al., 2017; Souza et al., 2018). Este perfil de animais apresenta intensa atividade migratória, são mais belicosos, envolvem-se frequentemente em disputas territoriais, hierárquicas e por fêmeas e, conseqüentemente, entram mais em contato com gatos doentes e tornam-se mais vulneráveis a adquirir esporotricose por meio de arranhadura e mordedura de gatos doentes, ou pelo contato com exsudato das lesões cutâneas, rico em elementos fúngicos (Gremião et al., 2017; Galati et al., 2017).

O teste imunoenzimático (ELISA) baseado no antígeno SsCBF purificado de *Sporothrix schenckii* demonstrou ser um exame com acurácia moderada e de boa sensibilidade e especificidade (em torno de 80%), com alto valor preditivo positivo, o que aumenta sua confiabilidade quando resulta positivo. Entretanto, resultados negativos não descartam a doença, já que o teste apresenta baixo valor preditivo negativo.

Apesar da observação de reações positivas em gatos saudáveis, seus

índices de densidade óptica foram significativamente inferiores aos dos animais doentes, o que denota a aplicabilidade prática na introdução deste método diagnóstico no cotidiano clínico, mediante determinação de títulos séricos.

Em outra pesquisa, o teste de ELISA com o mesmo antígeno, SsCBF, aplicado em gatos domésticos para diagnóstico da esporotricose demonstrou sensibilidade e especificidade superiores a 90%. A variabilidade pode estar relacionada com o baixo n utilizado, o que pode interferir nos valores de sensibilidade e especificidade (Fernandes et al, 2011). Outro aspecto relevante é que, em nosso estudo, utilizamos animais de regiões geográficas distintas de Fernandes e colaboradores (2011).

Um outro teste de ELISA foi realizado utilizando não antígenos da parede celular, mas extratos de homogeneizados celulares de *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Rodrigues et al, 2015). Segundo este estudo, soros de gatos reagiram de maneira semelhante, sem diferença significativa em título, entre placas de ELISA revestidas por os antígenos. Portanto, aparentemente o agente etiológico não influencia no resultado dos testes sorológicos entre espécies do gênero *Sporothrix* spp. Nossos resultados corroboram esta hipótese, uma vez que na região metropolitana de Curitiba, a esporotricose é quase exclusivamente causada pelo fungo *S. brasiliensis*.

Outro fato relevante é que a composição da parede celular de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* é similar (Lopes-Bezerra et al., 2018b). Em outro estudo também foi demonstrado que epítomos antigênicos comuns são conservados entre o *S. schenckii* e *S. brasiliensis* (Della Terra et al., 2017). Dessa forma, o antígeno SsCBF, proveniente do *S. schenckii*, foi capaz de

identificar anticorpos gerados durante a infecção com *S. brasiliensis*, nos animais testados. No entanto, como a similaridade bioquímica entre as duas espécies não é plena (Lopes-Bezerra et al, 2018b), isso pode afetar a sensibilidade e especificidade por nós determinada utilizando o antígeno de *S. schenckii*.

O exame de ELISA não revelou diferença significativa entre as diferentes formas clínicas apresentadas pelos gatos doentes. O mesmo ocorre em pacientes humanos, nos quais a sorologia também não faz distinção entre as várias manifestações cutâneas (Bernardes-Engemann et al., 2005; Almeida-Paes et al., 2007). Este achado é relevante pois o exame sorológico estudado pode ser indicado para qualquer quadro lesional da esporotricose em gatos, o que o torna muito útil nas apresentações cutâneas fixas e extracutâneas da doença que, geralmente, têm menor carga fúngica (Miranda et al., 2018b) e difícil acesso à colheita de amostras, o que geralmente conduz a resultados negativos nos exames citopatológico e histopatológico. Análises futuras, com definições de intervalos de títulos, podem colaborar no diagnóstico sorológico dos animais doentes e na distinção entre as formas clínicas da doença.

Neste estudo, a sensibilidade do exame citopatológico foi de 77,4% e pode ser considerada satisfatória, semelhante ao citado por Pereira et al. (2011). Como apresentou boa sensibilidade e bom valor preditivo positivo, há aumento da possibilidade diagnóstica da esporotricose quando este for positivo, porém quando negativo, a doença não pode ser descartada.

Já outro estudo, realizado na cidade do Rio de Janeiro, demonstrou valores de sensibilidade de 85% (SILVA et al., 2015). Estas variações na

sensibilidade podem estar relacionadas à leitura das lâminas por observadores diferentes além de variações no método de coleta, acondicionamento ou colorações (SILVA et al., 2015).

Apesar do índice Kappa não mostrar concordância entre a sorologia e a cultura fúngica, houve uma boa concordância entre a sorologia e o exame citopatológico e, embora um exame não deva ser usado em substituição ao outro, se ambos forem realizados em conjunto e resultarem positivos, há um ótimo valor preditivo positivo, o que subsidia o diagnóstico de esporotricose provável e permite o início precoce de protocolos terapêuticos e tomada de medidas de saúde pública. Em adição, os exames sorológicos e citopatológicos são de fácil execução, rápidos e muito importantes para implantação em áreas endêmicas da enfermidade.

Em relação a coinfeção retroviral nos animais do grupo 1 com FeLV (8) e FIV (3) , esta foi pouco frequente, o que demonstra que a soropositividade por essas retrovíroses não é fator predisponente para a infecção pelo *Sporothrix* spp. em felinos, nem para sua disseminação cutânea e ou sistêmica, como já evidenciado também em outro estudo (Schubach et al., 2004).

Apesar de ambos os vírus estarem associados com o decréscimo nas contagens dos linfócitos T CD4+ em gatos (Miranda *et al.*, 2018a), no presente trabalho, não foram observadas diferenças significativas nas densidades ópticas entre as sorologias dos gatos com esporotricose co-infectados ou não com FeLV e FIV. Possivelmente isto deve-se ao fato das infecções retrovirais afetarem mais significativamente a imunidade celular mediada e, apesar de poderem diminuir a resposta imune- humoral a

antígenos específicos, não afetam a formação de IgM e IgG a estímulos antigênicos múltiplos (Hartmann, 2012), o que pode estar presente em gatos com esporotricose cutâneo disseminada.

5. Conclusão

De acordo com os resultados deste estudo, conclui-se que o teste sorológico imunoenzimático realizado com o antígeno SsCBF apresenta sensibilidade, especificidade e acurácia moderadas e ótimo valor preditivo positivo no diagnóstico da esporotricose felina, independentemente da apresentação clínica, e pode ser um teste complementar ao exame citopatológico e à cultura fúngica no estabelecimento do diagnóstico desta morbidade.

Referências

1. Alba-Fierro, C.A., Pérez-Torres, A., López-Romero, E., Cuéllar-Cruz M., Ruiz-Baca, E., 2014. Cell wall proteins of *Sporothrix schenckii* as immunoprotective agents. Rev Iberoam Micol. 31, 86-89.
2. Almeida-Paes, R., Pimenta, M.A., Pizzini, C.V., Monteiro, P.C.F., Peralta, J.M, Nosanchuk, J.D, Zancopé-Oliveira, R.M., 2007. Clinical and Vaccine Immunology. 14, 244-249.
3. Bernardes-Engemann, A.R, Barros, M.L, Zeitune, T. et al., 2015. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. Medical Mycol. 53, 28-33.
4. Bernardes-Engemann, A.R., Orofino Costa, R.C., Miguens, B.P., Penha, C.V.L, Neves, E., Pereira, B.A.S, Dias, C.M.P, et al., 2005. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. Medical Mycology. 43, 487-493.

5. Blumer, S.O., Kaufman, L., Kaplan, W. et al., 1973. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. *Applied Microbiol.* 26, 4-8.
6. Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M.A., et al., 2015. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology.* 53, 3–14.
7. Della Terra, P.P, Rodrigues, A.M., Fernandes, G.F., Nishikaku, A. S., et al., 2017. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(8), 1-23. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005903>
8. Dohoo, I., Wayne, M., Stryhn H. *Veterinary Epidemiologic Research.* Chapter 5: Screening and Diagnostic Tests. Second edition. Ver Inc: Prince Edward Island, Canada, p91-127. 2010.
9. Farias, M.R., Franco, S.R.V.S., Fabris, V.E., 2004. Clinical, cytopathological and histopathological evaluation of sporotrichosis in experimentally infected cats. *World Congress of Veterinary Dermatology, Viena. Veterinary Dermatology.*15, 47.
10. Fernandes, G.F., Lopes-Bezerra, L.M., Engemann-Bernardes, A.R., et al., 2011. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. *Veterinary Microbiology.* 147, 445-449.
11. Fleiss, J.L., et al, 1981. The measurement of interrater agreement. *Statistical methods for rates and proportions.* 2(212-236): 22-23.
12. Galati, L.H.H., Tomimori, J., Taborda, C.P., Michalany, N.S., Larsson Junior, C.E., Larsson, C.E., 2017. Sporotrichosis: cat as the source of familiar

infection outbreak in Guarulhos, São Paulo: a case report. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 54 (4), 439-444.

13. Gremião, I.D.F., Menezes, R.C., Schubach, T.M.P., et al, 2015. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycology.* 53, 15-21.

14. Gremião, I.D.F., Miranda, L.H.M., Reis, E.G., Rodrigues, A.M., Pereira, S.A., 2017. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS Pathog.* 19, 1-7. doi: 10.1371/journal.ppat.1006077.

15. Hartmann, K. Feline leukemia virus infection. In: Greene CE (ed), *Infectious Diseases of the dog and cat.* 4rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, 108-136.

16. Landis, J.R., Koch, G.G., 1977 An Application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics.* 33, 363-374.

17. Lloret, A., Hartmann, K., Pennisi, M.G., et al., 2013. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *J Feline Med Surg.* 15, 619-623.

18. Lopes-Bezerra, L.M., 2011. *Sporothrix schenckii* cell wall peptidorhamnomannans. *Frontiers in Microbiology.* 2 (243), 1-3

19. Lopes-Bezerra, L.M. Mora-Montes, H.M. Bonifaz, A. *Sporothrix* and Sporotrichosis. In: Mora-Montes, H.M., Lopes-Bezerra, L.M.L (ed). *Current Progress in Medical Mycology.* 1rd ed. Springer International Publishing: New York, 2018a, pp 309-331.

20. Lopes-Bezerra, L.M, Walker, L.A., Niño-Vega, G., Mora-Montes H.M., et al., 2018b. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminar structures and sloughing of

extensive and intact layers. PLoS Negl Trop Dis. 12 (3), 1-25.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006169>

21. Macêdo-Sales, P.A., Souto, S.R.L.S., Destefani, C.A., Lucena, R.P., et al., 2018. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. BMC Veterinary Research. 14 (19), 2-10.

22. Madrid, I.M., Mattei, A., Martins, A., et al., 2010. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. Zoonoses Public Health. 57, 151-154.

23. Martínez-Álvarez, J.A., García-Carnero, L.C., Kubitschek-Barreira, P.H., Lozoya-Pérez, N.E., et al., 2019. Analysis of some immunogenic properties of the recombinant *Sporothrix schenckii* Gp70 expressed in *Escherichia coli*. 14 (5), 397-410.

24. Miranda, L.H.M., Meli, M., Conceição-Silva, F., et al., 2018a. Co-infection with feline retrovirus is related to changes in immunological parameters of cats with sporotrichosis. PLOS One. 30, 1-16.

25. Miranda, L.H.M, Silva, J.N., Gremião, I.D.F, Menezes, R.C., Almeida-Paes, R., Reis, E. G., Oliveira, R.V.C., Araújo, D.S.A., Ferreiro, L., Pereira, S.A., 2018b. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. Journal of Fungi. 92, 1-11. doi:10.3390/jof4030092

26. Montenegro, H., Rodrigues, A.M., Dias, M.A.G, et al., 2014. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. Veterinary Research. 10(269), 1-10.

27. Moore, D. S., McCabe, G.P., Craig, B. A. Chapter 15: Nonparametric tests. In: Introduction to the Practice of Statistics. 7th edition, p. 719-751. 2012.
28. Pereira, S.A., Menezes, R.C., Gremião, I.D.F., Silva, J.N, Honse, C.O., Figueiredo, F.B., Silva, D.T., Kitada, A.A.B., Reis, E.G, Schubach, T.M.P., 2011. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 13, 220-223.
29. Queiroz-Telles, F., Fahal, A.H., Falci, D.R., et al., 2017. Neglected endemic mycoses. *The Lancet*. 24, 1-11.
30. Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S.; de Camargo, Z.P., 2016. Sporothrix species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLoS Pathog*.14, 1-7 <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005638>
31. Rodrigues, A.M., Fernandes, G.F., Araújo, L.M., et al., 2015. Proteomics-based characterization of the humoral immune response in sporotrichosis: toward discovery of potencial diagnostic and vaccine antigens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 25: 1-18.
32. Schubach, T.M.P., Schubach, A., Okamoto, T., Barros, M.B.L, et al., 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *JAVMA*. 224,1623-1629.
33. Shapiro, S.S.; Wilk, M. B., 1965. An Anlysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 52, 591–611.
34. 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., Ferreiro, L., Pereira, S.A., 2018.

Comparison of the sensitivity of three methods for the early diagnosis of sporotrichosis in cats. *J. Comp. Path.* 160, 72-78.

35. Silva, J.N., Passos, S.R.L., Menezes, R.C., Gremião, I.D.F, Schubach, T.M.P, Oliveira, J.C, Figueiredo, A.B.F, Pereira, S.A. 2015. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Medical Mycology*. 53, 880-884.

36. Souza, E.W, Borba, C.M., Pereira, S.A., Gremião, I.D.F et al, 2018. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Scientific Reports* 8(9074), 1-10. DOI: 10.1038/s41598-018-27447-5

37. Swets, J. A., 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*. 240 (4857),1285–1293.

CAPÍTULO 3

AVALIAÇÃO DE PROTOCOLOS TERAPÊUTICOS NA ESPOROTRICOSE FELINA

Fabiana S Monti¹, Luana B Ballardin¹, Suelen S Ribeiro¹, Kung Darh Chi¹, Victor Matheus da Rosa¹, Vania Aparecida Vicente², Flavio Queiroz-Telles³, Claudia Turra Pimpão¹, Marconi R Farias¹.

¹Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Faculdade de Medicina Veterinária, Curitiba/PR, Brasil

²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Biologia Molecular, Curitiba/PR, Brasil

³Universidade Federal do Paraná, Departamento de Saúde Coletiva, Curitiba/PR, Brasil

Endereço para correspondência:

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rockfeller 1311, Rebouças, Curitiba 80.230-130, Brasil

Email: marconi.puc@terra.com.br

RESUMO

Objetivos: O objetivo deste estudo foi avaliar a efetividade e as reações adversas de diferentes esquemas terapêuticos em gatos diagnosticados com esporotricose. **Metodologia:** O estudo teve caráter longitudinal e avaliou 59 gatos atendidos na Clínica Veterinária Escola da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil. Os animais foram tratados com monoterapia de itraconazol (ITZ), associação com iodeto de potássio (KI) ou acrescidos de terapia coadjuvante com anfotericina B. **Resultados:** Dos 59 gatos, 34 gatos iniciaram monoterapia com ITZ e, 25 animais, ITZ associado ao KI. Dentre os 34 animais que fizeram uso da monoterapia, 11 (32%) curaram, 1 (3%) foi eutanasiado e os outros 22 (65%) tiveram que associar KI ao protocolo terapêutico. Ao final, dos 47 gatos que foram tratados com a associação de ITZ e KI, a cura foi alcançada em 24 (51%), 7 (15%) evoluíram para óbito e em 14 (29,8%) houve necessidade de instituição de terapia coadjuvante, com a utilização de anfotericina B. Quando a terapia coadjuvante foi associada, 7 (50%) gatos recuperaram-se da doença. **Conclusões e relevância:** A associação de ITZ ao KI foi necessária

na maioria dos gatos para alcançar sucesso terapêutico e, em alguns casos, a terapia coadjuvante foi ainda requerida para melhorar os índices de cura.

Palavras-chave: *Sporothrix schenckii*; *Sporothrix brasiliensis*; micose; itraconazol; iodeto de potássio; anfotericina B.

ABSTRACT

Objectives: the aim of this study was to evaluate combined therapy's efficiency and side effects in sporotrichotic cats. **Methodology:** longitudinal study was applied to evaluate 59 sporotrichotic cats diagnosed and treated in CVE-PUCPR, Curitiba, Brazil. Treatment protocols were itraconazole ITZ monotherapy, ITZ and potassium iodide (KI) associated, alternative therapies (amphotericin B and cryotherapy). **Results:** Of the 59 cats, 34 started itraconazole (ITZ) monotherapy and 25 itraconazole associated to potassium iodide (KI). Among 34 ITZ monotherapy, 11 (32%) cats were cured, 1(3%) euthanized and 22 (65%) converted to ITZ+KI associated therapy protocol. In the end, the 47 cats under associated therapy protocol, 21 (51%) cats were cured, 7 (15%) deceased and 14 (29,8%) undergone alternative therapy with amphotericin B, resulting in 7 (50%) cured cases. **Conclusions and relevance:** ITZ+KI associated protocol was necessary in most of the cases to reach therapeutic success, also alternative therapy was applied to improve the cure rates.

Keywords: *Sporothrix schenckii*; *Sporothrix brasiliensis*; mycosis; itraconazole; potassium iodide; amphotericin B.

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção micótica de implantação, crônica, que acomete animais e humanos. No Brasil, o *S. brasiliensis* é o principal agente etiológico da esporotricose e, o gato doméstico (*Felis catus domesticus*), a espécie mais vulnerável à infecção por este agente,^{1,2} o qual desenvolve quadros cutâneo disseminados, de aspecto úlcero^{3,4} gomosos e com alta carga parasitária.

Surtos urbanos de esporotricose em humanos estão associados à transmissão por gatos doentes, sendo seu contágio por meio de mordeduras,

arranhaduras ou contato direto com lesões, exsudatos ou crostas contaminadas.^{2,5,6}

O itraconazol (ITZ) é o fármaco mais utilizado no tratamento da esporotricose felina e humana⁷, porém, o *S. brasiliensis* possui mecanismos de virulência que proporcionam maior capacidade de invasão e adaptação ao tecido de mamíferos, como parede celular mais espessa e microfibrilas, que permitem a agregação das células fúngicas e formação de biofilmes complexos,^{8,9} o que podem ser fatores relacionados à ineficácia terapêutica^{9,10,11} e à necessidade de altas doses de ITZ, ou sua associação a outras terapias para se obter sucesso terapêutico.

Assim, o tratamento da esporotricose felina constitui um desafio, pois casos refratários ao itraconazol, o tempo, o custo, efeitos colaterais associados à terapia e dificuldades inerentes à administração do medicamento aos gatos, têm levado a seu frequente abandono.^{7,9} Este estudo visa avaliar a efetividade de diferentes protocolos terapêuticos utilizados no controle das formas clínicas da esporotricose em gatos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Critérios de inclusão: Foi realizado um estudo longitudinal de 59 gatos com esporotricose, atendidos e diagnosticados na Clínica Veterinária Escola da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CVE - PUCPR), Brasil, entre janeiro de 2017 a junho de 2018. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para uso de Animais em Pesquisa da PUCPR, sob o protocolo número 01058A/201.

Todos os animais incluídos no estudo apresentavam suspeição de esporotricose pelos exames clínico, citopatológico e/ou dermatohistopatológico. O diagnóstico definitivo foi subsidiado pelo isolamento do *Sporothrix* spp. em meio de cultura específico.

2.2 Critérios de exclusão: Foram excluídos do estudo os animais cujos proprietários não concordaram em participar da pesquisa ou quando o diagnóstico micológico resultava negativo.

2.3 Avaliação clínica: Os gatos foram examinados e as formas clínicas classificadas em 1) Cutânea fixa, quando a lesão era única, geralmente restrita ao ponto de inoculação fúngica 2) Linfocutânea, quando havia linfangite e lesões cutâneas contíguas ao trajeto linfático, associada à linfadenite regional e 3) Cutâneo disseminada, em animais com lesões ulcerosas ou úlcero-gomosas multifocais ou generalizadas. Envolvimento extracutâneo foi também registrado quando observado, nas vias aéreas, nódulos na cavidade nasal, estrídulos respiratórios ou espirros; e, no exame oftálmico, blefaroconjuntivite granulomatosa.

2.4 Diagnóstico: Em todos os animais, o exame citopatológico foi realizado a partir do exsudato lesional e o diagnóstico presuntivo estabelecido mediante a visualização microscópica de leveduras pleomórficas, de corpo celular basofílico e halo claro¹². Quando o exame citopatológico resultava negativo, o animal era submetido à biópsia de pele, sendo as amostras coradas em hematoxilina-eosina (H&E) e ácido periódico de Schiff (PAS), para se evidenciar as leveduras teciduais. O diagnóstico definitivo de esporotricose foi estabelecido a partir da cultura do exsudato de lesões tegumentares cultivados em meio seletivo. Após o crescimento fúngico, este era avaliado em microscopia, onde se observava a morfologia hifóide característica de *Sporothrix* spp., por meio da técnica de coloração com lactofenol.¹³

2.5 Identificação molecular: Para identificação molecular foi realizado a extração de DNA genômico em fase micelial.¹⁴ A concentração e qualidade final de DNA nas amostras foi determinada por espectrofotometria e visualização do DNA genômico em eletroforese e gel de agarose, sendo que um único produto amplificado determinou uma amostra livre de inibidores e pronta para a reação em cadeia de polimerase (PCR). Para a identificação molecular das espécies crípticas de *Sporothrix schenckii* (*lato sensu*), utilizou-se a reação de PCR espécie-específico com primers, marcados no gene calmodulina (CAL).¹⁵ Após processadas, a visualização em eletroforese e gel de agarose de um único produto amplificado, específico para cada primer, apontava a espécie determinada, sendo que a amplificação do fragmento de

469 pb (0,46 kb), pelos primers Sbra-F/Sbra-R, afirmaram amostra positiva para *Sporothrix brasiliensis*. Da mesma maneira, um fragmento de 331pb (0,33kb) amplificado pelos primers Ssch-F /Ssch-R, confirmaram *S. schenckii*, e assim por diante, até que todas as amostras foram amplificadas. Todas as reações corridas tiveram um controle positivo e um negativo.

2.6 Tratamento: Os animais incluídos no estudo manifestavam formas clínicas variadas e tiveram suas terapias prescritas de acordo com a gravidade da doença no momento da consulta. Instituiu-se tratamento com itraconazol como monoterapia, quando apresentavam quadro lesional cutâneo fixo, linfocutâneo ou cutâneo disseminado discreto, com ou sem a presença de sinais respiratórios. O itraconazol (ITZ) utilizado foi industrializado geralmente de origem genérica, e a dose utilizada foi 10-20mg/kg em pacientes até 3,0 kg e 100mg/gato em pacientes acima de 3,0 kg.

Os gatos que manifestavam lesões cutâneo disseminadas graves, associadas ou não à manifestação respiratória, foram submetidos a terapia com ITZ, na mesma dosagem, associado ao iodeto de potássio (KI), manipulado em cápsula, na dose de 5mg/kg.

Nas reconsultas, realizadas a cada 30 dias, em caso de persistência das lesões iniciais ou agravamento do quadro clínico, os pacientes em monoterapia com ITZ passavam a receber a associação ITZ-KI. Quando estabelecida a cura clínica (Quadro 1), a terapia era mantida por um período adicional de quatro ou oito semanas, dependendo se o quadro clínico inicial era manifestado na ausência ou presença de sinais respiratórios, respectivamente.

Quando havia falha terapêutica (Quadro 1) mesmo com a associação de fármacos, fazia-se necessária terapia coadjuvante ao uso de ITZ e KI, com aplicação de desoxicolato de anfotericina B (D-AMB) intralesional. Nesses casos, os animais eram sedados e anestesiados com protocolo, por via intramuscular de metadona (0,3mg/kg), cetamina (3mg/kg), midazolam (0,15mg/kg) e dexmedetomidina (8mcg/kg).

A terapia com D-AMB (Anforicin B; Cristália) era realizada com aplicações de 1 a 3ml, por via intralesional, a cada sete dias, por três a quatro

semanas. Após o procedimento, os gatos permaneciam internados até a completa recuperação anestésica.

Alguns pacientes foram tratados em casa pelos responsáveis ou foram mantidos em regime de internação devido à gravidade do quadro, por maior risco de transmissão zoonótica ou por inabilidade dos proprietários em administrar as medicações por via oral.

2.7 Avaliação da resposta terapêutica e efeitos colaterais: Os animais que permaneceram internados eram avaliados semanalmente e, os gatos tratados em casa por seus tutores, avaliados com periodicidade quinzenal ou mensal. A resposta terapêutica foi classificada como: cura; falha terapêutica; óbito; eutanásia ou recidiva (Quadro 1). O tempo para cura, óbito ou eutanásia foram documentados em semanas, assim como o tempo para recidiva (Quadro 1). A adesão dos tutores ao tratamento foi observada por meio da ausência de adesão ao protocolo estabelecido ou abandono de terapia (Quadro 1), sendo que o tempo para a mesma foi registrado em semanas.

Foram considerados como reações adversas a presença de vômitos, hiporexia, anorexia e perda de peso. Nesses casos, as medicações eram interrompidas para tratamento suporte do quadro sistêmico e, após a sua recuperação, reintroduzidas com redução de 50% da dose inicial.

2.8 Análise estatística: Os dados demográficos dos animais participantes e da resposta terapêutica foram apresentados descritivamente em percentual ou média com desvio padrão, quando a sua distribuição foi simétrica e, mediana, valores mínimo e o máximo, quando assimétrica.

QUADRO 1 – Determinação dos critérios utilizados para avaliação da resposta terapêutica.

Cura	Remissão completa de todas as lesões e de todos os sinais clínicos relacionados à esporotricose.
Falha terapêutica	Ausência de resposta ou involução sintômato-lesional parcial à terapia estabelecida, resultando necessidade de terapia coadjuvante.
Óbito	Morte do animal no período de tratamento, relacionada à doença.
Eutanásia	Morte de fins humanitários, proporcionada sem sofrimento, ao

	animal em estado grave e refratário à múltiplas terapias estabelecidas para a esporotricose. Indicada pela equipe de médicos veterinários.
Tempo até cura	Intervalo entre o início da terapia e o desaparecimento de todas as lesões cutâneas e ou sinais respiratórios relacionados à esporotricose.
Recidiva	Reaparecimento das lesões e/ou sinais respiratórios no período após alta clínica.
Tempo até óbito ou eutanásia	Intervalo entre o início da terapia e óbito ou eutanásia.
Tempo após cura até recidiva	Intervalo entre o último dia de medicação e o aparecimento de lesões.
Abandono de terapia	Não comparecimento para avaliação clínica/laboratorial em três revisões mensais consecutivas.
Tempo até o abandono de terapia	Intervalo entre o início da terapia e a última revisão mensal comparecida pelo tutor.
Não adesão terapêutica	A não administração, por parte dos tutores, de qualquer uma das medicações por, no mínimo, um dia, durante o período estipulado de tratamento.

3. RESULTADOS

3.1 Identificação molecular: A identificação molecular foi realizada nos 59 gatos incluídos no estudo e, em todas, o *S. brasiliensis* foi a única espécie identificada.

Dos 59 gatos do estudo, 31 (52,5%) foram mantidos em regime de internação durante todo o período de tratamento.

3.2 Monoterapia com ITZ: Dentre os 59 animais, 34 (57,6%) iniciaram a monoterapia com itraconazol e 11 deles (32%) alcançaram a cura clínica, com tempo médio de 7,4 semanas, variando entre duas e 28 semanas (Tabela 1). Destes, seis (55%) apresentavam quadro cutâneo disseminado; quatro (36%) quadro cutâneo fixo e um (9%) quadro linfocutâneo. Dos 11, 10 não manifestavam envolvimento respiratório.

Falha terapêutica foi observada em 23 dos 34 gatos (68%) que iniciaram monoterapia com ITZ (Tabela 1). Desses, um foi submetido à eutanásia (Tabela 2) e nos 22 restantes (65%) houve necessidade de instituição de tratamento combinado com KI (Tabela 1).

Destes 22 gatos, 18 (82%) apresentavam a forma cutâneo disseminada e quatro (18%) a forma cutâneo fixa. Envolvimento respiratório foi manifestado por 17 (77%) e 14 (82,3%) deles apresentaram quadro cutâneo disseminado concomitante.

Dos 34 animais que foram tratados com monoterapia com ITZ, seis (17,6%) apresentaram efeitos adversos manifestados como vômito, hiporexia ou emagrecimento (Tabela 1).

Tabela 1- Relação entre os aspectos clínicos e resposta terapêutica dos gatos tratados em monoterapia com Itraconazol (ITZ), associação de Itraconazol com iodeto de potássio (ITZ + IK), e associação com as terapias coadjuvantes (D-AMB + crioterapia).

	ITZ	ITZ + KI	D-AMB
Nº de gatos (%)	N = 34 (100%)	N = 47 (100%)	N = 14 (100%)
Cura clínica	11 (32%)	24 (51%)	7 (50%)
Tempo médio até cura (semanas)	7,4 (2-28)	11,6 (3-28)	28 (13-48)
Falência terapêutica	23 (68%)	7 (15%)	7 (50%)
Passaram a usar ITZ + KI	22 (65%)	na*	na*
Necessário terapias coadjuvantes	na*	16 (34%)	na*
Efeitos colaterais	6 (17,6%)	15 (32%)	2 (14,3%)**

ITZ= Itraconazol; IK = Iodeto de potássio; D-AMB = Anfotericina B
Nota: *na – Não se aplica.

**Efeito colateral da aplicação intralesional da anfotericina B

3.3 Associação de ITZ com KI e terapias coadjuvantes: O ITZ associado ao KI foi a escolha terapêutica inicial em 25 (42,4%) dos 59 gatos mantidos no estudo. Somados aos 22 animais que iniciaram a monoterapia com ITZ, porém necessitaram da inclusão do KI ao longo do tratamento, perfizeram um total de 47/59 (79,7%) pacientes que foram tratados com esta associação terapêutica.

Dos 47 gatos tratados com ITZ associado ao KI, 24 (51%) alcançaram a cura clínica, com tempo médio de 11,6 semanas, variando de três a 28 semanas de tratamento (Tabela 1); sete (15%) tiveram evolução negativa para óbito, e destes, cinco (71,4%) apresentaram quadro cutâneo disseminado associado à sinais respiratórios.

Dos 47 gatos, 14 (29,8%) necessitaram de terapia complementar coadjuvante com aplicação de D-AMB intralesional. As lesões disseminadas com quadro respiratório (estrídulos, espirros e deformidade nasal) estiveram presentes em 11 (78,6%) desses animais, sendo que sete (50%) alcançaram a cura clínica (Tabela 1). O tempo médio para cura clínica nesses animais foi de 28 semanas, variando entre 13 e 48 semanas (Figuras 1 a,b) (Figura 2 a,b).

Destes 14 animais, apesar da instituição de terapia coadjuvante, sete (50%) pacientes vieram à óbito ou foram eutanasiados, por falta de resposta ao tratamento (Tabela 2).

Tabela 2- Relação dos aspectos clínicos e evolução negativa para óbito nos pacientes estudados.

	ITZ	ITZ + KI	ITZ + KI + D-AMB
Nº de gatos (%)	N = 1	N = 7	N = 7
Óbito	0	6 (86%)	1 (14%)
Eutanásia	1	1 (14%)	6 (86%)
Tempo médio até óbito/eutanásia (semanas)	2	15 (2-36)	26 (12-32)
Lesões cutâneas disseminadas	1	5 (71,4%)	7 (100%)
Quadro respiratório	1	5 (71,4%)	7 (100%)

ITZ= Itraconazol; KI = Iodeto de potássio; D-AMB = Anfotericina B

Reações adversas como hiporexia, vômitos e emaciação foram observadas em 15 (32%) dos 47 gatos tratados com a associação de ITZ e KI (Tabela 1) e tremores da musculatura mandibular e dor foram observados em dois dos 14 gatos (14,3%), nos quais foi instituída a aplicação intralesional de D-AMB, o que requereu instituição imediata de terapia analgésica para sua reversão.

Assim, houve involução dos sinais clínicos e cura clínica em 31 (66%) dos gatos com esporotricose cutâneo disseminada que utilizaram terapia

combinada de ITZ com KI e, quando necessário, tiveram estabelecida terapia complementar com aplicações intralesionais de D-AMB.

Em todos os animais, o tempo médio para óbito ou eutanásia foi de 18 semanas, variando de duas a 36 semanas.



Figura 1 (a) Gato, macho, adulto, mestiço, com diagnóstico de esporotricose cutâneo disseminada, apresentando lesões ulcerosas em região periocular, plano e ponte nasal, encimadas por crostas hemáticas; perda da arquitetura nasal e granuloma conjuntival esquerdo.

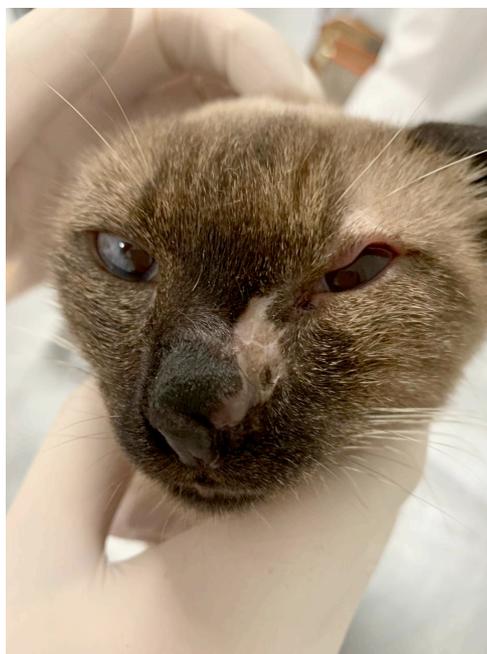


Figura 1 (b) Mesmo animal após tratamento com associação de itraconazol e iodeto de potássio, acrescida de aplicações intralesionais semanais de anfotericina B. Resolução do granuloma oftálmico e das lesões cutâneas e em mucosa nasal, após seis meses de terapia.

Recidivas ocorreram em dois (18,2%) dos 11 gatos curados com monoterapia com ITZ. O tempo médio para recidiva nesses dois pacientes foi de 6,5 semanas. Dos 24 gatos tratados e curados com a associação de ITZ com KI, 12 (50%) apresentaram recidiva após tempo médio de 17,6 semanas (variando de três a 40 semanas). Destes, sete (58%) apresentavam lesões cutâneo disseminadas, sendo que quatro deles, com envolvimento respiratório. Os outros cinco gatos (42%) tinham quadro cutâneo fixo, sendo três deles em associação à manifestação respiratória.



Figura 2 (a) Gato, macho, adulto, mestiço, com diagnóstico de esporotricose cutânea fixa, apresentando lesão nodular, com centro ulceroso, em ponte nasal.



Figura 2 (b) Mesmo animal após tratamento com associação de itraconazol e iodeto de potássio, acrescida de aplicações intralesionais semanais de anfotericina B. Lesão cicatricial em ponte nasal após três meses de terapia.

4. DISCUSSÃO

O itraconazol é um fármaco lipofílico, bem absorvido após administração oral e amplamente distribuído aos tecidos, onde atinge concentrações até 10 vezes mais elevadas àquelas encontradas no plasma^{16,17}. A concentração sérica máxima de ITZ é atingida após três semanas de seu uso regular¹⁸.

O índice de cura observado nos 34 animais tratados com monoterapia com itraconazol (32%) foi similar a uma pesquisa prévia,⁷ na qual 61/175 (38%) alcançaram resposta favorável, porém diferiu de outro estudo que revelou 71% de resposta em gatos sob mesmo tratamento¹⁹.

O insucesso em 68% dos pacientes tratados com ITZ pode estar relacionado ao fato que a maioria desses animais apresentava quadro cutâneo disseminado associado ao quadro respiratório. Outro estudo⁷ também relatou que as manifestações respiratórias foram associadas com falha terapêutica e óbito, o que reafirma a refratariedade na terapia desses sinais extracutâneos associados à enfermidade.

Análises histopatológicas das lesões nasais de gatos com esporotricose refratários à terapia, verificaram alta frequência de piogranulomas pouco organizados, intenso infiltrado inflamatório, alta carga fúngica e extensão das lesões à mucosa, cartilagem e estruturas ósseas, o que atesta a virulência do *Sporothrix* spp. nos pacientes acometidos³ e pode dificultar a distribuição do antifúngico nesses tecidos, explicando a pobre resposta à monoterapia com itraconazol nos quadros com envolvimento respiratório.

Uma pesquisa sobre suscetibilidade *in vitro* demonstrou que a concentração inibitória mínima (CIM) do ITZ contra isolados de *S. brasiliensis* é muito alta (CIM: 3,4 µg/ml)²⁰ e talvez, mesmo em doses elevadas, não alcance concentrações teciduais eficazes contra o *Sporothrix brasiliensis*, o que também poderia explicar a sua resposta parcial nos animais tratados no presente estudo. É importante considerar que, uma vez absorvido, mais de 99% do fármaco liga-se à albumina sérica,²¹ porém, ectoparasitoses, verminose, má nutrição ou transudação de proteínas através das lesões ulcerosas extensas, podem resultar em hipoalbuminemia e comprometer a resposta terapêutica ao itraconazol.

Também vale ressaltar que a falta de padronização na origem do ITZ utilizado, associado ao fato que 47,5% dos 59 pacientes que permaneceram sob tratamento foram medicados por seus tutores em ambiente domiciliar, pode ter colaborado para a alta taxa de insucesso da monoterapia com itraconazol.

A associação do ITZ ao KI resultou em maior índice de cura clínica (51%). Em outro estudo, a mesma combinação terapêutica em 30 gatos com esporotricose resultou em 96% de cura, com um tempo médio de 14 semanas.²² O alto índice de cura relatado nesse estudo progresso pode ser explicado pelo menor número de animais com quadro respiratório (20%), quando comparado ao presente estudo, no qual 31 (66%) dos 47 gatos apresentaram essa manifestação.

O mecanismo de ação do KI na esporotricose não está bem elucidado e é incerto se exerce algum mecanismo fungicida ou se favorece a resposta imunológica inata, aumentando a atividade fungicida dos fagócitos.

Degeneração celular da levedura foi demonstrada *in vitro*, quando o fármaco é transformado de KI para iodo²³. Outro estudo sugeriu a resolução dos granulomas fúngicos por aumentar a proteólise e a fagocitose²⁴, o que justificaria seus efeitos nos granulomas intranasais. Possivelmente, o efeito imunomodulador do KI reduza a carga fúngica e permita uma melhor ação do ITZ.

Dentre os 47 animais que foram tratados com ITZ e KI, 14 (29,8%) necessitaram de terapia complementar, com a aplicação intralesional de anfotericina B, e 11 (78,6%) deles manifestavam lesões cutâneo-disseminadas concomitantes à manifestação respiratória. Nesses animais, a associação de ITZ ao KI não foi suficiente para a involução total dos sinais clínicos, possivelmente, por suas baixas concentrações terapêuticas em sítios periféricos e nas vias aéreas superiores, devido ao reduzido suprimento sanguíneo dos seios faciais, como sugerido por outros autores²⁵.

A anfotericina B intralesional também já foi utilizada com sucesso em outros estudos^{26,27}. Esta liga-se ao ergosterol, presente na membrana celular do fungo, causa extravazamento de seu conteúdo citoplasmático e dano oxidativo¹⁶. Assim, a aplicação intralesional do fármaco, promove altas concentrações teciduais deste fármaco e aumenta a sua efetividade, minimizando seus paraefeitos associados à nefrotoxicose, hipercalemia e arritmias cardíacas²⁶.

O tempo médio até a cura clínica nos animais tratados com ITZ associado ao KI foi de 11,6 semanas, e com a implementação da terapia coadjuvante, foi de 28 semanas. É importante a percepção da não involução dos sinais clínicos apenas com a associação de ITZ e KI, de forma a implementar terapia complementar com aplicações intralesionais de anfotericina B de maneira mais precoce, e melhorar a expectativa de cura dos pacientes.

É importante ressaltar que o tempo médio de cura superior observado nos animais que utilizaram ITZ associado ao KI, ou com terapia coadjuvante, em relação àqueles que utilizaram monoterapia com ITZ (7,4 semanas), possivelmente deve-se pela gravidade das manifestações clínicas

apresentadas pelos animais que precisaram dessas associações terapêuticas.

Reações adversas clínicas como hiporexia, vômitos e emagrecimento foram mais prevalentes quando o ITZ foi associado ao KI (32%), quando comparado aos animais tratados com ITZ como monoterapia (18%). Em estudos prévios, o KI, quando em monoterapia ou associado ao itraconazol, resultou em reações adversas em 50% dos pacientes, quando utilizado em doses mais altas (entre 2,5 e 20 mg/kg).^{22,25} Assim, apesar de náuseas, anorexia e vômitos também poderem ser decorrentes do efeito hepatotóxico dose dependente do ITZ²¹, a ocorrência de efeitos indesejáveis nos animais que associaram o uso de KI pode ser relacionado ao iodismo, o qual manifesta-se por ptialismo, vômito, diarreia, anorexia, espasmos musculares, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, depressão, hipotermia ou hipertermia em gatos²⁸.

O alto índice de recidiva observado nos animais tratados com ITZ associado ao KI (50%) justifica-se pelos pacientes tratados nesse grupo terem quadro clínico cutâneo mais grave e, geralmente, correlacionado à manifestação respiratória com alta carga parasitária. Relato de recidiva em mucosa nasal também foi descrito por outros autores²⁵. Essa alta porcentagem de recidiva observada sugere que o tempo de terapia preconizado esteja sendo insuficiente para o controle da infecção. Novos estudos são necessários para avaliar o tempo de tratamento mais adequado, e o período pós cura clínica que estes pacientes devem ser mantidos com uso de antifúngicos, principalmente nos casos de esporotricose cutâneo disseminada em associação ao envolvimento nasal, para impedir a recorrência.

Mesmo após o estabelecimento de múltiplos protocolos terapêuticos, alguns gatos não melhoraram, o que levou à cronificação da doença e sua possível disseminação para sítios extracutâneos. Em humanos, desafios antigênicos crônicos têm sido associados a síndromes de exaustão imunológica e imunodeficiência adquirida²⁹, o que favorece a disseminação, cronificação e aumento da gravidade de morbidades infecciosas como tuberculose, hanseníase e síndrome da imunodeficiência viral adquirida

(AIDS). Também há evidências que o *Sporothrix* spp. forme biofilme⁸, o que dificulta a sua fagocitose e a eficácia de antifúngicos orais. Isto pode favorecer sua invasibilidade tecidual, fungemia e evolução negativa para óbito, como observado em 15 dos 59 (25%) pacientes do presente estudo.

O tempo prolongado, o custo oneroso do tratamento, a dificuldade de manter o paciente em ambiente domiciliar, as dificuldades inerentes a administração oral de medicações nos gatos e o fato de alguns desses animais serem querenciados e sem tutores, podem ter favorecido às falhas de terapia. Em adição, a maior parte dos gatos com esporotricose é oriunda de população com maior vulnerabilidade econômica e social, com dificuldades financeiras em manter o tratamento e de conduzir o animal para acompanhamento médico veterinário.

5. CONCLUSÕES

No presente estudo, a esporotricose felina foi causada pelo *S. brasiliensis* e, geralmente, teve caráter cutâneo disseminado associado ao quadro respiratório. A monoterapia com ITZ tem alta taxa de insucesso nestes quadros clínicos, e há necessidade de implementação precoce do KI e, em casos irresolutos, de tratamento coadjuvante intralesional com a anfotericina B.

AGRADECIMENTOS

A Unidade de Vigilância de Zoonoses da cidade de Curitiba, Paraná.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não têm nenhum conflito de interesse a declarar.

FINANCIAMENTO

Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)-Brasil.

REFERÊNCIAS

1 Rodrigues AM, de Hoog GS and de Camargo ZP. **Sporothrix species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission.** *PLOS Pathog* 2016; 14: 1-7.

2 Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, et al. **Neglected endemic mycoses.**

The Lancet 2017; 24: 1-11.

3 Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, et al. **Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects.** *Med Mycology* 2015; 53: 15-21.

4 Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, et al. **Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management.** *J Feline Med Surg* 2013; 15: 619-623.

5 Barros MBL, Schubach TP, Coll JO, et al. **Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia.** *Rev Panam Salud Publica* 2010; 27: 455-460.

6 Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, et al. **Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil.** *BMC Vet Research* 2014; 10: 1-10.

7 Pereira SA, Passos SRL, Silva JN, et al. **Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis.** *Vet Record* 2010; 166: 290-294.

8 Brilhante RSN, Aguiar FRM, Silva MLQ, et al. **Antifungal susceptibility of *Sporothrix schenckii* complex biofilms.** *Med Mycology* 2018; 56: 297-306.

9 Lopes-Bezerra LM, Walker LA, Niño-Vega G, et al. **Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers.** *PLOS Negl Trop Dis* 2018; 12: 1-25.

10 Gompertz OF, Rodrigues AM, Fernandes GF, et al. **Case report: atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to itraconazole.** *Am J Trop Med Hyg* 2016; 94: 1218-1222.

11 Vettorato R, Heidrich D and Fraga F. **Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* senso stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: Case report.** *Med Mycol Case Rep* 2017; 19: 18-20.

12 Farias MR, Franco SRVS and Fabris VE **Clinical, cytopathological and histopathological evaluation of sporotrichosis in experimentally infected cats.** World Congress of Veterinary Dermatology, Viena. *Vet Dermat* 2004;15: 47.

13 Rippon J. **The true pathogenic fungus infections and the opportunistic fungus infections.** In: Rippon J (ed), *Medical Mycology – The Pathogenic Fungi and Pathogenic Actinomycetes*. 3rd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1988, pp 373-380.

14 Vicente VA, Attili AD, Pie MR, et al. **Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection.** *Studies in Mycology* 2008; 61: 137-144.

- 15 Rodrigues AM, de Hoog GS and de Camargo ZP. **Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: 1-22.
- 16 Giguère S. **Antifungal chemotherapy.** In: Giguère S, Prescott JF and Dowling PM (ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5rd ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013, pp 333-355.
- 17 Liang C, Shan Q, Zhong J, Li W, Zhang X, et al. **Pharmacokinetics and bioavailability of itraconazole oral solution in cats.** *J Feline Med Surg* 2015; 29:1-5.
- 18 Boothe DM, Herring I, Calvin J, Way N, Dvorak J. **Itraconazole disposition after single oral and intravenous and multiple oral dosing in healthy cats.** *Am J Vet Res* 1997; 58:872-877.
- 19 Souza EW, Borba CM, Pereira SA, Gremião IDF et al. **Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*.** *Scientific Reports* 2018; 8: 1-10.
- 20 Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, et al. **Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine.** *Med Mycol* 2015; 53: 178-188.
- 21 Miller WH, Griffin CE and Campbell KL. **Fungal and Algal Skin Diseases.** In: Muller & Kirk's *Small Animal Dermatology*. 7rd ed. St. Louis: Elsevier Mosby, 2013, pp 223-283.
- 22 Reis EG, Schubach TMP, Pereira SA, et al. **Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study.** *Med Mycology* 2016; 54: 684-690.
- 23 Sterling JB and Heymann WR. **Potassium iodide in dermatology: A 19th century drug for the 21 st century-uses, pharmacology, adverse effects, and contraindications.** *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 691-697.
- 24 Torres MBM, Vazquez VE and Mendonza GA. **Effect of potassium iodide on the immune response in the sporotrichosis.** *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 98-100.
- 25 Reis EG, Gremião IDF, Kitada AAB, et al. **Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis.** *J Feline Med Surg* 2012; 14: 399-404.
- 26 Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, et al. **Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis.** *J Feline Med Surg* 2009; 11: 720-723.
- 27 Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, et al. **Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole.** *Aust Vet J* 2011; 89: 346-351.

28 Schubach TMP, Menezes RC and Wanke B. **Sporotrichosis** In: Greene CE (ed), *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, pp 645-650.

29 Schietinger A and Greenberg PD. **Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction**. *Trends in Immunology*; 2014; 35: 51-60.

CAPITULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos grandes centros urbanos do Brasil, os surtos da esporotricose em gatos são os grandes responsáveis pela ocorrência da doença em humanos, acometendo principalmente, uma população com maior vulnerabilidade sócio-econômica, menor índice educacional e proveniente de bairros com menor índice de desenvolvimento humano.

O teste sorológico desenvolvido é prático, rápido e capaz de ser aplicado para vários animais. Embora atualmente o seu custo seja inacessível, pode ser uma importante ferramenta para ser implantada pelas Unidades de Vigilância em Zoonoses municipais e Secretarias de Saúde Estaduais, frente às populações felinas acometidas pela doença, para estabelecer um diagnóstico precoce, protocolos terapêuticos nos animais doentes e mitigar a ocorrência da doença em humanos e sua disseminação.

A esporotricose é uma micose negligenciada no Brasil e seu tratamento um desafio devido a poucas alternativas terapêuticas, ao alto custo da medicação, ao tempo de tratamento prolongado e a necessidade de associações de fármacos, como demonstrado no presente estudo, o que traduz-se no alto índice de abandono terapêutico observado.

O desenvolvimento de antifúngicos que sejam eficazes em protocolos de administração na forma de pulsoterapia, por vias alternativas, com redução na frequência de reações adversas e menor custo, poderia viabilizar o tratamento da esporotricose felina e o envolvimento do poder público na sua instituição.

REFERÊNCIAS

Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MA, et al. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*. 2015; 53: 3–14.

Conti Diaz IA. La esporotricosis en el Uruguay. Aspectos epidemiológicos y clínicos. *An Fac Med Univ Repub Montev Urug*. 1981; 4(2):137-46.

Dooley DP, Bostic PS, Beckius ML. Spook house sporotrichosis: a point-source outbreak of sporotrichosis associated with hay bale props in a Halloween haunted house. *Archives of internal medicine*. 1997; 157(16): 1885-1887.

Farias MR, Franco SRVS and Fabris VE. Clinical, cytopathological and histopathological evaluation of sporotrichosis in experimentally infected cats. *World Congress of Veterinary Dermatology, Viena*. *Vet Dermat* 2004;15: 47.

Feeney KT, et al. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. *Emerging infectious diseases*. 2007; 13(8):1228.

Giguère S. Antifungal chemotherapy. In: Giguère S, Prescott JF and Dowling PM (ed), *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 5rd ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2013, pp 333-355.

Gremião IDF, Menezes RC, Schubach TMP, et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Med Mycology* 2015; 53: 15-21.

Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS Pathog*. 2017; 19, 1-7.

Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira SA, et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J*. 2011; 89: 346-351.

Helm MAF, Berman C. The clinical, therapeutic and epidemiological features of the sporotrichosis infection on the mines. Proceedings of the Transvaal Mine Medical Officers Association Symposium on Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand (Johannesburg), South Africa. 1947; p. 59-67.

Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, et al. Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. J Feline Med Surg 2013; 15: 619-623.

Lopes JO, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop. 1999; 32(5): 541-5.

Lutz A, Splendore A. On a mycosis observed in men and mice: Contribution to the knowledge of the so-called sporotrichosis. Revista Médica de São Paulo. 1907; 21: 443-50.

Macêdo-Sales PA, Souto SRLS, Destefani CA, Lucena RP, et al. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. BMC Vet Research. 2018; 14 (19): 2-10.

Madrid IM, Mattei A, Martins A, et al. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. Zoonoses Public Health. 2010; 57: 151-154.

Miranda LHM, Silva JN, Gremião IDF, Menezes RC, Almeida-Paes R, Reis E G, Oliveira RVC, Araújo DSA, Ferreiro L, Pereira SA. Monitoring fungal burden and viability of *Sporothrix* spp. in skin lesions of cats for predicting antifungal treatment response. Journal of Fungi. 2018; 92: 1-11.

Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, et al. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. BMC Vet Research. 2014; 10: 1-10.

Pereira SA, Menezes RC, Gremião IDF, Silva JN, Honse CO, Figueiredo FB, Silva DT, Kitada AAB, Reis EG, Schubach TMP. Sensitivity of cytopathological examination in the diagnosis of feline sporotrichosis. *J Feline Med Surg* 2011; 13, 220-223.

Pereira SA, Passos SRL, Silva JN, et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Record* 2010; 166: 290-294.

Queiroz-Telles F, Fahal AH, Falci DR, et al. Neglected endemic mycoses. *The Lancet*. 2017; 24: 1-11.

Reis EG, Schubach TMP, Pereira SA, et al. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. *Med Mycology*. 2016; 54: 684-690.

Rodrigues AM, de Hoog GS and de Camargo ZP. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal-animal transmission. *PLOS Pathog* 2016; 14: 1-7.

Schubach TMP, Menezes RC and Wanke B. Sporotrichosis In: Greene CE (ed), *Infectious Diseases of the dog and cat*. 4rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2012, pp 645-650.

Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T, Barros MBL, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *JAVMA*. 2004; 224: 1623-1629.

Silva MBT, et al. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2012; 28:1867-1880.

Souza EW, Borba CM, Pereira SA, Gremião IDF et al. Clinical features, fungal load, coinfections, histological skin changes, and itraconazole treatment

response of cats with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*.
Scientific Reports. 2018; 8: 1-10.

ANEXO 1 – Parecer de aprovação do CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 24 de maio de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01219 – 3ª versão

TÍTULO DO PROJETO: *DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DA ESPOROTRICOSE EM GATOS DOMÉSTICOS DE CURITIBA E REGIÃO METROPOLITANA*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

MARCONI RODRIGUES FARIAS

EQUIPE DE PESQUISA

Karina Francini Braga, Marcia Dal Magro

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	Agosto/2017 a Agosto/2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	Não se aplica
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Felis catus domesticus</i>	Nº SISBIO <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
SEXO	Não se aplica	ATIVIDADES <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica
IDADE / PESO	Não se aplica	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS <small>(de vida livre)</small>	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	CVE / UVZ	LOCAL (IS) <small>(Somente animais de vida livre)</small>	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 8.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA sendo **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança de protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador – CEUA PUCPR

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br