

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

***S. schenckii, S. luriei, S. brasiliensis e S. albicans:*  
SUSCETIBILIDADE A AGENTES ANTIFÚNGICOS  
COMBINADOS E CARACTERIZAÇÃO DE PERFIL  
ENZIMÁTICO**

**TESE DE DOUTORADO**

**Daniele Carvalho de Oliveira**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

*S. schenckii, S. luriei, S. brasiliensis e S. albicans:*  
**SUSCETIBILIDADE A AGENTES ANTIFÚNGICOS  
COMBINADOS E CARACTERIZAÇÃO DE PERFIL  
ENZIMÁTICO**

**Daniele Carvalho de Oliveira**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em  
Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),  
como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Doutora em Farmacologia**

**Orientador: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2012**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Oliveira, Daniele Carvalho de  
S. schenckii, S. luriei, S. brasiliensis e S.  
albicans: suscetibilidade a agentes antifúngicos  
combinados e caracterização de perfil enzimático /  
Daniele Carvalho de Oliveira.-2012.  
84 p. ; 30cm

Orientador: Sydney Hartz Alves  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia, RS, 2012

1. Identificação das novas espécies do Complexo  
Sporothrix schenckii 2. Suscetibilidade 3. Perfil  
enzimático I. Alves, Sydney Hartz II. Título.

---

© 2012

Todos os direitos autorais reservados a Daniele Carvalho de Oliveira. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: daniele\_caroli@yahoo.com.br

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Tese de Doutorado**

***S. schenckii*, *S. luriei*, *S. brasiliensis* e *S. albicans*: SUSCETIBILIDADE A  
AGENTES ANTIFÚNGICOS COMBINADOS E CARACTERIZAÇÃO  
DE PERFIL ENZIMÁTICO**

elaborada por  
**Daniele Carvalho de Oliveira**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Sydney Hartz Alves, Dr.**  
(Presidente/Orientador)

**Cleci Menezes Moreira, Dr.<sup>a</sup> (UNIPAMPA)**

**Daniela Isabel Brayer Pereira, Dr.<sup>a</sup> (UFPel)**

**Clarice Madalena Bueno Rolim, Dr.<sup>a</sup> (UFSM)**

**Janio Morais Santurio, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 06 de agosto de 2012.

Dedico esta tese à minha filha Flávia,  
que nasceu e cresceu durante a realização deste trabalho  
e que veio completar uma história de muita felicidade,  
trazendo-nos o maior amor do mundo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e *Ieschouah* por guiarem meus passos e jamais me abandonarem.

A minha mãe e meu pai (*in memoriam*), por terem me criado com muito amor e carinho, ensinando-me, com simplicidade, grandes valores da vida: amor, respeito e honestidade... Pai, sei que também está vibrando comigo esta vitória. Mãe, obrigada por acreditar em mim e estar sempre ao meu lado, por me dar oportunidades e principalmente força para que realizasse meus sonhos. AMO VOCÊS!!!

Ao meu irmão Gilson, pelo exemplo de humanidade, caráter e incentivos. A minha irmã Medianeira, por fazer parte de felizes recordações da infância e pelo apoio. A minha irmã Mirian pela força, carinho e incentivos sempre. A vocês queridos irmãos, meus torcedores fiéis, muito obrigada pelo exemplo e amor dedicado.

Ao meu amado Flávio, por teu amor, força e por fazer a minha vida tão feliz e completa. Teu carinho, compreensão e dedicação foram essenciais nesta conquista.

A minha Flavinha, razão maior do meu viver, pela felicidade que irradia e que preenche nossas vidas de amor e alegria.

Ao professor Sydney, pelos ensinamentos, mas principalmente pela oportunidade, confiança e amizade. Sempre serei grata pelo apoio, conhecimentos e valiosos conselhos.

Aos colegas do LAPEMI, que proporcionaram um ambiente acolhedor e feliz. Sou grato pela ajuda e presteza que sempre recebi de todos.

Ao Érico por me apresentar ao mundo da Micologia. Amigo fiel e de todas as horas, muito obrigada.

Aos bolsistas e estagiários: Caroline, Felipe, Louise, Luana, Débora, Camila e Laura pela incansável ajuda.

À Isabel, ao Paulo Guilherme, Régis e Alex pela ajuda nas mais diversas áreas, e pela amizade.

À Sandra, nossa técnica querida, obrigada pelas conversas, amizade e carinho.

À minha comadre Roberta, irmã de coração e de muitas vidas. Obrigada pela amizade sincera.

Agradeço aos chefes e colegas do HGuSM pela amizade, apoio e compreensão em todos estes anos de convívio.

À Universidade Federal de Santa Maria por todos estes anos de ensino público, gratuito e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela oportunidade, pelo ensino e pelo acolhimento. Ao coordenador do curso Prof. Carlos Mello e demais professores pelos ensinamentos, amizade e incansável ajuda.

Enfim, minha imensa gratidão a todos aqueles que de alguma forma interferiram positivamente para que este trabalho pudesse ser concretizado.

“Nascemos e vivemos para sermos  
e estarmos felizes sempre!”

Nelson Real Júnior

"A felicidade não depende do que nos falta, mas  
do bom uso que fazemos do que temos."

Thomas Hardy

## RESUMO

Tese de Doutorado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

*S. schenckii*, *S. luriei*, *S. brasiliensis* e *S. albicans*:  
**SUSCETIBILIDADE A AGENTES ANTIFÚNGICOS COMBINADOS  
E CARACTERIZAÇÃO DE PERFIL ENZIMÁTICO**

Autora: Daniele Carvalho de Oliveira

Orientador: Dr. Sydney Hartz Alves

Data e local da defesa: Santa Maria, 06 de agosto de 2012.

Recentemente foi proposto que *Sporothrix schenckii* é um complexo que engloba seis espécies, o que exige a reavaliação das características laboratoriais inerentes à suscetibilidade e à virulência desse complexo fúngico. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* de 40 isolados de *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, *S. luriei* e *S. schenckii* à terbinafina (TER) em combinação com itraconazol (ITZ), cetoconazol (CTZ) e voriconazol (VRC), bem como investigar o perfil enzimático destas novas espécies. Os isolados são oriundos de esporotricose em humanos (18 da forma cutânea fixa e 13 isolados da forma linfocutânea), de felinos (n = 8) e de canino (n = 1), tendo sido previamente identificados por testes fenotípicos e moleculares. A avaliação da suscetibilidade foi realizada com base no protocolo M38-A2 (CLSI) e a atividade enzimática foi determinada através do Sistema API-ZYM<sup>®</sup> (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, França). Na avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos combinados, a interação sinérgica só foi verificada pela associação TRB+ITZ, ocorrendo somente frente a um isolado da espécie *S. schenckii*; a mesma combinação evidenciou efeito aditivo frente a 14 (35%) isolados. Já as combinações TRB+CTZ e TRB+VRC apresentaram efeito aditivo para 11 [27,535%] e 1 [2,5%] isolados, respectivamente. Todas as demais combinações evidenciaram interações indiferentes. Em relação ao perfil enzimático, as enzimas esterase, lipase esterase, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-phosphohidrolase e  $\beta$ -glucosidase foram caracterizadas em 85 - 97,5% dos isolados estudados. A enzima lipase só foi detectada em *S. brasiliensis* enquanto que a leucino-amilamidase somente ocorreu em *S. albicans*. a ausência de naftol-as-bi-phosphohidrolase só ocorreu em *S. luriei*. Os 37 isolados identificados como *S. schenckii* manifestaram variações enzimáticas que permitiram agrupar estes isolados em 15 diferentes biotipos. O estudo do perfil enzimático em espécies recentemente identificadas é importante, pois, vem contribuir com a compreensão da virulência, suscetibilidade e, sobretudo, pode oportunizar novas possibilidades para identificar, separar e classificar fenotipicamente as novas espécies de agentes da esporotricose.

**Palavras-chaves:** *Sporothrix* spp; suscetibilidade; associações; perfil enzimático; virulência.



## ABSTRACT

Thesis of Doctor's Degree  
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### ***S. schenckii*, *S. luriei*, *S. brasiliensis* e *S. albicans*: SUSCEPTIBILITIES TO COMBINATORIAL ANTIFUNGAL AGENTS AND CHARACTERIZATION OF ENZYMATIC PROFILES**

Author: Daniele Carvalho de Oliveira

Adviser: Dr. Sydney Hartz Alves

Date and Place of Defence: Santa Maria, August 6, 2012.

Recently was proposed that *Sporothrix schenckii* is a complex encompassing six cryptic species, which calls for the reassessment of laboratory characteristics inherent susceptibility and virulence of this fungi complex. In these contexts, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, *S. luriei* and *S. schenckii* to terbinafine in combination with itraconazole, ketoconazole and voriconazole as well as the correlation of enzymatic profile with the new species. The isolates (n=40) were from cases of human (18 isolates from cases of fixed cutaneous sporotrichosis and 13 isolates from cases of lymphocutaneous sporotrichosis), feline (n = 8) and canine (n=1) sporotrichosis and were previously identified by phenotypic and molecular tests. The assessment of the susceptibility was performed based on the protocol M38-A2 and the enzymatic activity was determined using the commercial kit API-ZYM System (BioMérieux, Marcy- l'Etoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. In assessing the susceptibility, synergism was observed in only one isolate (2,5%) of the association of TRB+CTZ; addition, in the 11 (27,5%) strain tested for TRB+CTZ; in TRB+ITZ 14 (35%) of isolates and in TRB+VRC. Most interactions were indifferent. The *Sporothrix schenckii* Complex had different positive results for each of the new species tested. Enzymes such as esterase, esterase lipase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and  $\beta$ -glucosidase were recorded as positive reaction in 85 – 97,5% of strains. Among the different enzymatic profiles obtained, there was unique and very peculiar to the new specimens, the positive it was observed that positive reactions for lipase and leucine arilamidase were documented only for *S. brasiliensis* and *S. albicans*, respectively. Furthermore, only *S. luriei* species was recorded as negative reaction for naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. Furthmore, only *S. luriei* obtained negative result for naphthol-AS-BI-phosphohydrolase. The 37 isolated of *S. schenckii* were tested featured in 15 different biotypes. The variability enzyme found may contributes to a better understanding to the differences in virulence and resistance among species of the genus *Sporothrix*, and may possibility a new phenotypic basis for separating and classify the new specie, as well as providing a review of clinical and epidemiological data of sporotrichosis.

**Keywords:** *Sporothrix* spp, enzyme, profile, synergism, antifungal association

**PPGFARM//UFSM, RS**

**OLIVEIRA, Daniele Carvalho de**

**Doutora 2012**

## LISTA DE REDUÇÕES

°C	Graus Celsius
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
AG	$\alpha$ -glucosidase
AM	$\alpha$ -mannosidase.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BG	$\beta$ -glucosidase
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTZ	Cetoconazol
DHN	1,8-dihidroxi-naftaleno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ES	Esterase
EUA	Estados Unidos da América
FA	Fosfatase ácida
FC	Fosfatase alcalina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GMS	Sais de prata
H & E	Hematoxilina e eosina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IGg	Imunoglobulina G
IK	Iodeto de potássio
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITZ	Itraconazol
kDa	Kilodalton
KOH	Idróxido de potássio

LA	Leucino arilamidase
LAPEMI	Laboratório de Pesquisas Micológicas
LE	Lipase esterase
LP	Lipase
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NF	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase
NG	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase
NJ	Neighbor-Joining
PAS	Ácido periódico de Schiff
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
PV	Protease virais
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TER	Terbinafina
VRZ	Voriconazol

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Caracterização fenotípica das espécies do Complexo <i>Sporothrix schenckii</i> .....	18
Quadro 2 - Quadro de leitura do kit API ZYM® .....	40

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo geral.....	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
3.1 Histórico .....	15
3.2 Agente etiológico .....	16
3.2.1 Características morfológicas .....	16
3.2.2 Características fisiológicas .....	17
3.3 Epidemiologia da esporotricose.....	18
3.3.1 Distribuição geográfica.....	19
3.3.2 Distribuição por sexo e idade .....	20
3.3.3 Transmissão e contaminação .....	20
3.3.4 Transmissão zoonótica .....	21
3.4 Patogênese e formas clínicas.....	22
3.4.1 Esporotricose no homem .....	22
3.4.2 Esporotricose em animais.....	24
3.4.3. Diagnóstico da esporotricose.....	25
3.5 Agentes antifúngicos e mecanismo de ação .....	27
3.6 Tratamento da esporotricose.....	29
3.7 Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos .....	30
3.8 Associações antifúngicas .....	33
3.8.1 Combinações com terbinafina e azólicos .....	33
3.9 Virulência .....	34
3.9.1 Termotolerância.....	34
3.9.2 Melanina .....	35
3.9.3 Proteínas relacionadas com a virulência.....	36
3.9.3.1 Parede celular .....	36
3.9.3.2 Adesão .....	37
3.9.3.3 Peróxido de ergosterol .....	38
3.9.3.4 Proteinases extracelulares.....	39
3.10 API ZYM – Sistema de detecção de atividade enzimática.....	39
3.11 Análise molecular .....	41
3.11.1 Filogenia Molecular.....	41
3.11.2 Método de reconstrução filogenética .....	42
3.11.3 Marcador genético .....	43
<b>4 ARTIGOS</b> .....	<b>45</b>
4.1 Artigo 1: Antifungal susceptibilities of <i>Sporothrix albicans</i> , <i>S. brasiliensis</i> , and s. complex identified in Brazil.....	45
4.2 Artigo 2: <i>Sporothrix schenckii</i> , <i>S. luriei</i> , <i>S. brasiliensis</i> and <i>S. albicans</i> : susceptibilities to combinatorial antifungal agents and characterization of enzymatic profiles .....	47
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>66</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>67</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Sporothrix* apresentam-se como fungos dimórficos, capazes de crescer como micro-organismos saprófitas em temperatura ambiente e na forma de levedura a 37°C, em meios enriquecidos e em tecidos parasitados (HEKTOEN; PERKINS, 1900). Agente etiológico da esporotricose, o *Sporothrix spp* acomete tanto o homem quanto uma grande variedade de animais e apresenta-se distribuído mundialmente, com maior frequência nos países tropicais, sendo a micose subcutânea mais frequente no Brasil (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006; RIVITTI; AOKI, 1999).

No homem, a esporotricose apresenta uma grande variedade de manifestações clínicas que vão desde lesões cutâneas e muco-cutâneas até manifestações extracutâneas. As lesões cutâneas são as mais frequentes e geralmente se apresentam na forma de nódulos que ulceram seguindo a trajetória de um tronco linfático (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). As apresentações extracutâneas, consideradas as formas mais graves da doença, podem envolver lesões ósseas, articulares, pulmonares e no sistema nervoso central (SILVA-VERGARA et al., 2005).

Os mecanismos bioquímicos de defesa do fungo, sobretudo a presença da melanina e a possível diferença na expressão enzimática, refletem-se na virulência e suscetibilidade aos tratamentos (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996). A virulência do Complexo *Sporothrix schenckii* está associada aos componentes de sua parede celular, como proteínas e glicoproteínas, dentre as quais galactomana e ramnomanana se destacam como principais polissacarídeos (TRAVASSOS, 1989). A secreção de enzimas por micro-organismos também é considerada um fator importante na invasão tecidual, contribuindo para a patogenicidade do fungo, além de se manifestar um potencial para auxiliar na identificação fenotípica de diferentes espécies (DE BERNARDIS et al., 1999).

O itraconazol tem sido recomendado para tratamento das formas linfocutâneas da esporotricose. Para as formas mais graves ou insucesso terapêutico com itraconazol recomenda-se a administração de anfotericina B. Apesar da atividade destes agentes antifúngicos, o longo período de tempo requerido com o itraconazol e a nefrotoxicidade associada à anfotericina B são algumas das limitações da atual antifungoterapia que evidenciam a necessidade de se disponibilizar novas alternativas para tratamento (KAUFFMAN et al., 2007; TRILLES et al., 2005). Os registros de esporotricose disseminada

em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) também justificam a busca por novos esquemas terapêuticos (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001). A combinação de antifúngicos pode manifestar sinergismo, trazendo como vantagens: a) redução da toxicidade pela administração de doses mais baixas; b) redução do tempo à resposta ao tratamento; c) redução do tempo de hospitalização; d) aumento do espectro de ação além da redução da aquisição de resistência aos antimicrobianos (JOHNSON et al., 2004).

Recentemente, estudos e moleculares serviram como base para reavaliar a identidade do *Sporothrix schenckii* que a partir de então, passou a ser considerado como “Complexo *Sporothrix schenckii*”, definido com a identificação de cinco novas espécies: *S. albicans*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (MARIMON et al., 2007). Esses achados confirmam investigações moleculares anteriores que constataram uma grande variabilidade intraespecífica principalmente associada à origem geográfica desses isolados clínicos (MARIMON et al., 2006; WATANABE et al., 2004).

Neste contexto, é pertinente o aprofundamento de estudos abordando as novas espécies de *Sporothrix*, notadamente nos aspectos relativos à suscetibilidade aos antifúngicos, suscetibilidade às combinações de fármacos e reconhecimento das diferenças entre os perfis enzimáticos destas espécies, com vistas ao reconhecimento de seu papel na virulência e/ou como marcador fenotípico para a rápida identificação destas espécies.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O presente estudo teve como objetivo identificar fenotípica e genotipicamente as novas espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, investigando-se também sua suscetibilidade aos antifúngicos e perfil enzimático.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar, fenotípica e genotipicamente, 40 isolados previamente caracterizados como *Sporothrix schenckii*, para reconhecimento das novas espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*.

- Avaliar a suscetibilidade, *in vitro*, das novas espécies de *Sporothrix* spp, frente ao cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, miconazol, terbinafina, caspofungina e anfotericina B.

- Avaliar as interações das combinações: itraconazol + terbinafina, cetoconazol + terbinafina e voriconazol + terbinafina.

- Relacionar a suscetibilidade das associações antifúngicas testadas às novas espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

- Avaliar, fenotipicamente, o perfil enzimático dos 40 isolados de *Sporothrix* spp, buscando-se evidenciar identidade entre enzimas e as novas espécies.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Histórico

O primeiro caso de esporotricose foi relatado em 1898 por Benjamin Schenck no *Johns Hopkins Hospital* em Baltimore nos Estados Unidos da América, onde o então estudante de Medicina documentou a doença com descrição clínica minuciosa (SCHENCK, 1898). Após avaliar o possível agente etiológico de uma infecção que acometia um paciente de 36 anos com múltiplos nódulos ulcerativos ascendentes no braço, o estudante encaminhou o patógeno ao fitopatologista Erwin F. Smith que o identificou como uma espécie do gênero *Sporotrichum*. Dois anos mais tarde o segundo caso foi relatado por Hektoen e Perkins em Chicago, EUA, envolvendo um menino de cinco anos com ferimento no dedo causado por martelo. Após o isolamento do fungo, estes autores verificaram que se tratava do mesmo agente descrito por Schenck, porém, eles adotaram uma nova nomenclatura, *Sporothrix schenckii* (HECKTOEN; PERKINS, 1900).

Durante os primeiros anos do século XX, a esporotricose era uma doença comum na França. Em 1903, foi publicado o primeiro caso de esporotricose na Europa, em Paris, em um paciente francês com múltiplos abscessos subcutâneos. Este organismo foi identificado como *Sporothrix* e foi nominado *Sporotrichum beurmanni* por Matruchot e Ramond. Nos 10 anos seguintes, De Buermann e Gourgeot (apud BARROS et al., 2001) relataram mais de 200 casos de esporotricose na França, descrevendo tanto formas cutâneas, extracutâneas e disseminadas da doença.

Em 1927, foi reportado um surto envolvendo 14 mineiros em Witwatersrand, cidade próxima a Johannesburgo, África do Sul. Após este episódio, entre 1941 e 1944, no mesmo local registrou-se o maior surto epidêmico de esporotricose pulmonar já documentado envolvendo cerca de 3000 mineiros. O reservatório para o crescimento saprofítico do fungo foi identificado nas madeiras das estruturas de sustentação de uma mina de ouro (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

No Brasil, o primeiro relato de esporotricose ocorreu em 1907 quando o patógeno foi isolado da mucosa oral de ratos (LUTZ; SPLENDORE, 1907). No ano seguinte, Splendore (apud LACAZ et al., 2002) estudando a doença em uma mulher com lesões faciais, descreveu

uma estrutura radiada ao redor das células leveduriformes do fungo chamando-a de “corpo asteroide” o qual se tornou útil na identificação do micro-organismo.

### 3.2 Agente etiológico

O *Sporothrix schenckii* é o agente etiológico da esporotricose. É um fungo dimórfico térmico encontrado na forma filamentosa na natureza (25°C) e, *in vitro*, quando incubado entre 19 °C e 30 °C. Converte-se à forma leveduriforme após inoculação no hospedeiro, durante o processo infeccioso (37°C), ou quando cultivado a 37°C em meio de cultura apropriado (HECKTOEN; PERKINS, 1900).

Nos últimos anos, vários estudos moleculares têm sido realizados envolvendo isolados identificados morfológicamente como de *Sporothrix schenckii* provenientes de diferentes regiões geográficas (MARIMON et al., 2006; ZHANG et al., 2006). Estas investigações demonstraram uma alta diversidade genética deste gênero e a existência de várias linhagens filogenéticas, o que determinou o entendimento de que *S. schenckii* é um complexo fúngico formado por *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. albicans* e *S. luriei* (MARIMON et al., 2007, 2008; OLIVEIRA et al., 2011). A comprovação da existência das cinco novas espécies do gênero *Sporothrix* nos traz a necessidade de reavaliar estudos já realizados e reconsiderar informações que possam ser relevantes. Esse complexo fúngico com suas variações intraespecíficas pode ser a explicação para as diferenças de suscetibilidade e de virulência observadas nos casos de esporotricose (MARIMON et al., 2007, 2008; OLIVEIRA et al., 2011).

#### 3.2.1 Características morfológicas

Segundo a classificação taxonômica, o gênero *Sporothrix* pertence ao reino Fungi, divisão *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophiostomatales* e família *Ophiostomataceae* (GUARRO; GENE; STCHIGEL, 1999).

A fase miceliana do fungo é caracterizada pela presença de hifas hialinas de 1-2 µm de diâmetro, delgadas, ramificadas e septadas, a partir das quais se desenvolvem conidióforos em

ângulo reto, em cujo ápice dispõe-se uma vesícula com denticulos simpodiais e em cada denticulo nasce um conídio que juntos assumem um aspecto floral, lembrando uma margarida (DE HOOG et al., 2000). Os conídeos medem aproximadamente de 2 a 4 µm de comprimento e 2 µm de diâmetro e podem ser hialinos, em forma de lágrima e ou apresentar formas variadas (globosos, subglobosos, ovais, triangulares e irregulares) (DE HOOG et al., 2000). Em meios de cultura utilizados na rotina clínica como ágar Sabouraud e ágar batata, incubados a temperatura ambiente, é possível o desenvolvimento de colônias úmidas de aspecto coriáceas, com sulcos e dobras na superfície. No início do crescimento as colônias são brancas e cremosas e com o envelhecimento podem apresentar coloração marrom a negra quando produtoras de melanina (DE HOOG; VITALE, 2007).

A fase leveduriforme do fungo encontrada nos tecidos parasitados é caracterizada por revelar microscopicamente pequenas células ovais ou alongadas em forma de charuto medindo 1,5-2 x 7-9 µm, a morfologia revela blastoconídios que se coram positivamente pelo Gram, alguns apresentando brotamentos múltiplos. Nesta forma as colônias apresentam-se brancas e cremosas, semelhantes a outros fungos leveduriformes em meios de culturas sólidas tradicionais. *In vitro*, à temperatura de 37°C esta fase pode ser encontrada depois de diversos repiques do fungo em meios enriquecidos como ágar *Brain Heart Infusion* (BHI) (TORRES-RODRÍGUEZ et al., 1993).

### 3.2.2 Características fisiológicas

A avaliação microscópica das estruturas morfológicas é a técnica comumente usada para a identificação de fungos filamentosos; todavia evidencia limitações até nas mãos de especialistas. Para contribuir na identificação fúngica, características fisiológicas do fungo, como termotolerância, capacidade fermentativa ou de assimilação de diferentes carboidratos, compostos nitrogenados e outras moléculas, têm revelado de valor diagnóstico (STEADHAM; GEIS; SIMMANK, 1986). Vários carboidratos podem ser assimilados pelo *Sporothrix* spp como a glicose, frutose, manose e celobiose (MARIMON et al., 2008).

Poucos estudos abordaram a caracterização fisiológica do gênero *Sporothrix* (GHOSH et al., 2002; DE HOOG et al., 2000). O quadro 1 apresenta estas características (MARIMON et al. 2007).

Espécies	Halo > 50mm / 21 dias / 30°C.	Assimilação da sacarose	Assimilação da rafinose	Crescimento a 37°C
<i>S. brasiliensis</i>	-	-	-	+
<i>S. schenckii</i>	-	+	+	+
<i>S. globosa</i>	-	+	-	-
<i>S. mexicana</i>	+	+	+	+
<i>S. albicans</i>	+	+	-	+

Quadro 1 - Caracterização fenotípica das espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*

Fonte: Marimon et al. (2007)

Diferenças fisiológicas entre as novas de *Sporothrix* spp já foram reportadas. Na fase filamentosa, o fungo pode ter bom crescimento em pH variável entre 3,0 a 11,5 enquanto que na fase leveduriforme cresce em pH entre 3,0 e 8,8 (GHOSH et al., 2002). Em geral, a melhor temperatura para *Sporothrix* spp crescer é entre 30 e 37 °C; a temperatura de 40 °C seu crescimento começa a ser impedido (GHOSH et al., 2002; MARIMON et al., 2007).

### 3.3 Epidemiologia da esporotricose

A história natural da esporotricose vem mudando gradualmente em relação à frequência, modo de transmissão e distribuições geográfica e demográfica. Fatores ambientais, aumento na urbanização, melhor diagnóstico, podem contribuir para explicar as alterações no perfil da doença. Além disso, a esporotricose não é uma doença constantemente relatada em muitos países, existindo poucas informações sobre a sua incidência e a maioria dos casos é descrito apenas nos relatos de casos publicados (BARROS et al., 2001).

### 3.3.1 Distribuição geográfica

No início do século passado, a esporotricose era comum na França, mas atualmente a doença aparece esporadicamente na Europa (CRISEO; ZUNGRI; ROMEO, 2008; MAGAND et al., 2009). A doença embora de distribuição geográfica mundial, tem a maioria dos casos reportada em zonas tropicais ou subtropicais. Embora seja uma doença cosmopolita, é possível observar que, mesmo dentro de áreas endêmicas, sua incidência e distribuição não são homogêneas (FREITAS et al., 2011; RIVITTI; AOKI, 1999).

A esporotricose tem sido relatada como a mais frequente micose subcutânea no México. Apresenta-se como doença endêmica no Brasil, Uruguai e África do Sul, sendo também registradas em regiões altamente endêmicas na Guatemala e Peru (CASTREJON; ROBLES; ZUBIETA ARROYO, 1995; CUADROS; VIDOTTO; BRUATTO, 1990; KUSUHARA; HACHISUKA; SASAI, 1990; MAYORGA et al., 1978).

No Peru, existe uma área hiperendêmica ao sul das montanhas andinas, com uma incidência anual estimada em 48 a 60 casos de esporotricose por 100.000 habitantes em Abancay (PAPPAS et al., 2000). No Japão, desde o final da Segunda Guerra Mundial, os casos vêm aumentando gradualmente: de 22 casos entre 1918 e 1939 passou para mais de 500 no período entre 1945 e 1968 (URABE; HONBO, 1986). Nos Estados Unidos havia menos de 200 casos de esporotricose relatados até 1932; a partir de então, a incidência aumentou chegando-se à estimativa de 100 pacientes internados com esporotricose sistêmica (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Na Índia, o primeiro caso relatado foi em 1932, na região noroeste; de 1996 e 1997 foram diagnosticados 25 casos em Himachal Pradesh, na região nordeste a qual, atualmente, apresenta focos endêmicos (GHOSH et al., 1999).

No Brasil, entre os anos de 1945 e 1954 no Hospital de Clínicas de São Paulo, foram diagnosticados 104 casos de esporotricose. Esta incidência representou 0,5% de todas as dermatoses do período. Também em São Paulo, em Botucatu, houve o registro de 53 casos da doença entre 1976 e 1995 (MARQUES et al., 1997). A emergência de uma epidemia no estado do Rio de Janeiro promoveu uma nova dinâmica à doença, modificando o perfil epidemiológico no Brasil (BARROS et al., 2001).

### 3.3.2 Distribuição por sexo e idade

A esporotricose continua sendo a mais frequente micose subcutânea humana no Rio Grande do Sul, apesar de ter havido uma diminuição da incidência nas últimas décadas. Houve uma redução progressiva no acometimento de mulheres e, conseqüentemente, aumento da proporção de casos masculinos; esta variação foi atribuída à entrada das mulheres no mercado de trabalho urbano e à diminuição de suas atividades em jardinagem e horticultura (LOPES JORGES et al., 1999).

Uma análise retrospectiva dos casos de esporotricose registrados no Complexo Hospitalar Santa Casa de Misericórdia, na cidade de Porto Alegre, relatou 304 casos num período de 35 anos (1967 a 2002). Neste estudo, a exposição ao risco ocupacional para infecção foi 13 vezes maior no sexo masculino do que no sexo feminino. Observou-se que a maioria afetada era de homens (68,4%) acima dos 12 anos de idade (88,8%). A maioria dos pacientes (74,3%) foi relacionada como pertencentes às categorias de riscos ocupacionais tradicionalmente associadas a esta micose, como fazendeiros, apicultores, carpinteiros, jardineiros, atividades de caça e pesca ou floricultura. A distribuição dos casos avaliados quanto à procedência foi: 72% da região metropolitana de Porto Alegre, 6,5% da região sudeste do estado, 6,2% da região noroeste, 6,2% da região centro-oeste, 4,2% da região nordeste, 3,2% da região sudeste e 1,3% da região centro-oeste. Na região central do estado do Rio Grande do Sul entre 1988 e 1997 foram observados apenas 31 casos de esporotricose registrados no Hospital Universitário de Santa Maria. Na mesma cidade, um estudo retrospectivo realizado entre 1957 e 1997 registrou 342 casos de esporotricose em humanos (DA ROSA et al., 2005).

### 3.3.3 Transmissão e contaminação

O gênero *Sporothrix* é ubíquo na natureza, sendo encontrado no solo associado a material orgânico de plantas (espinhos, folhas secas e madeira), água, material orgânico em decomposição, entre outros locais. Atividades ocupacionais e de lazer, como manejo rural, agricultura, construção civil, mineração, caça, pesca e outros estão relacionados à maior predisposição à infecção (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA., 2006). Também a

jardinagem está fortemente ligada ao contágio da doença, por isto também conhecida como “Doença dos Jardineiros” devido aos diversos casos ligados ao cultivo de rosas (ENGLE; DESIR; BERNSTEIN, 2007).

Na Guatemala, há registro de surtos epidêmicos relacionados à limpeza de pescado e no Uruguai e sul do Brasil, com a caça ao tatu-mulita (*Dasypus hybridus*) chegando até 88% dos casos (ALVES et al., 2010; GEZUELE; DA ROSA, 2005).

Há relatos de transmissão por mordidas ou arranhões de animais como gatos e esquilos, picadas de insetos e outros ferimentos. Estas condições podem resultar em uma inoculação direta ou como fator facilitador da entrada do fungo (BORREGO; MAYORGA; TARANGO-MARTINEZ, 2009; MILLER; KEELING, 2002). A contaminação pode também se dar pela manipulação de culturas de *Sporothrix* spp em laboratórios (COOPER; DIXON; SALKIN, 1992).

As epidemias por esporotricose são raras, e quando ocorrem, são comumente relacionadas a uma única fonte de infecção. O maior surto ocorreu em Witwatersrand na África do Sul, e sua descrição contribuiu significativamente para o conhecimento da esporotricose, representando até hoje, a mais completa investigação epidemiológica da doença. Em 1941 a 1944, mais de 3.000 trabalhadores foram infectados pelo fungo que estava presente nas madeiras usadas de escoras nos corredores de uma mina de ouro. Nos EUA, a maior epidemia ocorreu em 1988, envolvendo 15 estados que participaram de um programa de reflorestamento, quando 84 trabalhadores foram contaminados devido à exposição ao musgo *Sphagnum* usado para embalar as mudas em um viveiro na Pensilvânia (BARROS; PAES; SCHUBACH, 2011; DIXON; DUNCAN; HURD, 1992).

### 3.3.4 Transmissão zoonótica

A esporotricose humana tem sido esporadicamente associada com mordidas e arranhões de animais (KAUFFMAN, 1999). Desde 1980, a transmissão dessa micose por felinos ganhou atenção, quando pesquisadores relataram um surto envolvendo cinco pessoas expostas a gatos com esporotricose (DUNSTAN et al., 1986; READ; SPERLING, 1982; SCHUBACH et al., 2004).

A maior epidemia de esporotricose já registrada, devido à transmissão zoonótica foi descrita no Rio de Janeiro, entre 1998 e 2004. Apenas no Instituto de Pesquisa Clínica



Evandro Chagas (IPEC) ligado à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 1503 casos de esporotricose foram diagnosticados em gatos, 64 em cães e 759 em humanos. As pessoas mais comumente afetadas nesse surto foram donas de casa que cuidavam de gatos infectados (BARROS et al., 2001). Um estudo realizado entre 1998 e 2001 relatou que dos 178 de casos da doença, 156 eram pacientes que referiram contato com gatos com esporotricose (BARROS et al., 2004). Desde então, donos de gatos e veterinários se caracterizaram como um novo grupo de risco para a aquisição da doença através destes animais contaminados (HIRANO et al., 2006; YEGNESWARAN et al., 2009).

Alguns autores acreditam que os gatos são animais com maior poder de transmissão zoonótica devido à grande quantidade de leveduras presentes nas lesões. Entretanto, cães também são afetados, mas não são considerados como infectantes potenciais aos seres humanos (SCHUBACH et al., 2003).

Nos últimos anos, no Rio Grande do Sul, verifica-se um aumento no número de casos de esporotricose em felinos no litoral sul do estado, particularmente no município de Rio Grande (NOBRE et al., 2002). Em todo país relata-se um aumento de esporotricose felina e decréscimos na esporotricose canina, possivelmente pela menor gravidade da doença em cães e pela semelhança com outras doenças. Estes dados reforçam a característica zoonótica desta micose e atentam para o risco de transmissão para humanos através de arranhaduras e mordeduras por gatos com e esporotricose e mesmo por gatos hígidos, visto que o felino doméstico carrega o agente em suas unhas e cavidade oral e suas lesões têm exuberância de células leveduriformes (SCHUBACH et al., 2005).

### **3.4 Patogênese e formas clínicas**

#### **3.4.1 Esporotricose no homem**

A esporotricose em humanos pode apresentar distintas formas com diferente evolução clínica, de acordo com o estado imunológico do hospedeiro, quantidade de inóculo e virulência do fungo, classificando-se inicialmente em cutâneas e extracutâneas. As formas cutâneas são classificadas em fixa, linfocutânea ou disseminada. Também podem ser consideradas situações em que há comprometimento de mucosas tais como a conjuntiva

ocular e mucosa nasal. Nas manifestações extracutâneas da micose são incluídos casos como esporotricose pulmonar, osteoarticular, meníngea ou sistêmica (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

A esporotricose cutânea fixa aparece como lesão única permanecendo restrita ao local de infecção. Não há migração da lesão pelo trajeto linfático contíguo à área afetada. São normalmente pápulas eritematosas ou placas que podem tornar-se ulceradas ou verrucosas. Não tendem à regressão espontânea, por isto há relatos com até 26 anos de evolução. Localiza-se com maior frequência na face ou nos membros superiores com manifestações polimórficas que requerem diagnóstico diferencial com leishmaniose, cromomicose, blastomicose e piodermite vegetante. Representam em torno de 25% dos casos e são mais frequentes em áreas de alta endemicidade (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

A forma linfocutânea é a mais prevalente, representando 80% dos casos. Inicia com um nódulo ou uma lesão ulcerada no local da inoculação do fungo, que após um período de 25 a 30 dias de incubação, segue o trajeto linfático regional, contíguo à lesão inicial, formando novos nódulos que ulceram, fistulam e regridem. Estes sinais clínicos caracterizam a denominação desta forma como linfangite nodular ascendente (DONABEDIAN et al., 1994; SHAW et al., 1989).

A esporotricose pulmonar é uma condição primariamente relacionada com inalação de conídios ou, em alguns casos, consequência de disseminação hematogênica. Nos pacientes com a forma pulmonar crônica, os sinais e sintomas não são característicos e podem confundir-se com tuberculose pulmonar ou histoplasmose cavitária; exames radiológicos exibem lesões infiltrativas e nodulares localizadas nos ápices pulmonares e cavitação em 75% dos casos. O típico paciente é classificado como sendo homem (relação homem/mulher em 6:1), alcoolista ou diabético e com média de idade estimada em 46 anos (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). Três casos na literatura relatam esporotricose pulmonar acometendo pacientes infectados pelo vírus *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) (CALLENIS et al., 2006; GORI et al., 1997; LOSMAN; CAVANAUGH, 2004).

O envolvimento das articulações denota a forma osteoarticular da esporotricose com artrite, localizando-se na maioria das vezes nos joelhos, cotovelos, punhos e quadris. Mais da metade dos casos compromete apenas uma articulação podendo, na ausência de tratamento, afetar outras regiões. Produz, inicialmente, sinovites e tenossinovites, podendo, com a evolução do quadro, determinar alguns focos de osteomielites. Clinicamente manifesta-se por dor articular, limitações de movimento, tumefação e acúmulo de líquido sinovial na cavidade articular. A disseminação poliarticular acompanhada de lesões cutâneas múltiplas observa-se

em pacientes diabéticos, com linfomas, transplante de órgãos, tratamento com corticosteroides, sarcoidose e SIDA (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Além da SIDA, outras condições como diabetes, alcoolismo, doenças granulomatosas, cirrose, transplante renal, neoplasias, corticosteroides e usos de agentes imunossupressores são comumente relatados em pacientes com esporotricose extracutânea (FONSECA-REYES et al., 2007; GOTTLIEB et al., 2003; GULLBERG et al., 1987). Pacientes infectados pelo HIV, com imunidade preservada, parecem responder à infecção por *Sporothrix* spp da mesma forma como os indivíduos sem infecção (SCHUBACH et al., 2005). Nos pacientes doentes, a esporotricose assume o papel de uma doença oportunista, com casos severos, envolvimento sistêmico, e em muitos casos migração para as meninges (VILELA et al., 2007). Observando-se o histórico dos pacientes com SIDA/esporotricose pode-se inferir que em cerca de 20%, a disseminação evolui para comprometimento do sistema nervoso central (SILVA-VERGARA et al., 2005).

#### 3.4.2 Esporotricose em animais

No Brasil, a esporotricose é a principal infecção micótica profunda em felinos, pertencendo à literatura nacional as maiores coleções de casos diagnosticados. A disseminação da infecção entre felinos parece estar relacionada a hábitos como penetrar por entre ninhos e frestas de materiais descartados, esfregar-se no solo, em cascas de árvores, e por arranhões ou mordidas, devido a brincadeiras e agressões com outros gatos. A maior frequência tem sido observada entre machos não castrados, em idade reprodutiva, e com livre acesso a rua, o que se relaciona ao comportamento mais agressivo destes animais na disputa por fêmeas (DIXON; DUNCAN; HURD, 1992; READ; SPERLING, 1982; SCHUBACH et al., 2001).

Na espécie felina, há uma tendência do quadro de esporotricose cutânea disseminada com evolução para forma sistêmica com comprometimento dos pulmões, fígado, baço, ossos e linfonodos, sendo fator determinante dos óbitos (MARQUES et al., 1993; SCHUBACH et al., 2003). Assim como os aspectos clínicos e histológicos da esporotricose felina são distintos da esporotricose humana, também a abordagem terapêutica é mais complexa, pois os gatos são mais suscetíveis a iodo toxicose (MARQUES et al., 1993). Quando a terapia com iodeto de

potássio não é efetiva, terapia com itraconazol é indicada como uma alternativa terapêutica importante para estes animais (DE-OLIVEIRA-NOBRE et al., 2001).

Em cães, as formas cutâneas e linfocutânea são as mais comuns e não ocorre predisposição etária ou sexual para a doença, entretanto esta é mais comumente observada em animais destinados à caça (SCOTT; TARIQ; MCCRORY, 1995). A esporotricose canina disseminada pode ocorrer em animais imunocompetentes, no entanto, é de ocorrência mais rara. As lesões apresentam-se principalmente na face, pavilhão auricular, mucosa nasal, tronco e membros. As lesões são nodulares e ulcerativas, não pruriginosas e com presença de placas anulares e alopecia. Os nódulos ulcerados tipicamente drenam exsudato purulento, mas, diferentemente dos felinos, o fungo é raramente observado (WHITTEMORE; WEBB, 2007).

Nos equinos, as formas de esporotricose assemelham-se às humanas, com nódulos subcutâneos, que ulceram formando crostas, localizadas nos membros e no pescoço (COPETTI et al., 2002).

### 3.4.3. Diagnóstico da esporotricose

A esporotricose pode ser diagnosticada através de uma correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BARROS et al., 2011).

O exame direto do pus oriundo das lesões é geralmente realizado com solução de hidróxido de potássio 10-20%, objetivando-se observar elementos leveduriformes típicos da fase parasitária. Todavia, estas estruturas fúngicas são pequenas (2 a 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro) e escassas e, conseqüentemente, difíceis de detectar no exame direto de humanos infectados. Por outro lado, quando o mesmo exame é realizado com amostras colhidas de gatos infectados, devido à elevada carga fúngica nestes animais, as células leveduriformes do fungo podem ser facilmente encontradas. Quando a coloração de Gram é usada no material clínico, células leveduriformes aparecem coradas e, ocasionalmente, dentro de células gigantes ou linfócitos polimorfonucleares. A observação de estruturas leveduriformes no exame direto com KOH não é, portanto, conclusiva para o diagnóstico de esporotricose (LACAZ et al., 2002).

O *Sporothrix* spp pode ser observado nos tecidos com o uso de colorações como hematoxilina e eosina (H & E), sais de prata (GMS) ou pelo ácido periódico de Schiff (PAS),

embora a busca por elementos leveduriformes em pesquisas histopatológicas das lesões cutâneas humanas é infrutífera, devido à baixa carga fúngica (DE HOOG; VITALE, 2007). Em condições habituais, a imagem histopatológica mais característica é o corpo asteroide característico da reação de Splendore-Hoeppli, indicativa de resposta imunológica localizada no hospedeiro frente aos antígenos de diversos organismos infecciosos, incluindo fungos, bactérias e outros parasitas (GEZUELE; DA ROSA, 2005). Um número maior de formas parasitárias pode ser encontrado em pacientes recebendo corticosteroides sistêmicos ou tópicos. A exuberância de células fúngicas observadas intra e extracelular no tecido dérmico em forma de charuto, pleomórfica ou em brotamento é um achado histopatológico comum nas lesões cutâneas em felinos e que não se estende aos caninos (MARQUES et al., 1993).

O diagnóstico definitivo da esporotricose baseia-se no isolamento e identificação do agente etiológico em cultura (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992). O isolamento de *Sporothrix* spp é facilmente obtido depois de semeados em meios de culturas usuais na rotina laboratorial de micologia, tais como ágar *Sabouraud* e ágar *Mycobiotic*. Após 5 a 7 dias de incubação a 25 °C, já é possível visualizar colônias filamentosas desenvolvendo-se, as quais podem apresentar uma coloração escura, geralmente no centro da colônia (DE HOOG; VITALE, 2007). Para identificar o *Sporothrix schenckii*, pode-se utilizar o dimorfismo, promovendo-se a reversão da fase filamentosa à fase leveduriforme, através de subcultivo em meio enriquecido como o ágar BHI a 37 °C, durante 5 a 7 dias. Alguns isolados podem apresentar dificuldade para reverter, podendo requerer múltiplas subculturas e incubação por períodos mais longos (DE HOOG; VITALE, 2007).

As culturas positivas favorecem o reconhecimento do fungo, permitindo que quase todos os casos de esporotricose cutânea sejam diagnosticados. No entanto, o diagnóstico através da cultura tem limitações significativas, principalmente em algumas manifestações da doença, como na artrite induzida por *Sporothrix* spp, onde a coleta de material para a cultura é difícil. Após o crescimento, o fungo é facilmente identificado por microcultivo (BARROS et al., 2001). Métodos moleculares têm sido desenvolvidos para facilitar e agilizar o diagnóstico micológico. A identificação molecular do Complexo *Sporothrix schenckii* é útil para diagnóstico rápido da esporotricose e também valioso em casos de culturas negativas devido à baixa carga fúngica ou infecções secundárias (REISS et al., 2000).

Ainda há poucos métodos moleculares voltados para detecção de ácido desoxirribonucleico (DNA) de espécimes de *Sporothrix* em materiais clínicos. Algumas metodologias para identificar colônias de *Sporothrix* spp a partir de culturas puras foram descritas. Os sistemas de detecção por *polymerase chain reaction* (PCR) podem ser úteis

como ferramentas de diagnóstico para a detecção de esporotricose em humanos e animais, mas ainda fogem da realidade do diagnóstico laboratorial usual de esporotricose (KANBE et al., 2005; LINDSLEY et al., 2001).

### **3.5 Agentes antifúngicos e mecanismo de ação**

No tratamento das micoses superficiais a diversidade de fármacos disponíveis para a terapia é maior. Além dos poliênicos como anfotericina B e nistatina, da flucitosina e de maior variedade de azóis (clotrimazol, econazol, isoconazol, oxiconazol, sertaconazol, miconazol, terconazol e tioconazol), existem ainda outros antifúngicos: o derivado da morfolina, amorolfina; os tiocarbamatos tolnaftato e tolclato; as alilaminas naftifina, terbinafina e butenafina e o composto ciclopirox, além da griseofulvina (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Diferentes antifúngicos estão disponíveis no mercado, mas o número de fármacos usados para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas é, ainda hoje, limitado. As quatro principais classes de antifúngicos para uso sistêmico são os poliênicos, azólicos, alilaminas e equinocandinas. A anfotericina B e os azólicos - principalmente cetoconazol, fluconazol e itraconazol - têm sido os agentes mais utilizados nas últimas décadas para o tratamento da maioria das micoses sistêmicas. A terbinafina e caspofungina, respectivamente uma alilamina e uma equinocandina se encontra disponível para uso sistêmico (CHEN; SORRELL, 2007).

Com mais de 50 anos de uso clínico e, apesar das limitações relacionadas com a toxicidade e restrição à administração endovenosa, a anfotericina B ainda é considerada como o “padrão ouro” para o tratamento de infecções fúngicas graves. Atualmente, a anfotericina B é sugerida como primeira escolha nas formas disseminadas, pulmonares e meníngeas de esporotricose (GUBBINS; ANAISSIE, 2009; KAUFFMAN et al., 2007). No entanto, seu uso é associado a efeitos adversos significativos como febre e calafrios durante a administração e, com maior gravidade, relacionando-se à nefrotoxicidade em até 30% dos pacientes com quadro de falha renal aguda. Isto se deve às interações do desoxicolato de anfotericina B com o colesterol da membrana plasmática dos mamíferos, embora esta interação evidencie menor afinidade do que pelo ergosterol da membrana celular fúngica (DERAY, 2002). Os poliênicos ligam-se, basicamente, ao ergosterol presente na membrana de fungos sensíveis, formando

poros ou canais. O resultado é um aumento na permeabilidade da membrana que permite o extravasamento de diversas moléculas pequenas, levando à morte celular.

Os antifúngicos azólicos incluem duas subclasses: os imidazólicos e os triazólicos, cuja atividade antifúngica se faz através da alteração da permeabilidade de membrana, promovida pela inibição da síntese do ergosterol por ligação às enzimas da Citocromo P450 do fungo, e consequente inibição da demetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (TERREL, 1999).

No início da década de 1980 o cetoconazol foi o primeiro azólico a ser administrado por via oral no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, mas havia a necessidade de agentes com espectro de atividade mais amplo e mais potente. O itraconazol pertencente à primeira geração dos triazólicos e apresenta amplo espectro antifúngico sem efeitos colaterais importantes, sendo o medicamento de escolha no tratamento de esporotricose local e sistêmica e também na forma osteoarticular da doença (KAUFFMAN et al., 2007; TERREL, 1999).

As investigações sobre novos antifúngicos tem se concentrado em melhorar antigas formulações, tornando-as menos tóxicas e, ao mesmo tempo, desenvolver novos fármacos a partir das estruturas já conhecidas. A partir da primeira geração de triazólicos, surgiu a segunda geração, sendo o voriconazol um de seus exemplares mais potentes, com amplo espectro de ação sobre leveduras e fungos filamentosos e sendo capaz de penetrar a barreira hematoencefálica (NEELY; GHANNOUM, 2000). O voriconazol é indicado como alternativa contra infecções invasivas graves, mas para *Sporothrix* spp foi verificada sua atividade *in vitro*, contudo a significância clínica é ainda desconhecida (CHEN; SORRELL, 2007).

Outra classe de agentes antifúngicos disponíveis para utilização clínica são as alilaminas. Entre elas, a terbinafina, que atua inibindo seletivamente a biossíntese de ergosterol pelo fungo e, também, pelo acúmulo de esqualeno no interior da célula fúngica. Este mecanismo de ação, tanto no aspecto funcional como químico, se distingue de outros antimicóticos sistêmicos, como os derivados azólicos, que inibem numa etapa posterior a síntese de ergosterol (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001). A terbinafina é um composto fungicida queratinofílico e altamente lipofílico, sendo ativa contra uma ampla variedade de fungos filamentosos e alguns leveduriformes (HAY, 1999; KAUFFMAN et al., 2007).

Uma nova classe de antifúngicos é representada pelas equinocandinas. O novo mecanismo de ação desta classe através de inibição enzimática da  $\beta$ -(1,3) glucana-sintetase que atua na síntese do 1,3- $\beta$ -glicano, polímero de glicose necessário para a manutenção da estrutura da parede fúngica. Até o momento, três equinocandinas destacam-se pela importância clínica já evidenciada: caspofungina, anidulafungina e micafungina (CHEN;

SORRELL, 2007). A caspofungina foi a primeira a receber aprovação em 2001, pelo *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2002 e tem como indicação a terapia empírica para presumíveis infecções fúngicas em pacientes neutropênicos e febris e os tratamentos de infecções por *Candida* spp. (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

### 3.6 Tratamento da esporotricose

O iodeto de potássio (IK) foi o primeiro tratamento utilizado para a esporotricose. Este é preparado como solução saturada de aproximadamente 1 g de iodeto de potássio em 1 mL de água e administrado, geralmente, misturado com leite ou suco para mascarar o gosto por via oral sendo administrado após a refeição para evitar o aparecimento de gastrite. Este tratamento é considerado de baixo custo e efetivo para lesões localizadas no homem e animais, mas apresenta efeitos adversos como gosto metálico, inflamação das glândulas salivares, náuseas, hipotireoidismo e iodismo dentre outros (DÍAZ, 2011; MORRIS-JONES et al., 2003).

Segundo Kauffman et al. (2007) a monoterapia com itraconazol é a primeira escolha para o tratamento da esporotricose subcutânea, mas também é usada para pacientes imunocomprometidos com quadro clínico mais grave e até sistêmico.

A anfotericina B é indicada para o tratamento de formas clínicas de grau moderado, em pacientes imunocomprometidos e naqueles indivíduos que não respondem às terapêuticas anteriormente descritas. Pacientes co-infectados com o HIV devem receber posteriormente supressiva terapia com itraconazol, até a restauração do sistema imunológico. Em gestantes, a anfotericina B pode ser usada após 12 semanas da gravidez, mas este medicamento deve ser reservado para formas pulmonares e disseminadas da doença (KAUFFMAN et al., 2007).

O fluconazol é considerado um medicamento de eficácia moderada no tratamento de esporotricose. Segundo estudo realizado por Kauffman et al. (2007) uma dose de 400mg/dia foi eficaz em 71% dos casos de esporotricose linfocutânea, no entanto casos extra cutâneos apresentaram apenas 31 % de cura. O cetoconazol, além de ter maior toxicidade, não demonstrou uma boa resposta (KAUFFMAN et al., 2007).

Os estudos de sensibilidade sobre boa atividade in vitro da terbinafina e posaconazol contra *Sporothrix* spp têm sido encorajadores (MEINERZ et al., 2007; SILVEIRA et al.,



2009). Os três estudos usando terbinafina em pacientes humanos demonstrou uma boa eficácia de doses variando de 250 a 1.000 mg/dia (CHAPMAN et al., 2004; FRANCESCONE et al., 2011; FRANCESCONE et al., 2009). Um estudo que comparou 250 mg/dia de terbinafina a 100 mg/dia de itraconazol resultou em cura em 92,7% e 92% dos pacientes, respectivamente, indicando a terbinafina ser uma opção eficaz e bem tolerada para o tratamento da esporotricose cutânea (FRANCESCONE et al., 2009).

Embora exista uma proposta terapêutica para o tratamento de esporotricose, nos últimos anos, a doença tem sido associada com significantes casos de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (FREITAS et al., 2011; HARDMAN et al., 2005; SILVA-VERGARA et al., 2005).

### **3.7 Avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos**

Usualmente as infecções fúngicas requerem tratamentos mais prolongados do que as infecções bacterianas, visto que os organismos fúngicos multiplicam-se mais lentamente e muitas vezes. Assim como as bactérias, os fungos também desenvolvem mecanismos de resistência aos fármacos, resultando em falhas terapêuticas associadas ao aumento nas prevalências de morbidade e mortalidade dos pacientes acometidos por micoses sistêmicas (LIU; LIN, 2001; NEELY; GHANNOUM, 2000).

Infecções fúngicas graves tornaram-se mais comuns devido ao aumento de pacientes imunocomprometidos. Nesses pacientes, especialmente aqueles acometidos pela SIDA, a esporotricose pode aparecer nas formas mais graves e com prognóstico sombrio (DONABEDIAN et al., 1994; HARDMAN et al., 2005; WARE et al., 1999).

Considerando esses agravos na evolução das doenças fúngicas em humanos, tornou-se imprescindível o aperfeiçoamento das metodologias laboratoriais para determinação das suscetibilidades *in vitro* dos diferentes patógenos frente aos agentes antifúngicos disponíveis para uso clínico. A possibilidade de prever o sucesso terapêutico denota a importância da correlação entre os ensaios de suscetibilidade e a resposta clínica. Estes testes também podem ser utilizados para avaliação da atividade antifúngica de novos fármacos e estudos epidemiológicos da suscetibilidade de patógenos fúngicos (REX et al., 2001).

Inicialmente o conceito de concentração inibitória mínima (CIM) era irrelevante, visto que não existiam alternativas terapêuticas à anfotericina B. Com a introdução da 5-

fluorocitosina nos anos 1970 e dos azólicos nos anos 1980, a determinação da CIM surge como um auxílio interessante para a definição de um tratamento adequado. Em 1983 o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) estabeleceu um subcomitê para padronização de teste de suscetibilidade *in vitro* para fungos patogênicos. Pesquisadores foram desafiados a desenvolver metodologias reprodutíveis que refletissem, através dos ensaios *in vitro*, as concentrações séricas atingidas com doses usuais dos fármacos antifúngicos e sensíveis o bastante para detectar variações reais de suscetibilidades de diferentes isolados. Dez anos mais tarde, as principais variáveis como concentração do inóculo, tempo e temperatura de incubação, meio de cultura e determinação do ponto final de leitura estavam já definidas e contornadas. Isto foi importante porque testes não padronizados geravam CIMs com divergências de até 50.000 vezes. Em 1997, os esforços resultam na aprovação do protocolo M27-A do CLSI para teste de suscetibilidade em fungos leveduriformes (NEELY; GHANNOUM, 2000).

A aprovação de um protocolo normatizando a metodologia para testes de suscetibilidade com fungos filamentosos patogênicos, M-38A, concretizou-se em 2002. O documento abrange espécies de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii* e a forma miceliana de *S. schenckii* (CLSI 2008).

Mc Ginnis et al. (2001) avaliaram 100 isolados clínicos de esporotricose humana frente ao voriconazol, itraconazol e anfotericina B utilizando fase leveduriforme seguindo metodologia do protocolo M27-A modificado. Outros autores também utilizaram o protocolo M27-A2 adaptado para fungos dimórficos avaliando atividade da terbinafina, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol, albaconazol, eberconazol e micafungina (MEINERZ et al., 2007; TRILLES et al., 2005). Um estudo recente de suscetibilidade *in vitro* de *S. schenckii* faz uma correlação entre kits comerciais - Sensititre YeastOne e ATB Fungus 2 -, inicialmente padronizados para leveduras, com a metodologia estabelecida como padrão seguindo o protocolo M38-A (ALVARADO-RAMÍREZ; TORRESRODRÍGUEZ, 2007).

Na década de 1990 o itraconazol, atual antifúngico de eleição para as formas cutânea e linfocutânea da esporotricose, emergiu como uma opção terapêutica eficaz com menos efeitos colaterais em relação aos antifúngicos tradicionalmente utilizados para a micose. Porém, estudos posteriores vêm demonstrando que são crescentes os casos de resistência *in vitro*, assim como recidiva e falha terapêutica em indivíduos e animais, especialmente felinos (BUSTAMANTE; CAMPOS, 2001; KOHLER et al., 2004; NOBRE et al., 2002b; OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos de suscetibilidade *in vitro* de *Sporothrix* spp frente à terbinafina, são encorajadores. A terbinafina tem sido avaliada como uma alternativa para o tratamento da esporotricose, sendo que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram boa atividade frente ao agente, assim como, boa tolerabilidade e ação no tratamento da esporotricose cutânea e cutânea linfática (KAUFFMAN; HAIJJEH; CHAPMAN, 2000; KHOLER et al., 2006; TRILLES et al., 2005).

Os três estudos usando terbinafina demonstraram boa eficácia (CHAPMAN et al., 2004; FRANCESCONI et al., 2009; FRANCESCONI et al., 2011). Comparando-se a administração de 250 mg/dia de terbinafina com 100 mg/dia de itraconazol evidenciou taxas de cura em 92,7% e 92% dos pacientes, respectivamente, indicando a terbinafina como uma opção eficaz e bem tolerada para o tratamento da esporotricose cutânea (FRANCESCONI et al., 2009). Testes de suscetibilidade com voriconazol e outros novos agentes antifúngicos ainda são pouco explorados (ODABASI et al., 2004; MORERA-LOPEZ et al., 2005; ALVARADO-RAMIREZ; TORRES-RODRIGUEZ, 2007).

A distribuição geográfica das cepas de *Sporothrix* spp também parece desempenhar um papel importante na suscetibilidade antifúngica. Isolados oriundos das áreas endêmicas do Rio de Janeiro são mais suscetíveis ao itraconazol e terbinafina do que isolados da Espanha ou mesmo do estado de São Paulo (GUTIERREZ GALHARDO et al., 2008). Baixos valores de CIM para a terbinafina foram descritas entre isolados da Venezuela enquanto que de valores elevados de CIM para o posaconazol foram encontrados em isolados peruanos (SILVEIRA et al., 2009).

As variações na suscetibilidade de *Sporothrix* spp estão associadas a distribuições geográficas o que também pode envolver as novas espécies que formam o Complexo *Sporothrix*. Assim, em estudos preliminares e limitados, *S. mexicana* evidenciou perfil de suscetibilidade com elevados valores de CIM frente à anfotericina B e azólicos, sendo sensível apenas à terbinafina. Já *S. brasiliensis* é mais sensível a azólicos do que as demais espécies (MARIMON et al., 2008).

### 3.8 Associações antifúngicas

A necessidade de se dispor de novas alternativas terapêuticas para tratar infecções fúngicas tem renovado o interesse por tratamentos baseados em combinações de fármacos. A monoterapia com itraconazol no tratamento da esporotricose tem demonstrado excelente resposta terapêutica em humanos (BARROS et al., 2011); todavia, relatos de casos refratários ao tratamento oral com itraconazol, principalmente em animais, têm sido descritos; estes fatos têm justificado e encorajado a avaliação de combinações terapêuticas antifúngicas (BUNCE et al., 2011; GREMIÃO et al., 2011). De modo geral, as elevadas taxas de mortalidade relacionadas a infecções fúngicas em pacientes imunocomprometidos e a relativa ineficácia dos fármacos em uso, justificam o interesse por associações antifúngicas relevantes (JOHNSON et al., 2004).

A combinação de fármacos entre diferentes classes antifúngicas sugere melhor atividade no tratamento, sobretudo, quando o sinergismo é observado. Além de combinações entre fármacos convencionalmente utilizados na clínica, surgem possibilidades de associações entre antifúngicos e outras classes de fármacos, com alguma atividade antifúngica descrita na literatura, mesmo que limitada (SCOTT; TARIQ; MCCRORY, 1995).

As combinações de fármacos podem ser utilizadas para melhorar a eficácia da terapia antifúngica, em infecções de difícil tratamento, por expandir o espectro de atividade antimicrobiana (AFELTRA et al., 2004). Por outro lado, a administração de combinações entre fármacos de diferentes classes terapêuticas deve ser utilizada com cautela para que o antagonismo entre os fármacos não seja observado (BAVA; NEGRONI, 1992).

#### 3.8.1 Combinações com terbinafina e azólicos

O mecanismo sinérgico proposto para combinações entre azólicos e terbinafina baseia-se na inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica. O resultado é a inibição da biossíntese do ergosterol debilitando o funcionamento da membrana celular (BARCHIESI; DIFRANCESCO; SCALISE, 1997; BARCHIESI et al., 1998).

De todas as associações antifúngicas frente à *Candida* spp, as combinações entre terbinafina e azólicos demonstram-se como as mais promissoras. Na maioria dos isolados

avaliados, esta combinação resultou em interação sinérgica ou indiferente e, antagonismo não foi registrado (BARCHIESI; DIFRANCESCO; SCALISE, 1997; BARCHIESI et al., 1998).

### 3.9 Virulência

Os processos infecciosos dependem da virulência dos microrganismos bem como da habilidade do hospedeiro em prevenir ou combater a invasão microbiana. Os fungos possuem fatores de patogenicidade que permitem aumentar suas chances de sobrevivência no hospedeiro, levando ao desenvolvimento da doença. A elucidação da origem da virulência microbiana tem sido o principal objetivo de vários estudos. Em geral, a teoria mais aceita é a de que, com as interações microbianas com outros organismos presentes no habitat natural do patógeno, este pode vir a adquirir estratégias de sobrevivência tendendo a maior virulência quando acidentalmente encontrar um hospedeiro (CASADEVALL, 2006).

Dentre os principais fatores de patogenicidade do *Sporothrix* spp destacam-se a termotolerância, presença de melanina, composição da parede celular e atividade de enzimas extracelulares (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; LOPES-BEZERRA et al., 2006). Esses fatores auxiliam na invasão tecidual e interferem na eficácia da resposta imune, propiciando a instalação do micro-organismo no tecido e sua transição para a forma leveduriforme. O tempo de transição micélio-levedura requer aproximadamente 13 dias, sendo que 24–48 hs após incubação ocorre o desaparecimento das hifas e iniciando-se a conversão dos conídios em leveduras (CORREA et al., 1991).

#### 3.9.1 Termotolerância

Um dos principais fatores de virulência do *Sporothrix* spp e de outros fungos patogênicos é a termotolerância (CASADEVALL, 2006). Assim, os isolados capazes de crescer a 35°C, mas não a 37°C, são incapazes de causar esporotricose linfática e extracutânea e estariam, apenas, associados à forma cutânea fixa da doença (DEALBORNOZ; MENDOZA; DETORRES, 1986; TACHIBANA et al., 2001). Os fungos isolados a partir da esporotricose linfocutânea e extracutânea mostraram tolerância e crescimento a 37°C, sendo

capazes de reproduzir a doença de forma sistêmica em seus hospedeiros (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

### 3.9.2 Melanina

Ambos os estágios morfológicos de *Sporothrix* spp têm a capacidade de sintetizar melanina. Este é um composto insolúvel em água, ácidos e solventes orgânicos, sendo altamente relacionado à virulência em várias espécies fúngicas (BUTLER; DAY, 1998; JACOBSON, 2000). Embora não seja essencial à sobrevivência da célula fúngica, esse pigmento (marrom-escuro ou preto) contribui para o crescimento e desenvolvimento das espécies, auxiliando na sobrevivência e competição dos fungos no meio ambiente (JACOBSON, 2000).

As melaninas fúngicas são sintetizadas na parede celular como polímeros extracelulares formados por vários monômeros indólicos ou fenólicos, normalmente combinados com proteínas ou carboidratos. Conferem resistência à célula fúngica frente às células efectoras do sistema imune, através da redução da fagocitose, proteção contra derivados de oxigênio e nitrogênio, e frente a enzimas hidrolíticas, como quitinase e glucanase (JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; WHEELER et al., 2000).

Recentemente, foi demonstrado que *Sporothrix* spp também pode produzir melanina a partir de substratos fenólicos como 3,4-diidroxil-L-fenilalanina (L-DOPA), tanto nas fases filamentosa como leveduriforme (ALMEIDA-PAES et al., 2009). É interessante notar que a melaninização dos conídios só ocorre pela via metabólica do 1,8-dihidroxi-naftaleno (DHN); já se L-DOPA estiver presente, somente as hifas serão ser melanizadas (ALMEIDA-PAES et al., 2009; MORRIS-JONES et al., 2003; ROMERO-MARTÍNEZ et al., 2000).

Estudos *in vitro* indicam que a melanização do *Sporothrix* spp é controlada por diversos fatores, tais como temperatura, pH, e presença de alguns nutrientes (ALMEIDA-PAES et al., 2009). A melanização também tem um papel na patogênese da esporotricose cutânea, uma vez que os isolados pigmentados apresentaram maior capacidade invasiva do que a cepa mutante albino em um modelo experimental de esporotricose em ratos. As cepas albinas também permaneceram restritas no núcleo do granuloma, enquanto que as cepas melanizadas promoveram a formação de granulomas multifocais (MADRID et al., 2009). A melanina promove redução da suscetibilidade de *H. capsulatum* e *C. neoformans* à

anfotericina B e caspofungina (VAN DUIN; CASADEVALL; NOSANCHUK, 2002). Suspeita-se que este pigmento em *Sporothrix* spp possa dificultar o tratamento de alguns casos, principalmente em se tratando de esporotricose extracutânea ou em pacientes com SIDA (MORRIS-JONES et al., 2003). No entanto, ainda não foi evidenciado nenhum estudo para confirmar esta hipótese.

### 3.9.3 Proteínas relacionadas com a virulência

Diversas proteínas têm sido relacionadas como fatores de virulência de fungos. Por exemplo, o antígeno imunodominante de *Paracoccidioides brasiliensis*, uma glicoproteína de 43kDa, é a molécula responsável pelo reconhecimento e ligação da laminina e fibronectina, o que aumenta a virulência do fungo (MENDES-GIANNINI et al., 2006; VICENTINI et al., 1994). Proteínas de ligação do cálcio são importantes na virulência de *H. capsulatum*, permitindo a aquisição do cálcio em ambientes com limitação deste íon (WOODS, 2003). Uma série de proteínas tais como as adesinas, têm sido descritas para *Aspergillus fumigatus*, incluindo uma hemolisina de 30-kDa contendo várias proteases que favorecem a colonização pulmonar e destruição de moléculas humorais importantes e uma catalase de 350-kDa que é necessária para a sobrevivência do fungo à fagocitose (LATGE, 1999).

Embora diversas proteínas estejam relacionadas à virulência de fungos dimórficos como os exemplos acima citados, a função das proteínas na virulência do *Sporothrix* spp ainda é uma questão a ser esclarecida. Acredita-se que enzimas como as fosfatases ácidas atuem na interação fungo-macrófago, embora evidências definitivas para apoiar esta sugestão, aguardam novas prospecções (KANO et al., 2001).

#### 3.9.3.1 Parede celular

A parede celular dos fungos é altamente versátil, sendo continuamente expandida durante o crescimento e excessivamente remodelada durante o desenvolvimento. Quimicamente, a parede contém entre 80 e 90 % de polissacarídeos, sendo o restante constituído de proteínas e lipídeos. Em algumas espécies são encontrados quantidades

apreciáveis de pigmentos (melanina), polifosfatos e íons inorgânicos. Fisicamente, a parede celular é formada por microfibrilas entrelaçadas, embebida numa matriz amorfa. A quitina e a celulose são os principais componentes microfibrilantes da maioria dos fungos filamentosos, enquanto que nas leveduras a parede contém principalmente glucanas não celulósicas. As proteínas e vários polissacarídeos (glucanas, mananas, galactanas e heteropolissacarídeos) são as principais substâncias cimentantes. Os monossacarídeos mais frequentemente encontrados na parede celular dos fungos são D-glicose, N-acetil-D-glicosamina, D-manose, D-galactose, D-galactosamina, L-fucose, D-glicosamina, xilose e ácido D-glicurônico. Desses, glicose, N-acetil-D-glicosamina e manose são encontrados na maioria dos fungos (KITAJMA, 2000).

A parede celular de *Sporothrix* spp é composta por  $\beta$ -glucanas e peptídeo-ramnomanana, sendo a ramnose e a manose os principais açúcares. Estudos demonstraram que isolados cultivados em meios com maior proporção de ramnose em relação à manose, evidenciaram maior virulência quando inoculadas experimentalmente, causando a morte de todos os animais (FERNANDES; MATHEWS; LOPES BEZERRA., 1999). A peptídeo-ramnomanana estimula a mitose de linfócitos, incitando uma reação de hipersensibilidade tardia, assim como a produção de anticorpos (CARLOS; SGARBI; PLACERES, 1998; FERNANDES; MATHEWS; LOPES BEZERRA, 1999; FIGUEIREDO et al., 2004; KAJIWARA et al., 2004). Esta fração antigênica também é responsável pela adesão das células de *Sporothrix* spp a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, laminina e colágeno tipo II, sendo este um fator crucial para a capacidade do micro-organismo em colonizar e disseminar-se no hospedeiro (FIGUEIREDO et al., 2004; LIMA et al., 2001).

### 3.9.3.2 Adesão

A adesão primária nas células endoteliais e epiteliais, bem como a componentes da matriz extracelular é essencial para o sucesso da invasão fúngica nos tecidos do hospedeiro. Tanto os conídios quanto células da fase leveduriforme do *Sporothrix* spp são capazes de reconhecer e de se ligarem a três importantes glicoproteínas da matriz extracelular: fibronectina, laminina e colágeno tipo II e desta forma aderirem ao hospedeiro (LIMA et al., 1999; LIMA et al., 2001). Alguns estudos tem demonstrado que o fungo possui integrinas ou adesinas que reconhecem a fibronectina humana em diversos pontos da molécula (LIMA et al., 2001). As adesinas estão localizadas na superfície de células leveduriformes e sua



expressão é relacionada com a virulência do fungo (TEIXEIRA et al., 2009). Os receptores para adesão celular estão presentes em hifas e leveduras, embora nas leveduras apresente maior capacidade ligante do fungo à matriz extracelular. A existência dessas adesinas pode favorecer a adesão no tecido do hospedeiro e disseminação do fungo por todo o corpo (LIMA et al., 2004). A presença destas moléculas em *Sporothrix* spp está provavelmente relacionada à virulência, uma vez que a expressão preferencial delas está na fase parasitária do fungo. Recentemente, foi relatada uma glicoproteína de 70 kDa de um isolado do gênero *Sporothrix*, a qual exerce participação na adesão do fungo à matrix extracelular da pele (RUIZ-BACA et al., 2009).

O fungo ainda dispõe de processos que facilitam a sua penetração na corrente sanguínea e posterior disseminação. Segundo estudos de Figueiredo et al. (2004) de interação *in vitro*, células endoteliais humanas podem internalizar células fúngicas leveduriformes que permaneceriam intactas ou com menor viabilidade. Este fator somado à capacidade do fungo atravessar espaços intercelulares, são processos que vem a contribuir para a maior virulência do gênero *Sporothrix*.

### 3.9.3.3 Peróxido de ergosterol

Com base na utilização de métodos espectroscópicos, Sgarbi et al. (1997), analisando os lipídios de *Sporothrix*, identificaram o peróxido de ergosterol em células leveduriformes. Este composto pode ser convertido em ergosterol quando em contato com extrato enzimático do fungo. O peróxido de ergosterol encontrado no gênero *Sporothrix* funciona como um mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio durante a fagocitose, podendo por isto, também ser considerado um fator de virulência. Por outro lado, após a fagocitose do *Sporothrix* por polimorfonucleares, a desintoxicação das células sobreviventes baseia-se em outras estratégias de desintoxicação além da síntese de peróxido de ergosterol (CARLOS et al., 2009).

#### 3.9.3.4 Proteinases extracelulares

Pesquisas relacionadas com a habilidade de fungos em produzir enzimas extracelulares como proteases, queratinases e lipases, permitem estabelecer a relação com a patogenicidade (MAGO; KHULLER, 1990). Alguns fungos de interesse médico produzem proteases que podem atuar como fator de virulência, devido ao envolvimento com a propagação do fungo no hospedeiro, causando conseqüentemente invasão através da degradação de proteínas da pele, anexos ou mucosas (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992).

Dentre as enzimas extracelulares, as proteinases desempenham importante função na invasão tecidual do gênero *Sporothrix*, hidrolisando o estrato córneo, colágeno tipo I e elastina da pele, permitindo dessa forma, o desenvolvimento fúngico. As fosfatases atuam na membrana celular, sendo capazes de catalisar e liberar fosfato de fosfoproteínas, apresentando também, importante papel na interação das células leveduriformes com macrófagos (ARNOLD et al., 1986; HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996, 1996).

O *Sporothrix* spp na forma leveduriforme, produz as proteinases, tipo I e II, quando cultivado em meios contendo albumina ou colágeno como fonte de nitrogênio. A produção destas enzimas sugere que tais enzimas tenham participação na degradação dos constituintes da pele para facilitar a invasão tecidual do fungo. A proteinase II produzida pelo *S. schenckii* tem propriedades muito semelhantes aquelas de *Candida albicans* (TSUBOI et al., 1987).

Uma preparação antigênica da fase leveduriforme do *Sporothrix* spp mostra a atividade proteolítica contra diferentes subclasses de imunoglobulina G (IgG) humana, sugerindo que algumas proteínas secretadas podem intervir na resposta imune do hospedeiro (DA ROSA et al., 2009).

### 3.10 API ZYM – Sistema de detecção de atividade enzimática

O sistema API ZYM<sup>®</sup> da Biomérieux<sup>®</sup> é um micrométodo semiquantitativo de detecção de atividades enzimáticas que pode ser aplicado a diferentes tipos de amostras (micro organismos, suspensões celulares, tecidos, líquidos biológicos, etc.). Permite o estudo rápido e simultâneo da atividade enzimática de micro-organismos a partir de pequenas quantidades de amostra. A partir deste kit é possível avaliar a atividade de 19 enzimas:

fosfatase alcalina, esterase, esterase lipase, lipase, leucina arilamidase, valina arilamidase, cistina arilamidase, tripsina,  $\alpha$ -quimotripsina, fosfatase ácida, naftol-AS-BI-fosfohidrolase,  $\alpha$ -galactosidase,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase,  $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase, n-acetil- $\beta$ -glucosaminidase,  $\alpha$ -manosidase e  $\alpha$ -fucosidase.

O API ZYM<sup>®</sup> apresenta-se sob a forma de galerias de 20 micro-poços (cúpulas) cujo fundo é constituído por um suporte que contém o substrato enzimático com tampão. Este suporte destina-se a favorecer o contato entre a enzima e o substrato geralmente insolúvel. Os substratos são inoculados com uma suspensão densa de micro-organismos, que, ao mesmo tempo, reidrata os substratos. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor, reveladas pela adição de reagentes (Quadro 2).

Nº	Enzima detectada	Substrato	pH	Reação	
				Positiva	Negativa
1	Controle Negativo			Incolor ou cor da amostra se esta tiver cor pronunciada	
2	Fosfatase alcalina	2-naftil fosfato	8,5	Violeta	Incolor
3	Esterase	2-naftil-butilato	6,5	Violeta	
4	Esterase lipase	2-naftil-caprilato	7,5	Violeta	
5	Lípase	2-naftil-miristato	7,5	Violeta	
6	Leucina arilamidase	L-leucil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
7	Valina arilamidase	L-valil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
8	Cistina arilamidase	L-cistil-2-naftilamida	7,5	Laranja	
9	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	8,5	Laranja	
10	$\alpha$ -quimotripsina	N-glutaril-fenilalamina-2-naftilamida	7,5	Laranja	
11	Fosfatase ácida	2-naftil-fosfato	5,4	Violeta	
12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolase	Naftol-AS-BI-fosfato	5,4	Azul	
13	$\alpha$ -galactosidase	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-galactopiranosida	5,4	Violeta	
14	$\beta$ -galactosidase	2-naftil- $\beta$ D-galactopiranosida	5,4	Violeta	
15	B-glucuronidase	Naftol-AS-BI- $\beta$ D-glucuronida	5,4	Azul	
16	$\alpha$ -glucosidase	2-naftil- $\alpha$ D-glucopiranosida	5,4	Violeta	
17	$\beta$ -glucosidase	6-Br-2-naftil- $\beta$ D-glucopiranosida	5,4	Violeta	
18	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase	1-naftil-N-acetil- $\beta$ D-glucosaminida	5,4	Castanho	
19	$\alpha$ -manosidase	6-Br-2-naftil- $\alpha$ D-manopiranosida	5,4	Violeta	
20	$\alpha$ -fucosidase	2-naftil- $\alpha$ L-fucopiranosida	5,4	Violeta	

Quadro 2 - Quadro de leitura do kit API ZYM<sup>®</sup>

Saenz-de-Santamaria, Guisantes e Martinez (2006), utilizaram o Sistema API ZYM<sup>®</sup> como um método de triagem para detectar possíveis atividades enzimáticas associadas aos alérgenos de *Alternaria alternata* (*Alt, a, 1*). Os resultados demonstraram elevada variabilidade intraespecífica da atividade enzimática, o que poderia ser a resposta para avaliar o papel biológico dos alérgenos *Alt, a, 1*. A atividade correspondente às fosfatases, esterases e  $\beta$ -glucosidases foi expressa em 100% dos isolados de *Alternaria alternata*.

### 3.11 Análise Molecular

#### 3.11.1 Filogenia Molecular

O conhecimento da evolução de que todos os seres vivos compartilham um ancestral comum e que a estrutura dos organismos traz armazenada em si, parte da sua história evolutiva, tem estimulado o estudo das relações de parentesco entre os organismos. Desta forma, quando buscamos descobrir a existência de conexões entre as espécies, ou seja, a existência de uma filogenia, devemos considerar que tanto as espécies quanto suas características são conectadas historicamente. Assim, poderíamos definir como filogenia uma suposta reconstrução da história evolutiva de um grupo, indicando os níveis de ancestralidade das espécies com suas espécies descendentes (AMORIM, 2002).

Os estudos filogenéticos das espécies consideram as relações de parentesco e a história evolutiva, sob a premissa de que as espécies mais próximas compartilham maior número de características em comum do que as mais distantes. A filogenia representa uma hipótese das relações de ancestralidade comum entre *táxons* ou grupos, compreendida a partir de caracteres morfológicos, fisiológicos e moleculares, entre outros. Enfim, por meio de uma análise filogenética, podem-se compreender os processos evolutivos tais como a extinção e a adaptação, e dessa forma inferir a história da evolução (MIYAKI et al., 2001).

Com base em estudos moleculares anteriores e na análise de regiões sequenciais específicas, foi proposta a existência de mais de uma espécie dentro do gênero *Sporothrix* (ISHIZAKI et al., 1998; ISHIZAKI, 2003; MESA-ARANGO et al., 2002; NEYRA et al., 2005; WILHELM DE BEER et al., 2003). Ghosh et al. (2002) também encontraram diferenças morfológicas e fisiológicas entre os isolados de origem clínica. As diferenças na

virulência entre estirpes clínicas e ambientais foram relatadas, mas nenhuma correlação foi encontrada com as diferentes formas clínicas da esporotricose (DIXON, DUNCAN, HURD, 1992; NEYRA et al., 2005).

### 3.11.2 Método de reconstrução filogenética

A reconstrução filogenética estima as relações de ancestralidade existentes em um determinado número de organismos pela construção de uma árvore filogenética, que representa a história evolutiva dos táxons nela presentes. Esses táxons podem ser: famílias, gêneros, espécies, populações, ou qualquer grupo taxonômico que se deseja inferir dados sobre a sua história evolutiva (ARRIEL et al., 2006). Os métodos de reconstrução de árvores filogenéticas baseiam-se em duas metodologias principais: fenéticas e cladísticas (AMORIM, 2002).

As análises fenéticas utilizam medidas de distância ou de similaridade genética, que mostram as diferenças entre os caracteres em números, temos como modelo deste método de reconstrução o agrupamento de vizinhos ou Neighbor-Joining (NJ). Uma matriz de distância entre todos os possíveis pares do grupo de estudo é criada, e as árvores são desenvolvidas agrupando os indivíduos com menor diferença em um fenograma. Entre os princípios que guiam a taxonomia numérica, alguns são: a melhor classificação usualmente resulta de análises baseadas em um grande número de caracteres; onde todo caractere tem o mesmo peso; as classificações são baseadas em medidas quantitativas de similaridade ou distância entre os táxons e os padrões de correlação entre caracteres podem ser usados para reconhecimento de um táxon distinto (AVISE, 2004).

A análise NJ é um método simples de evolução mínima o qual se baseia no cálculo das distâncias evolutivas para todos os indivíduos e reconstrução de uma árvore que leva em consideração as relações entre todas as distâncias (RUSSO, 2001). No caso do NJ, a metodologia não busca examinar todas as possíveis topologias, mas aquelas que produzem uma árvore refletindo a organização sequencial de vizinhos e que possam minimizar seu comprimento total (SCHENEIDER, 2001). Trata-se de um método rápido, pois requer menor capacidade computacional, é apropriado para grandes conjuntos de dados, permitindo linhagens com diferentes tamanhos de ramo e substituições múltiplas. No entanto este método

demonstra na árvore filogenética apenas uma topologia possível (NEI et al., 1998; NEI; KUMAR, 2000).

### 3.11.3 Marcador genético

Os genomas eucarióticos fornecem uma vasta gama de genes de proteínas que são codificados para análise filogenética. No entanto, a utilização destes genes para estudar filogenia deve superar alguns obstáculos, tais como o desenho dos *primers*. . Porque para a seleção dos genes codificados por proteínas, a seleção atua a nível de aminoácidos e, diferentes tripletos de DNA podem codificar o mesmo aminoácido, deste modo um *primer* que funciona para um fungo, pode não funcionar para outro intimamente relacionado. Este problema é resolvido utilizando-se *primers* degenerados, consistindo em sequências mistas que complementam vários segmentos da sequência padrão. O sequenciamento de proteínas de genes de codificação, tais como calmodulina, fator de alongamento, quitina sintase e tubulina entre outros, vem para resolver problemas taxonômicos em diferentes grupos de fungos (GILGADO et al. 2005; LIU; LIN, 2001; O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998).

A calmodulina é uma proteína de ligação ao cálcio, atuando como um mediador dos íons cálcio em muitos sistemas biológicos. Está presente em todas as células eucarióticas e sua ação ocorre através de uma série de proteína quinase dependente. A quitina sintetase é a enzima responsável pela síntese de quitina, um polissacarídeo que fornece estruturas que têm grande resistência mecânica. A tubulina é uma proteína globular polar com uma sequência de aminoácidos altamente conservados evolutivamente. Tubulina é a unidade estrutural básica que forma os microtúbulos, um importante componente do citoesqueleto. O fator de alongamento é uma proteína encontrada no citoplasma e está envolvida na fase de tradução durante o crescimento da cadeia polipeptídica (O'DONNELL; CIGELNIK; NIRENBERG, 1998; LIU; LIN, 2001; GILGADO et al., 2005).

Sessenta isolados de *Sporothrix* de diferentes regiões do mundo tiveram seus DNAs extraídos, amplificados, sequenciados e classificados em seis possíveis espécies filogenéticas por Marimon et al. (2007). Regiões de sequências de genes nucleares foram amplificadas por PCR: o gene da quitina sintetase com *primers* CHS-79F e CHS-354R, o gene da calmodulina com *primer* CL1 e CL2A e gene  $\beta$ -tubulina com *primers* desenhados pelos próprios autores. Nestas condições a espécie *Sporothrix schenckii* revelou-se como um

complexo de espécies, com algumas delas prevalecendo em regiões geográficas específicas. Ao mesmo tempo os autores sugeriram que tais espécies poderiam se constituir num importante achado para a clínica, já que poderiam estar relacionados a distintos padrões clínicos e evidenciar diferentes respostas a antifungoterapia (MARIMON et al., 2006).

## 4 ARTIGOS

### 4.1 Artigo 1

#### Antifungal Susceptibilities of *sporothrix albicans*, *s. Brasiliensis*, and *s. Luriei* of the *s. Schenckii* Complex Identified in Brazil

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2011, p. 3047–3049  
0095-1137/11/\$12.00 doi:10.1128/JCM.00255-11  
Copyright © 2011, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 49, No. 8

#### Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil<sup>†</sup>

Daniele C. Oliveira,<sup>1</sup> Paulo G. Markus Lopes,<sup>1</sup> Tatiana B. Spader,<sup>1</sup> Camila D. Mahl,<sup>1</sup>  
Giordano R. Tronco-Alves,<sup>2</sup> Valeria M. Lara,<sup>1</sup> Janio M. Santurio,<sup>1</sup>  
and Sydney Hartz Alves<sup>1\*</sup>

Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS,  
Brazil,<sup>1</sup> and Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil<sup>2</sup>

Received 4 February 2011/Returned for modification 25 April 2011/Accepted 25 May 2011

We studied 40 strains of the species complex formerly classified as the single species *Sporothrix schenckii* to identify new species within this complex and evaluate their antifungal susceptibility profiles. Based on phenotypic tests (ability to grow at 37°C, colony diameters, and pigmentation of the colonies, as well as assimilation of sucrose and raffinose) and molecular assays (amplification of a fragment of the calmodulin gene), here we report the identification of *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. luriei*, and *S. schenckii*; two isolates of these species were detected as itraconazole-resistant strains.

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis affecting humans and animals caused by *Sporothrix schenckii*. It has a worldwide distribution, especially in tropical and subtropical areas of Latin America, where areas of endemicity have been recognized (1, 3, 4, 12). Recently, Marimon et al. (9, 11) proposed that *Sporothrix schenckii* is a complex encompassing six cryptic species that had been previously identified by others (4). In this context, variation in the antifungal susceptibility profiles among these new species was hypothesized. The aim of this study was to explore a collection of 40 isolates formerly classified as *Sporothrix schenckii* in order to identify new species and evaluate their susceptibility to antifungal agents.

The isolates were from cases of human ( $n = 31$ ) and animal ( $n = 9$ ) sporotrichosis diagnosed in the hinterlands of Rio Grande do Sul (Brazil) and were maintained in the Department of Microbiology of the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Brazil. Among the human-derived strains, 18 (58.06%) were from fixed cutaneous sporotrichosis and 13 (41.9%) were from the lymphocutaneous form of the mycosis. Of the strains isolated from animals ( $n = 9$ ), eight were from cats and one (*S. luriei*) was isolated from a dog with sporotrichosis. As proposed by Marimon et al. (9, 11), the phenotypic tests included the ability/inability to grow at 37°C on potato dextrose agar (PDA; HiMedia, Mumbai, India), different colony diameters (mm) after 21 days of incubation at 30°C on PDA, the pigmentation of the colonies on cornmeal agar (CMA), and the assimilation of sucrose and raffinose. The susceptibility tests were conducted according to the procedures proposed for the M38-A2 technique (2). For molecular identification, a fragment of the calmodulin (CAL) gene was amplified from genomic DNA using the degenerate primers CL1

[5'-GA(GA)T(AT)CAAAGGAGGCCTTCTC-3'] and CL2A (5'-TTTTTGCATCATGACTTGGAC-3') (9). DNA sequencing was performed on the purified amplicons using a MegaBace 500 automatic sequencer. The sequences were aligned against sequences available in GenBank with ClustalX (version 1.8) followed by manual adjustments with a text editor. The phylogenetic analysis was performed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) software version 4.0 (17).

Based on recently proposed procedures (9, 11), we phenotypically identified four species: *Sporothrix schenckii* ( $n = 37$ ), *Sporothrix brasiliensis* ( $n = 1$ ), *Sporothrix luriei* ( $n = 1$ ), and *Sporothrix albicans* ( $n = 1$ ). The phenotypic identification was easy to perform and was concordant with the molecular findings. The molecular sequencing confirmed 37 isolates as *Sporothrix schenckii*. The GenBank search also revealed three new species: (i) strain PG1 (*Sporothrix brasiliensis*) (GenBank accession no. HQ404315), (ii) strain PG2 (*Sporothrix schenckii* var. *luriei*) (GenBank accession no. HQ404316), and (iii) strain PG3 (*Sporothrix albicans*) (GenBank accession no. HQ404317), all showing high bootstrap support values (Fig. 1) and corresponding with the species identified in the phenotypic tests. Based on studies by Marimon et al. (9) and reinforced by Romeo et al. (13), only the sequencing of highly informative genetic loci such as the calmodulin-encoding gene is, at present, useful for elucidating relationships and differentiating among cryptic species of the *S. schenckii* complex. The new species, *S. brasiliensis*, *S. luriei*, and *S. albicans*, were isolated from feline, canine, and feline sporotrichosis, respectively. To date, *S. brasiliensis* has been associated only with human sporotrichosis (9). Table 1 describes the susceptibility parameters, highlighting terbinafine as the most active drug. By restricting the comparisons to studies employing the same susceptibility tests, our results are in accordance with those of Marimon et al. (10) and Silveira et al. (15). Terbinafine, ketoconazole, and amphotericin B showed the best activities, while fluconazole (MIC range, 32 to 128 µg/ml) and caspofungin (MIC range, 8 to 32 µg/ml) were less active. The results of our tests with itraconazole against *S.*

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology and Parasitology, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Santa Maria 97010-033, Brazil. Phone and fax: 55 55 21 3220 8906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br.

<sup>†</sup> Published ahead of print on 8 June 2011.



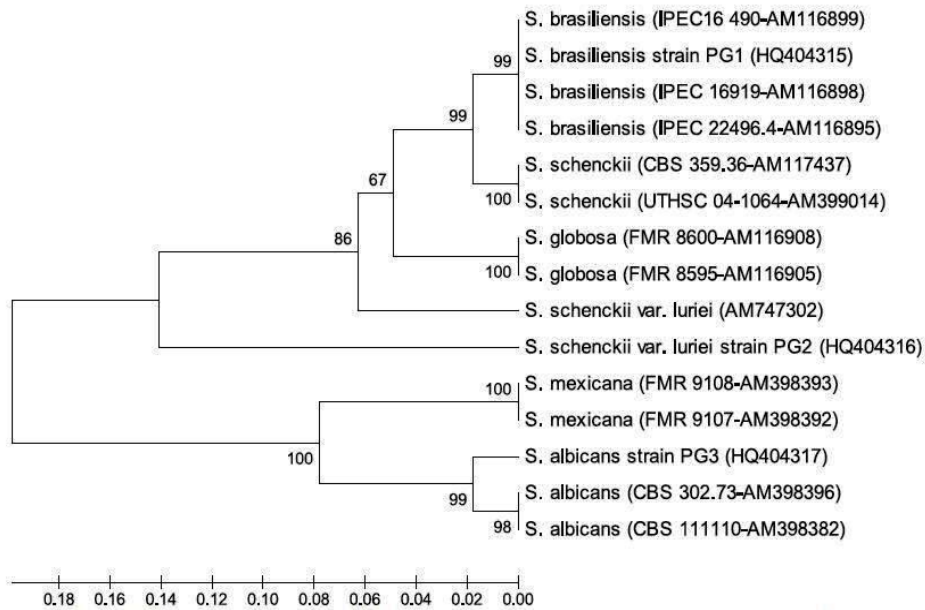


FIG. 1. Evolutionary relationship of 15 taxa (linearized). The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method (14). The optimal tree is shown, with the sum of branch lengths = 0.63953762. The percentages of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches (5). The tree is drawn to scale, and branch lengths are in the same units as the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the maximum composite likelihood method (16) and are in units representing the number of base substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the data set (complete deletion option). There were a total of 265 positions in the final data set. Phylogenetic analyses were conducted with MEGA software version 4.0 (17).

*brasiliensis* and *S. albicans* agreed with the results reported by Marimon et al. (10), but in general, our *S. schenckii* strains were more susceptible. *S. schenckii* has been reported to show a high MIC to itraconazole by several authors (6, 7, 10). Although breakpoints have not been established for *S. schenckii*, document M38-A3 (2) suggests that, for analytical purposes, a MIC of  $\geq 4.0$   $\mu\text{g/ml}$  for itraconazole may be considered resistant for some filamentous fungi. In keeping with this finding, the itraconazole-resistant strains (*S. albicans* and *S. luriei*) showed cross-resistance with all other azoles. Kohler et al. (7) and Meinerz et al. (12), prior to the studies of Marimon et al. (9), reported that isolates from animals were more resistant to itraconazole than isolates from humans. This observation was

supported by our results because, among 9 strains from animals, 2 showed itraconazole resistance, and among 31 strains from human cases of sporotrichosis, none showed itraconazole resistance. In addition, our results indicated the presence of the greater proportion of itraconazole-resistant species in animal sporotrichosis (2/9) than in human sporotrichosis (0/31). Although the Mann-Whitney test did not show differences between the two groups, the geometric mean showed that in general *S. schenckii* animal-derived isolates were more susceptible than human-derived isolates. However, when the new *Sporothrix* species (*S. albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei*) were included, the animal-derived strains showed less sensibility to azoles than human-derived strains. The MIC values for am-

TABLE 1. Parameters of susceptibilities of the new *Sporothrix* species to antifungal agents

Antifungal agent <sup>a</sup>	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for isolates from <sup>b</sup> :											
	Humans ( <i>S. schenckii</i> ; n = 31)				Animals (n = 9)							
	Range	50%	90%	GM	<i>S. schenckii</i> (n = 6)				<i>S. brasiliensis</i> (n = 1)	<i>S. albicans</i> (n = 1)	<i>S. luriei</i> (n = 1)	GM
				Range	50%	90%	GM					
ITZ	0.06–1	0.25	0.5	0.261	0.06–0.5	0.125	0.5	0.14	0.25	32	32	0.46
KTZ	0.125–2	0.5	0.5	0.37	0.06–2	0.125	2	0.26	0.5	4	4	0.5
MCZ	0.5–4	1	2	1.25	0.5–1	0.5	1	0.63	2	8	8	1.26
VCZ	2–16	8	8	6.39	1–16	4	16	5.66	8	4	2	5.03
FLZ	16–128	128	128	87.52	64–128	64	128	90.5	64	128	64	87.1
TRB	0.03–0.25	0.125	0.25	0.12	0.06–0.25	0.125	0.25	0.14	0.25	0.125	0.25	0.16
AMB	0.03–2.0	0.25	1	0.34	0.03–0.25	0.125	0.25	0.08	0.5	1	0.5	0.16
CAS	8–32	32	32	25.58	8–32	8	32	11.31	16	32	32	14.81

<sup>a</sup> ITZ, itraconazole; KTZ, ketoconazole; MCZ, miconazole; VCZ, voriconazole; FLZ, fluconazole; TRB, terbinafine; AMB, amphotericin B; CAS, caspofungin.

<sup>b</sup> 50% and 90%, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>, respectively; GM, geometric mean.

photericin B and terbinafine were similar for both groups of strains. Due to the low number of animal isolates included here, these observations require further studies.

Finally, our findings emphasize two main points. (i) *S. luriei* had a remarkable azole resistance, as reported here for the first time. (ii) The recent studies focusing on the susceptibility of the former species *S. schenckii* (8, 15) or the new *Sporothrix* species (9, 10) included strains from different countries. However, here we included only strains isolated in the central region of Rio Grande do Sul State. Even in this limited area, we found a varied susceptibility profile to antifungal agents and detected four of the six new *Sporothrix* species. Therefore, our findings reinforce the importance of identifying *Sporothrix* isolates as proposed by Marimon et al. (9) and of evaluating their susceptibility patterns to better determine the best therapeutic option for each case of sporotrichosis.

We report that we have no conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Alves, S. H., et al. 2010. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 43:523–525.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for filamentous fungi: approved standard. Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- da Rosa, A. C., et al. 2005. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. *J. Am. Acad. Dermatol.* 52:451–459.
- de Oliveira, M. M. E., et al. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia* 169:359–363.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783–791.
- Gutierrez-Galhardo, M. C., R. M. Zancopé-Oliveira, A. Monzón, J. L. Rodríguez-Tudela, and M. Cuenca-Estrella. 2010. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. *Mycoses* 53:227–231.
- Kohler, L. M., P. C. F. Monteiro, R. C. Hahn, and J. S. Hamdan. 2004. *In vitro* susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazole and terbinafine. *J. Clin. Microbiol.* 42:4319–4320.
- Madrid, H., et al. 2009. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. *Rev. Iberoam. Micol.* 26:218–222.
- Marimon, R., et al. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 45:3198–3206.
- Marimon, R., C. Serena, J. Gené, J. Cano, and J. Guarro. 2008. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:732–734.
- Marimon, R., J. Gené, J. Cano, and J. Guarro. 2008. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol.* 46:621–625.
- Meinerz, A. R. M., et al. 2007. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a terbinafina e itraconazol. *Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.* 40:60–62.
- Romeo, O., F. Scordino, and G. Criseo. 14 December 2010, posting date. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia* doi:10.1007/s11046-011-9420-z.
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406–425.
- Silveira, C. P., et al. 2009. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *J. Med. Microbiol.* 58:1607–1610.
- Tamura, K., M. Nei, and S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:11030–11035.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596–1599.

## 4.2 Artigo 2<sup>1</sup>

### *Sporothrix schenckii*, *S. luriei*, *S. brasiliensis* and *S. albicans*: Susceptibilities to Combinatorial Antifungal Agents and Characterization of Enzymatic Profiles

**Authors:** Oliveira, D. C.<sup>1,2</sup>; Loreto, E. S.<sup>1,2</sup>; Lopes, P. G. M.<sup>1,2</sup>; Neves, L. V.<sup>1,2</sup>; Rocha, M. P.<sup>2</sup>; Santurio, J. M.<sup>1,2</sup>; Alves, S. H.<sup>1,2\*</sup>

#### Institution address:

Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, Santa Maria-RS, Brasil, 97105-900.

<sup>1</sup> Submetido.

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil.

\*Corresponding author: Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, Rua Andradas 1985/201, 97010-033. Santa Maria - RS. Phone/Fax: +55 32208906. E-mail: hartzsa@smail.ufsm.br

**Abstract**

We evaluated the susceptibility of *Sporothrix albicans* (n=1), *S. brasiliensis* (n=1), *S. luriei* (n=1) and *S. schenckii* (n=37) to terbinafine (TRB) alone and in combination with itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ) and voriconazole (VRZ) by a checkerboard microdilution method and also determined the enzymatic profile of these species with the API-ZYM kit. Most interactions were additive (27.5%, 70% and 2.5%) or indifferent (35%, 52.5% and 55%) for TRB+KTZ, TRB+ITZ and TRB+VRZ, respectively. Antagonisms were observed in 42.5% of isolates for the TRB+VRZ combination. Based on enzymatic profiling, the *Sporothrix schenckii* strains that were tested could be categorized into 15 separate biotypes, with the major biotype accounting for 37.8% of strains with positive reactions to esterase, esterase lipase, alkaline phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase and  $\beta$ -glucosidase. Lipase and leucine arylamidase activity were observed only for *S. albicans* and *S. brasiliensis*, respectively. *S. luriei* was the only strain for which naphthol-AS-BI-phosphohydrolase activity was not observed. These results will contribute to a better understanding of virulence and resistance among species of the genus *Sporothrix* in future studies.

**Keywords:** *Sporothrix*, enzyme, profile, synergism, antifungal association

**1. Introduction**

Sporotrichosis is caused by the dimorphic fungus *Sporothrix schenckii*, which is one of the predominant microorganisms responsible for cutaneous and lymphocutaneous mycosis, affecting humans and animals. The sporotrichosis has a worldwide distribution, especially in



tropical and subtropical areas of Latin America where endemic areas have been recognized (Barros et al., 2001; da Rosa et al., 2005; Freitas et al., 2010). Furthermore, an increase in the frequency of sporotrichosis as an opportunistic disease has been observed in the last few years, and this increase is associated with significant morbidity and mortality rates in immunocompromised patients (Freitas et al., 2011; Hardman et al., 2005; Silva-Vergara et al., 2005).

For many years, local hyperthermia and oral potassium iodide solution have been therapeutic options for the treatment of sporotrichosis (Díaz, 2011; Xue and Li, 2009). Additionally, with over 50 years of clinical use, amphotericin B (AMB) is still considered the “gold standard” for the treatment of serious fungal infections. However, the use of AMB is associated with significant adverse effects related to toxicity (Kauffman et al., 2007). Currently, according to *Clinical Practice Guidelines for the Management of Sporotrichosis* (Kauffman et al., 2007), monotherapy with itraconazole is the first choice for subcutaneous sporotrichosis treatment. Although treatment with itraconazole has been shown to elicit an excellent therapeutic response in humans (Barros et al., 2011), reports of sporotrichosis refractory to oral itraconazole treatment have been described, particularly in animals.

*In vitro* susceptibility studies for terbinafine have been encouraging (Meinerz et al., 2007; Silveira et al., 2009), and three studies using terbinafine with human patients showed good efficacy (Francesconi et al., 2011; Meinerz et al., 2007). Additionally, cases of refractory and disseminated sporotrichosis have been treated with a combination of antifungal drugs with satisfactory results (Bunce et al., 2011; Gremiao et al., 2011).

Recently, it was proposed that *Sporothrix schenckii* is a species complex encompassing six cryptic species (Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008a), which calls for the reassessment of clinical and epidemiological data, principally with regard to variation in antifungal susceptibility and virulence (Arrillaga-Moncrieff et al., 2009; Marimon et al., 2008b; Oliveira et al., 2011). In this context, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* susceptibility of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, *S. luriei* and *S. schenckii* to terbinafine in combination with itraconazole, ketoconazole or voriconazole as well as the enzymatic profile of these species.

## **2. Material and methods**

### *2.1. Microorganisms*

Isolates were obtained from human (18 fixed cutaneous sporotrichosis isolates and 13 lymphocutaneous sporotrichosis isolates), feline (n=8) and canine (n=1) cases of sporotrichosis diagnosed in the hinterlands of Rio Grande do Sul (Brazil) and were maintained in the Department of Microbiology of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil. *S. schenckii* (n=37), *S. albicans* (n=1), *S. brasiliensis* (n=1) and *S. luriei* (n=1) were previously identified by phenotypic and molecular tests (Oliveira et al., 2011).

### 2.2. Antifungal drugs, *in vitro* susceptibility and drug interactions test

The antifungal agents itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ) (ITZ and KTZ: Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), terbinafine (TRB) (Novartis, Basel, Switzerland) and voriconazole (VRZ) (Pfizer, Rome, Italy) were obtained commercially. Susceptibility tests were performed according to the CLSI protocol M38-A2 microdilution technique (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008). *Aspergillus flavus* (ATCC 204304) was included as a control strain. Drug interactions were evaluated by the checkerboard method (Velasquez et al., 2000), and the fractional inhibitory concentration (FIC) was calculated for each agent by dividing the minimal inhibitory concentration (MIC) of each drug in combination by the MIC of the drug alone. When computing the FIC index, off-scale MICs (itraconazole: >16 µg/ml and >128 µg/ml for *S. luriei* and *S. albicans*, respectively) were converted to the next highest concentration (32 and 256 µg/ml, respectively).

FIC values were then summed to determine the fractional inhibitory concentration index (FICI) resulting from the combination. Synergism was defined as  $FICI \leq 0.5$  and additionally as  $0.5 < FICI \leq 1.0$ . Indifference was defined as  $1.0 < FICI \leq 4$ , whereas antagonism was defined as  $FICI > 4$  (Johnson et al., 2004).

### 2.3. Enzymatic profile

Enzymatic activity was determined using the API-ZYM<sup>®</sup> commercial kit system (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The kit consists of 19 enzymatic substrates: alkaline phosphatase (KP), esterase (ES), esterase lipase (EL), lipase (LP), leucine arylamidase (LA), valine arylamidase (VA), cystine arylamidase (CA), trypsin (TR),  $\alpha$ -chymotrypsin (CH), acid phosphatase (AP), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (NP),  $\alpha$ -galactosidase (GL),  $\beta$ -galactosidase (GA),  $\beta$ -glucuronidase (GU),  $\alpha$ -glucosidase (GC),  $\beta$ -glucosidase (GS), N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NG),  $\alpha$ -mannosidase (MN) and  $\alpha$ -fucosidase (FU).

To prepare a conidia suspension with a turbidity of 5-6 McFarland in API suspension medium (2 mL), 65 µL of liquid phase from incubated cultures was added to each cupule of the APY-ZYM<sup>®</sup> tray and maintained at 37°C for 4 h. Tests were carried out in triplicate. The enzymatic activities of all strains were analyzed, and the results of reactions were recorded. Interpretation of the results was based on the production and intensity of color development: 0 corresponded to a negative reaction, 5 to a reaction of maximum intensity and values 1, 2, 3, and 4 were intermediate reactions with varying levels of intensity, but according to the kit only to intensities 3 and 4 being considered positive intermediate reactions).

### 3. Results

The results of the *in vitro* susceptibility test, FIC index and the resulting drug interactions against the 40 *Sporothrix* isolates are described in Table 1. MICs ranged from 0.03 to 0.25 µg/mL for TRB, 0.06 to 4.0 µg/mL for KTZ, 0.03 to >128 µg/mL for ITZ and 1.0 to 16 µg/mL for VRZ. The MIC of the control strain (*A. flavus* ATCC 204304) was within the range provided by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008).

When TRB was combined with KTZ, ITZ or VRZ, synergism was observed only with 1 isolate (2.5%) for TRB+ITZ. Additive interactions were observed for TRB+KTZ (27.5% of isolates), TRB+ITZ (35% of isolates) and TRB+VRZ (2.5% of isolates). Most interactions were indifferent, as was the case for TRB+KTZ (70% of isolates), TRB+ITZ (52.5% of isolates) and TRB+VRZ (55% of isolates). Antagonism was observed only with 1 isolate when TRB was combined with KTZ, with 4 (10%) isolates for the TRB+ITZ combination and with 17 (42.5%) isolates for the TRB+VRZ combination.

The enzymatic profiles of the *Sporothrix* spp. analyzed using the API ZYM<sup>®</sup> system are listed in Table 2. Based on the 19 substrate sources assimilated, the 37 isolates of *Sporothrix schenckii* tested could be categorized into 15 separate biotypes, with the major biotype accounting for 37.8% of isolates with positive reactions for ES, EL, AP, NP and GS. *S. brasiliensis*, *S. albicans* and *S. luriei* strains presented unique and very unusual features, as shown in Table 2. *S. brasiliensis* was the only species that showed lipase activity, and *S. albicans* was the only strain with a positive reaction for LA. NP activity was absent only in *S. luriei*. AP and GS activities were observed for all isolates (Table 2).

### 4. Discussion

To overcome antifungal resistance and the toxicity of monotherapy with AMB, antifungal combinations represent an alternative approach to enhance the efficacy of

individual drugs and lower dosages; these combinatorial drug treatments may result in reduced toxicity and therapeutic success for cases that do not respond to treatment with single antifungal agents. High success rates for the treatment of sporotrichosis with ITZ alone (Barros et al., 2011) have not encouraged the use of antifungal combinations against *Sporothrix* spp. in the past few years. However, the recent description of *Sporothrix* complex species that are refractory to ITZ treatment has stimulated the search for combinatorial antifungal therapeutic alternatives to treat sporotrichosis (Bunce et al., 2011; Gremiao et al., 2011; Zhang et al., 2011).

Interestingly, in our study, *S. luriei* and *S. albicans*, which were isolated from feline and canine sporotrichosis, respectively, were the only isolates resistant to ITZ. Compared to the ITZ susceptibility described in most cases of human sporotrichosis (Barros et al., 2011), it appears that animal sporotrichosis is more refractory to treatment with ITZ (Gremiao et al., 2011) and can also be associated with non-*S. schenckii* species. This finding reinforces the importance of correctly identifying *Sporothrix* species, especially in cases of animal sporotrichosis, for adequate treatment.

Taking this into account, we evaluated the activity of TRB, the second choice for subcutaneous sporotrichosis treatment (Kauffman et al., 2007), in association with ITZ, KTZ and VRZ. The TRB+KTZ and TRB+ITZ combinations produced indifferent and additive interactions for 97.5% and 87.5% of isolates, respectively. These data are in accordance with Zhang et al. (2011), who found predominantly additive and indifferent interactions with TRB+ITZ, and highlight the use of TRB alone or in combination with other antifungal agents in sporotrichosis cases that are not responsive to ITZ treatment.

We observed that VRZ demonstrated the highest MICs against *Sporothrix* spp. when compared to KTZ and ITZ. This reduced susceptibility has been previously described (Alvarado-Ramirez and Torres-Rodriguez, 2007; Gutierrez-Galhardo et al., 2010; Marimon et al., 2008b), and the TRB+VRZ combination employed here predominantly showed indifferent (55%) and antagonistic (42%) interactions. Thus, the use of VRZ alone or in combination with TRB in sporotrichosis treatment does not appear to be advantageous.

Research has demonstrated the ability of fungi to produce extracellular enzymes such as proteases, lipases, keratinases and others, which represents a useful tool to identify microorganisms and thus provides an understanding of the relationships between enzyme production and pathogenicity. The use of the API ZYM<sup>®</sup> system to study the enzymatic profiles of different fungal species was previously reported (Coutinho and Paula, 2000; Garcia et al., 1997; Leone et al., 1998; Saenz-de-Santamaria et al., 2006). The Api Zym<sup>®</sup> detection

system can be considered as a suitable option for the characterization of *S. luriei*, *S. albicans*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, which present well-defined profiles.

Our results demonstrated high intraspecific variability for the enzymatic activity of *S. schenckii* strains and revealed the presence of 15 different biotypes. The main biotype (35% of *S. schenckii*) demonstrated ES, EL, AP, NP and GS activities, and these enzymatic activities were also observed for *S. albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei*, with the exception of negative NP activity for *S. luriei*. Thus, these enzymes could be associated with virulence factors required for the development of sporotrichosis.

Differential identification of the *Sporothrix* complex by phenotype is based on the size of radial colony growth, the morphology of conidia, the assimilation of sucrose and raffinose and the ability to grow at 37°C (Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008a). Considering that *S. brasiliensis* was the only species to show LP activity, *S. albicans* was the only strain to show LA activity and *S. luriei* was the only strain that did not demonstrate NP activity, it is suggested that tests for differential enzymatic activity may be used in association with other phenotypic tests to identify *Sporothrix* species. Further studies with a larger number of non-*schenckii* species are required for the development of tests to compare the intraspecific characteristics of the *Sporothrix* complex.

In conclusion, the *in vitro* combinations of TRB with KTZ and TRB with ITZ were shown to be advantageous compared to use of these drugs individually, but antagonism was common with the TRB+VRZ combination. The enzymatic screening data represent a significant addition to the available methods for phenotypic characterization of new *Sporothrix schenckii* complex species as well as an interesting area for further research to identify and explore the virulence of the *Sporothrix* complex.

### **Acknowledgments**

We thank the Brazilian agencies CAPES for their support. Érico Silva Loreto is the recipient of a PNPD-CAPES fellowship.

### **References**

Alvarado-Ramirez, E., Torres-Rodriguez, J.M., 2007. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Ch* 51, 2420-2423.



- Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Marine, M., Gene, J., Cano, J., Guarro, J., 2009. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clin Microbiol Infec* 15, 651-655.
- Barros, M.B.D., Schubach, A.O., de Oliveira, R.D.C., Martins, E.B., Teixeira, J.L., Wanke, B., 2011. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole-Study of 645 patients. *Clin Infect Dis* 52, E200-E206.
- Barros, M.B.D., Schubach, T.M.P., Galhardo, M.C.G., Schubach, A.D., Monteiro, P.C.F., Reis, R.S., Zancope-Oliveira, R.M., Lazera, M.D., Cuzzi-Maya, T., Blanco, T.C.M., Marzochi, K.B.F., Wanke, B., do Valle, A.C.F., 2001. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem I Oswaldo Cruz* 96, 777-779.
- Bunce, P.E., Yang, L., Chun, S., Zhang, S.X., Trinkaus, M.A., Matukas, L.M., 2011. Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. *Med Mycol*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute., 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd Edition. M38-A2. CLSI, Wayne, PA, x, 35 p. pp.
- da Rosa, A.C.M., Scroferneker, M.L., Vettorato, R., Gervini, R.L., Vettorato, G., Weber, A., 2005. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol* 52, 451-459.
- Díaz, I.A.C., 2011. La termoterapia local como tratamiento de la esporotricosis cutánea. *Rev Med Urug* 27, 50-55.
- Francesconi, G., Francesconi do Valle, A.C., Passos, S.L., de Lima Barros, M.B., de Almeida Paes, R., Curi, A.L., Liporage, J., Porto, C.F., Galhardo, M.C., 2011. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. *Mycopathologia* 171, 349-354.
- Freitas, D.F., de Siqueira Hoagland, B., Do Valle, A.C., Fraga, B.B., de Barros, M.B., de Oliveira Schubach, A., de Almeida-Paes, R., Cuzzi, T., Rosalino, C.M., Zancope-Oliveira, R.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., 2011. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*.
- Freitas, D.F.S., do Valle, A.C.F., Paes, R.D., Bastos, F.I., Galhardo, M.C.G., 2010. Zoonotic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: a protracted epidemic yet to be curbed. *Clin Infect Dis* 50, 453.

- Garcia, M.E., Blanco, J.L., Kurup, V.P., 1997. Immunochemical reactivity of *Aspergillus fumigatus* antigens from different sources. *Rev Iberoam Micol* 14, 55-59.
- Gremiao, I.D.F., Schubach, T.M.P., Pereira, S.A., Rodrigues, A.M., Honse, C.O., Barros, M.B.L., 2011. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Aust Vet J* 89, 346-351.
- Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancope-Oliveira, R.M., Monzon, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., 2010. Antifungal susceptibility profile in vitro of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. *Mycoses* 53, 227-231.
- Hardman, S., Stephenson, I., Jenkins, D.R., Wiselka, M.J., Johnson, E.M., 2005. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with SIDA. *J Infect* 51, e73-77.
- Johnson, M. D. et al. 2004. Combination antifungal therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 693-715.
- Kauffman, C.A., Bustamante, B., Chapman, S.W., Pappas, P.G., 2007. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the infectious diseases society of America. *Clin Infect Dis* 45, 1255-1265.
- Leone, R., Buonomo, S., Nakamura, K., Aoki, S., Vidotto, V., 1998. Enzymatic profile of *Cryptococcus neoformans* strains by using the API-ZYM system. *Rev Iberoam Micol* 15, 136-140.
- Marimon, R., Cano, J., Gene, J., Sutton, D.A., Kawasaki, M., Guarro, J., 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J Clin Microbiol* 45, 3198-3206.
- Marimon, R., Gene, J., Cano, J., Guarro, J., 2008a. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Med Mycol* 46, 621-625.
- Marimon, R., Serena, C., Gen, J., Cano, J., Guarro, J., 2008b. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Ch* 52, 732-734.
- Meinerz, A.R.M., Nascente, P.D., Schuch, L.F., Cleff, M.B., Santin, R., Brum, C.D., Nobre, M.D., Meireles, M.C.A., Mello, J.R.D., 2007. In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. *Rev Soc Bras Med Tro* 40, 60-62.
- Oliveira, D.C., Lopes, P.G.M., Spader, T.B., Mahl, C.D., Tronco-Alves, G.R., Lara, V.M., Santurio, J.M., Alves, S.A., 2011. Susceptibilities to antifungal agents of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol* doi:10.1128/JCM.00255-11.

- Saenz-de-Santamaria, M., Guisantes, J.A., Martinez, J., 2006. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). *Mycoses* 49, 288-292.
- Silva-Vergara, M.L., Maneira, F.R.Z., de Oliveira, R.M., Santos, C.T.B., Etchebehere, R.M., Adad, S.J., 2005. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with SIDA. *Med Mycol* 43, 187-190.
- Silveira, C.P., Torres-Rodriguez, J.M., Alvarado-Ramirez, E., Murciano-Gonzalo, F., Dolande, M., Panizo, M., Reviakina, V., 2009. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *J Med Microbiol* 58, 1607-1610.
- Velasquez, S., Bailey, E., Jandourek, A., 2000. Evaluation of the antifungal activity of Amphotericin B in combination with Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole or Posiconazole against *Candida* species using a Checkerboard method. *Clin Infect Dis* 31, 266-266.
- Xue, S.L., Li, L., 2009. Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. *Mycopathologia* 167, 355-356.
- Zhang, X.H., Huang, H.Q., Feng, P.Y., Zhang, J., Zhong, Y., Xue, R.Z., Xie, Z., Li, M.R., Xi, L.Y., 2011. *In vitro* activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. *Eur J Dermatol* 21, 573-576.

**Table 1:** *In vitro* susceptibility and interactions between terbinafine (TRB), itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ), and voriconazole (VRZ) against clinical isolates of *Sporothrix schenckii* (SS), *Sporothrix brasiliensis* (SB), *Sporothrix luriei* (SL) and *Sporothrix albicans* (SA).

Isolate	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )				MIC combination			MIC combination			MIC combination		
	TRB	KTZ	ITZ	VRZ	TRB/KTZ	FICI	Int <sup>1</sup>	TRB/ITZ	FICI	Int <sup>1</sup>	TRB/VRZ	FICI	Int <sup>1</sup>
SB01	0.25	0.5	0.25	8	0.125/0.25	1.00	Ad	0.125/0.25	1.50	I	0.5/0.5	2.06	I
SS02	0.25	0.25	0.125	8	0.125/0.125	1.00	Ad	0.03/0.125	1.12	I	0.25/0.25	1.03	I
SS03	0.125	0.25	0.125	2	0.125/0.25	2.00	I	0.016/0.125	1.12	I	0.25/0.25	3.0	I
SS04	0.06	0.125	0.125	4	0.125/0.03	2.33	I	0.125/0.25	2.0	I	0.25/0.25	4.23	A
SS05	0.25	0.25	0.125	8	0.125/0.25	1.50	I	0.125/0.25	2.0	I	0.5/0.5	2.06	I
SS06	0.03	0.5	0.5	4	0.016/0.5	1.52	I	0.016/0.125	0.77	Ad	0.25/0.25	8.36	A
SS07	0.125	0.25	0.25	4	0.125/0.25	2.00	I	0.016/0.125	0.62	Ad	0.5/0.5	4.12	A
SS08	0.25	0.5	0.25	8	0.125/0.25	1.00	Ad	0.125/0.25	2.0	I	0.25/0.125	1.02	I
SS09	0.06	0.25	0.125	8	0.125/0.25	3.08	I	0.125/0.125	3.08	I	0.25/0.125	4.18	A
SS10	0.125	0.125	0.03	4	0.125/0.25	2.00	I	0.125/0.25	2.0	I	0.25/0.25	2.06	I
SS11	0.03	0.125	0.125	8	0.016/0.5	4.52	A	0.016/0.125	1.52	I	0.25/0.25	8.36	A
SS12	0.25	0.5	0.5	8	0.125/0.125	0.75	Ad	0.016/0.125	0.31	S	0.25/0.25	1.03	I
SS13	0.25	0.06	0.03	1	0.25/0.016	1.26	I	0.5/0.016	2.52	I	1.0/0.016	4.01	A
SS14	0.06	0.25	0.25	8	0.125/0.25	3.00	I	0.016/0.125	0.76	Ad	1.0/0.25	16.7	A
SS15	0.125	0.125	0.125	4	0.125/0.25	3.00	I	0.25/1.0	10.0	A	1.0/0.5	8.13	A
SS16	0.25	0.5	0.25	8	0.125/0.125	0.75	Ad	0.016/0.125	0.56	Ad	0.25/0.125	1.02	I
SS17	0.125	0.125	0.125	16	0.125/0.125	2.00	I	0.016/0.125	1.13	I	0.25/0.125	2.00	I
SS18	0.03	0.5	0.25	4	0.016/1.0	2.52	I	0.016/0.125	1.02	I	0.25/0.125	8.36	A
SS19	0.125	2	0.5	16	0.016/1.0	0.62	Ad	0.06/0.125	0.75	Ad	0.25/0.25	2.01	I
SS20	0.25	0.25	0.125	8	0.125/0.25	1.50	I	0.125/0.25	2.5	I	1.0/0.5	4.06	A
SS21	0.125	0.5	0.25	16	0.125/0.25	1.50	I	0.031/0.25	1.25	I	0.25/0.125	2.0	I
SS22	0.06	0.25	0.125	4	0.125/0.25	3.08	I	0.016/0.5	4.26	A	2.0/0.016	33.3	A
SS23	0.125	0.25	0.5	8	0.125/0.25	2.00	I	0.016/0.25	0.62	Ad	0.25/0.25	2.03	I
SS24	0.25	0.125	0.25	4	0.5/0.016	2.12	I	0.125/0.016	0.56	Ad	0.25/0.125	1.03	I
SS25	0.06	0.5	0.25	4	0.125/0.25	2.58	I	0.125/0.25	3.08	I	0.25/0.125	4.20	A
SS26	0.06	1	0.25	4	0.016/0.5	0.76	Ad	0.016/0.125	0.76	Ad	0.25/0.125	4.20	A
SS27	0.125	0.5	0.25	8	0.125/0.25	1.50	I	0.125/0.25	2.00	I	0.25/0.125	2.02	I
SS28	0.125	0.25	0.25	4	0.125/0.25	2.00	I	0.016/0.125	0.62	Ad	0.5/1.0	4.25	A
SS29	0.06	0.5	0.125	4	0.016/1.0	2.26	I	0.125/0.25	4.08	A	0.25/0.25	4.23	A
SS30	0.125	0.5	0.25	8	0.016/0.5	1.1	I	0.06/0.25	1.5	I	0.25/1.0	2.13	I
SL31	0.25	4	>16	4	0.125/0.25	0.56	Ad	0.125/0.25	0.51	Ad	0.25/1.0	1.25	I
SA32	0.25	4	>128	8	0.125/0.25	0.56	Ad	0.5/2.0	2.0	I	0.125/1.0	0.63	Ad
SS33	0.25	2	1	16	0.125/0.25	0.63	Ad	0.125/0.25	0.75	Ad	0.25/0.125	1.01	I
SS34	0.125	0.5	1	4	0.125/0.25	1.50	I	0.016/1.0	1.12	I	0.5/0.03	4.01	A
SS35	0.125	0.5	0.5	8	0.125/0.25	1.50	I	0.125/0.25	1.50	I	0.25/0.125	2.02	I
SS36	0.125	0.5	0.5	8	0.125/0.25	1.50	I	0.016/0.25	0.62	Ad	0.25/0.125	2.02	I
SS37	0.125	0.25	0.5	16	0.125/0.25	2.00	I	0.016/0.25	1.13	I	0.25/0.125	2.02	I
SS38	0.125	2	1	8	0.125/0.25	1.13	I	0.5/0.5	1.0	Ad	0.25/0.125	2.02	I
SS39	0.25	0.5	0.5	8	0.125/0.25	1.00	Ad	0.125/0.25	1.00	Ad	1/0.016	4.01	A
SS40	0.125	0.25	0.03	8	0.125/0.25	2.00	I	1.0/0.016	8.52	A	0.25/0.125	2.02	I

<sup>1</sup>Interaction; A: antagonism; Ad: additive; S: synergism; I: indifference.

**Table 2:** Enzymatic profile of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* (SS), *Sporothrix brasiliensis* (SB), *Sporothrix luriei* (SL) and *Sporothrix albicans* (SA).

Biotype	Strains showing activity for											Number of isolates (%)
	KP	ES	EL	LP	LA	AP	NP	GC	GS	NG	MN	
<b>SB</b>	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	1 (2.5)
SS	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	2 (5.0)
SS	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	3 (7.5)
SS	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	14 (35)
SS	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	1 (2.5)
SS	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	1 (2.5)
SS	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	1 (2.5)
SS	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	2 (5.0)
SS	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	3 (7.5)
SS	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	1 (2.5)
SS	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	1 (2.5)
SS	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	2 (5.0)
SS	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	3 (7.5)
SS	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	1 (2.5)
SS	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	1 (2.5)
SS	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	1 (2.5)
<b>SL</b>	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	1 (2.5)
<b>SA</b>	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	1 (2.5)
<b>TOTAL</b>	10	36	34	1	1	40	39	6	40	9	3	

<sup>a</sup> Substrates for enzymes: alkaline phosphatase (KP); esterase (ES); esterase lipase (EL); lipase (LP); leucine arylamidase (LA); acid phosphatase (AP); naphthol-AS-BI-phosphohydrolase (NP);  $\alpha$ -glucosidase (GC);  $\beta$ -glucosidase (GS); N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase (NG);  $\alpha$ -mannosidase (MN).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescente registro de casos de esporotricose em animais e no homem tornou esta micose uma importante doença em saúde pública (BARROS et al., 2004). Isto determinou a busca e o aprofundamento de pesquisas a respeito da identificação e tratamento para a infecção causada pelo *Sporothrix* spp, com a finalidade de conhecer melhor a patogenicidade da doença e o comportamento frente à antifungoterapia usual nas diferentes espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

A análise genotípica dos isolados de *Sporothrix* avaliados em nosso trabalho demonstrou que o sequenciamento do locus genético altamente informativo que codifica a calmodulina permitiu a diferenciação das espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*, o que está de acordo com os trabalhos de Marimon et al. (2007, 2008), resultando na identificação de três novas espécies: *S. brasiliensis* (n=1), *S. luriei* (n=1), e *S. albicans* (n=1), respectivamente isolada de esporotricose felina, canina e felina entre os exemplares inicialmente identificados como *S. schenckii*.

Avaliações fenotípicas como a capacidade de crescimento em PDA a 30°C, diâmetro do halo após 21 dias de incubação a 30°C em PDA, capacidade de assimilação de sacarose e ou rafinose foram também realizadas. Resultados característicos de cada espécie foram encontrados. *S. albicans* foi a única espécie capaz de crescer apresentando um halo maior de 50 mm em 21 dias a 30°C. *S. brasiliensis* apresentou resultado negativo para a fermentação de sacarose e rafinose e *S. schenckii* mostrou-se capaz de fermentar tanto a sacarose quanto a rafinose. Os resultados obtidos na análise fenotípica corroboraram com os obtidos na análise molecular.

O protocolo que padroniza a metodologia para testes de suscetibilidade com fungos filamentosos patogênicos, M38-A2 (2008) abrange, dentre outras espécies, a forma miceliana de *S. schenckii*. Os perfis de suscetibilidade *in vitro* foram assim avaliados de acordo com M38-A2 para os 40 isolados de *Sporothrix* spp, onde foram testados miconazol, itraconazol, cetoconazol, fluconazol, terbinafina, voriconazol, caspofungina e anfotericina B. As CIMs obtidas para as leveduras utilizadas no controle de qualidade, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, estiveram dentro dos limites estabelecidos pelos protocolos do CLSI (M38-A2).

Os testes de suscetibilidade frente à anfotericina B variaram em um intervalo de suscetibilidade entre 0,0312 µg/ml e 2 µg/ml com média geométrica(MG) de 0,287 µg/ml; a CIM<sub>50</sub>= 0,25 µg/ml e CIM<sub>90</sub>= 1 µg/ml. Verificamos apenas 7,32% dos isolados com CIM = 2,0 µg/mL, todos provenientes de infecções humanas e classificados como *S. schenckii*. Outros autores demonstraram um perfil de suscetibilidade com valores mais elevados de médias geométricas: 1,23 µg/mL (MCGINNIS et al., 2001), 1,73 µg/mL (TRILLES et al., 2005) e 3,1 µg/mL (MARIMON et al., 2007).

A avaliação da suscetibilidade ao miconazol evidenciou mais de 80% dos isolados com reduzida sensibilidade ao miconazol (CIM ≥ 1,0 µg/mL), com intervalo de suscetibilidade encontrado de 0,5 – 16 µg/ml e média geométrica de 1,158; a CIM<sub>50</sub>= 1 µg/ml e a CIM<sub>90</sub>= 2 µg/ml.

Quanto aos resultados frente ao fluconazol, os ensaios de suscetibilidade deste estudo evidenciaram uma faixa de suscetibilidade de 16 µg/ml a 128 µg/ml com média geométrica de 87,927 µg/ml; a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram superiores a 64 µg/ml. O perfil de suscetibilidade de *S. schenckii* evidenciou mais de 60% dos nossos isolados com CIMs de 128 µg/mL. Apesar deste perfil de suscetibilidade, o fluconazol é considerado uma possível opção terapêutica em casos de esporotricose linfocutânea ou cutânea, mas segundo Kauffman et al. (2007), o tratamento de esporotricose com altas doses (até 800 mg/dia) de fluconazol resulta em taxas de cura de no máximo 64%.

A suscetibilidade ao cetoconazol evidenciou mais de 80% dos isolados (CIM < 1,0 µg/mL). A faixa de suscetibilidade variou entre <0,0625 µg/ml e 4 µg/ml com média geométrica de 0,363 µg/ml; CIM<sub>50</sub>= 0,5 µg/ml e CIM<sub>90</sub>= 2 µg/ml. A média geométrica das CIMs aqui encontrada foi menor que a verificada por Trilles et al. (2005) (0,84 µg/mL) e por Marimon et al. (2007) (0,81 µg/mL). Por outro lado, Alvarado-Ramírez e Torres-Rodríguez (2007) verificaram uma média geométrica das CIMs de cetoconazol mais baixa (0,2 µg/mL). Ao cetoconazol, é recomendada cautela na interpretação dos testes, pois, ainda não há dados disponíveis normatizados indicando uma correlação entre a CIM e o resultado de tratamento com o mesmo (M38-A2).

O perfil de suscetibilidade ao itraconazol evidenciou variações de suscetibilidade de <0,0625 µg/ml a >128 µg/ml com média geométrica de 0,258 µg/ml; CIM<sub>50</sub>= 0,25 µg/ml e CIM<sub>90</sub>= 1 µg/ml. Tomando por base a concentração de 1 µg/ml, 85% dos isolados aqui estudados foram sensíveis a este triazólico. Kohler et al. (2006) observaram que 24% de seus isolados evidenciaram CIM ≥ 1,0 µg/ml ao itraconazol o que sugeriram como “redução da

sensibilidade”. Segundo Meinerz et al. (2007) CIMs  $\leq 1,0$   $\mu\text{g/ml}$  de itraconazol estão associadas a sensibilidade dos isolados a este triazólico.

Os resultados dos testes de suscetibilidade frente ao itraconazol estão de acordo com outros estudos anteriores (MEINERZ et al., 2007; ALVARADO-RAMÍREZ; TORRES-RODRÍGUEZ, 2007). No entanto, alguns autores observaram menor suscetibilidade de *S. schenckii* ao itraconazol com médias geométricas das CIMs calculadas em 1,56  $\mu\text{g/mL}$  (MCGINNIS et al., 2001), 1,0  $\mu\text{g/mL}$  (LÓPEZ et al., 2005), 4,08  $\mu\text{g/mL}$  (TRILLES et al., 2005) e 4,65  $\mu\text{g/mL}$  (MARIMON et al., 2007).

A suscetibilidade dos isolados de *Sporothrix spp* sugere tratar-se de um fenômeno complexo com base em observações relativas à forma clínica da esporotricose ou a procedência dos isolados: Trilles et al. (2005) observaram que os isolados da forma disseminada da esporotricose eram menos sensíveis ao itraconazol quando comparados com isolados da esporotricose cutânea.

Meinerz et al. (2007) e Kohler et al. (2004) observaram que os isolados clínicos de animais (cães e gatos) eram menos sensíveis (CIMs mais elevadas) do que isolados de esporotricose humana. Nossos resultados também permitiram observar essa característica, visto que dos nove isolados provenientes de animais, dois mostraram resistência ao itraconazol, e entre os 31 isolados de casos humanos de esporotricose, nenhum pode ser classificado como itraconazol resistente. Nossos resultados permitiram detectar duas amostras isoladas de felinos cujas CIMs ao itraconazol foram superiores a 16  $\mu\text{g/mL}$ . Mas além de serem provenientes de esporotricose animal, esses isolados foram caracterizados molecularmente como exemplares das novas espécies de *Sporothrix*: *S. albicans* e *S. luriei*.

Embora neste estudo, a quantidade de isolados de *Sporothrix spp* isolados de animais (n=9) seja menor frente aos isolados de humanos (n=31), a observação de que a menor susceptibilidade frente ao itraconazol foi observada nos isolados não-*S. schenckii* e provenientes de animais ressalta a necessidade da correta identificação e da avaliação da suscetibilidade dos isolados, especialmente os da esporotricose animal. Estudos futuros com um “n” maior de isolados provenientes de animais serão necessários para confirmar tal perfil de resistência.

As avaliações de suscetibilidade de *S. schenckii* frente ao voriconazol puderam evidenciar uma faixa de suscetibilidade de 1  $\mu\text{g/ml}$  a 16  $\mu\text{g/ml}$  e média geométrica de 6,178  $\mu\text{g/ml}$ ; a CIM<sub>50</sub>= 8  $\mu\text{g/ml}$  e CIM<sub>90</sub>= 16  $\mu\text{g/ml}$ . Outros autores já investigaram o perfil de suscetibilidade a este agente e relataram CIMs mais altas, apresentando médias geométricas de 6,5  $\mu\text{g/mL}$  (MCGINNIS et al., 2001), 9,8  $\mu\text{g/mL}$  (TRILLES et al., 2005), 13,2  $\mu\text{g/mL}$



(MARIMON et al., 2007) e 9,3 µg/mL (ALVARADO-RAMÍREZ; TORRES-RODRÍGUEZ, 2007). No entanto, González et al. (2005) declararam como potente a atividade *in vitro* do voriconazol contra *S. schenckii* com média geométrica das CIMs em 1,44 µg/mL. Mas, não há nenhuma experiência clínica documentada sobre o uso de voriconazol na esporotricose.

*Sporothrix spp*, frente aos antifúngicos avaliados, demonstrou maior sensibilidade *in vitro* à terbinafina. A faixa de suscetibilidade variou entre < 0,0312 µg/mL a 0,25 µg/mL com média geométrica de 0,127 µg/mL; a CIM<sub>50</sub>=0,125 µg/mL e CIM<sub>90</sub>= 0,25 µg/ml. Estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* do fungo à terbinafina reportam potente atividade deste fármaco. Kohler et al. (2006) descrevem 65% dos isolados com CIM ≤ 0,125 µg/mL, enquanto constatamos em nosso estudo 68% nesta condição. Trilles et al. (2005) relataram valores mais elevados para as CIMs de terbinafina (MG= 0,8 µg/mL) quando comparados aos resultados do presente trabalho. Comparando com estudos que empregam os mesmos testes de suscetibilidade, nossos resultados estão de acordo com os de Marimon et al. (2008) e Silveira et al. (2009) os quais, com base nos parâmetros de susceptibilidade, destacam a terbinafina como o antifúngico mais ativo, constituindo-se numa sugestão de opção frente aos isolados resistentes ao itraconazol (*S. albicans* e *S. luriei*). Não observamos variações na suscetibilidade à terbinafina na comparação entre os isolados de origem humana e os de origem felina, fato já observado por outros autores (KOHLENER et al., 2004; MEINERZ et al., 2007).

Embora restrita à experiência clínica, a terbinafina está indicada como segunda escolha para tratamento da esporotricose linfocutânea e cutânea (KAUFFMAN et al., 2007; CHAPMAN et al., 2004).

Frente à caspofungina, verificou-se intervalo de suscetibilidade entre 8 µg/mL e >32 µg/mL, com média geométrica de 22,632 µg/mL; a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram de 32 µg/mL. Com base nas CIMs de caspofungina para *Candida sp.* e *Aspergillus sp.*, as CIMs obtidas para *S. schenckii* sugerem reduzida sensibilidade de *Sporothrix spp* a esta equinocandina.

Considerando que se identificou apenas um isolado de cada uma das espécies itraconazol-resistente - *S. albicans* e *S. luriei* - e, a recente possibilidade destas identificações, é prematuro estabelecer afirmações. Por outro lado, considerando-se que este é o segundo estudo relatando as novas espécies *S. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. luriei* e sendo esta última espécie, *S. luriei*, o segundo exemplar até hoje identificado, qualquer achado é importante e deve ser considerado. A grande indagação é se a resistência ao itraconazol é uma característica destas espécies ou se a resistência aqui detectada é um achado dentro da variabilidade de suscetibilidade destas espécies.

No intuito de vencer a resistência antifúngica e a toxicidade da monoterapia com anfotericina B, combinações de antifúngicos podem representar uma alternativa para aumentar a eficácia dos antimicóticos, ao mesmo tempo, utilizando-se doses mais baixas. A vantagem das combinações que evidenciam sinergismo é a redução da toxicidade e provável sucesso terapêutico nos casos não responsivos a monoterapia antifúngica habitual. Altas taxas de sucesso no tratamento da esporotricose com itraconazol (BARROS et al., 2011) não têm incentivado a utilização de combinações de antifúngicos contra *Sporothrix* spp; no entanto, a descrição de novas espécies de *Sporothrix* com marcada resistência a este triazólico descortinam novo panorama, o qual requer alternativas onde as combinações entre antifúngicos poderão ser úteis (BUNCE et al., 2011; GREMIÃO et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

Considerando-se que as variações de suscetibilidade no gênero *Sporothrix* estão bem evidentes, a escolha do melhor tratamento poderá estar assegurada na associação entre fármacos. Neste sentido, no presente estudo foram avaliadas combinações antifúngicas voltadas aos isolados resistentes. As combinações usadas foram terbinafina (TER) com os azólicos voriconazol (VRZ), cetoconazol (CTZ) e itraconazol (ITZ) frente a 40 cepas de *Sporothrix* spp.

Quando a TER foi combinada com CTZ, ITZ e VRZ, a interação sinérgica só foi observado frente a 1 isolado (2,5%); para TER+ITZ.

Interações aditivas foram observadas nas associações de TER+CTZ (27,5% dos isolados), TER+ITZ (35%) e TER+VRZ (2,5%); todavia, a maioria das interações foi indiferente: TER+CTZ (70%), TER+ITZ (52,5%) e TER+VRZ (55%). Interações antagônicas foram observadas frente a um isolado de TER+CTZ, com quatro isolados (10%) da combinação TER+ITZ e, com 17 isolados (42,5%) para a combinação de TER+VRZ.

Nossos achados são similares aos reportados por Zhang et al. (2011), que relataram predominantemente interações aditivas e indiferentes pela combinação TER+ITZ. Ao mesmo tempo indicaram a utilização da TER isolada ou em combinação com outros agentes antifúngicos, para os casos de esporotricose não responsivos ao tratamento com ITZ.

Embora a esporotricose não seja considerada micose oportunista, a emergência de novas espécies a coloca sob a mira de novas investigações. As exuberantes formas da esporotricose na SIDA são causadas por quais espécies de *Sporothrix*? As formas disseminadas em pacientes sob corticoidoterapia devem-se a qual espécie? Estas duas situações configuram-se como “oportunistas”? Estudos enfocando quadros clínicos em pacientes com algum grau de imunocomprometimento e a identificação das novas espécies de

*Sporothrix* será fundamental para melhor relacionar estas espécies com os quadros clínicos, que até então, eram relacionados a uma só espécie.

A busca por marcadores fenotípicos para uso rotineiro nos laboratórios de Microbiologia é de interesse como ferramenta para identificar as novas espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Apesar dos ensaios de Marimon et al. (2007) indicarem alguns testes, o aprofundamento da questão é urgente. Nesta linha de pesquisa e, em resposta às novas necessidades de identificação, a caracterização de proteínas como algumas enzimas fúngicas pode trazer respostas importantes no reconhecimento de fatores de virulência do *Sporothrix* spp, podendo ser fundamentais para o melhor entendimento da patogênese da esporotricose e, ao mesmo tempo, permitir o rápido reconhecimento de alguma(s) espécie(s).

As variações fisiológicas dos isolados oriundos de diferentes formas clínicas de esporotricose vem sendo estudadas e observadas e, recentemente, relacionadas às novas espécies; todavia, as enzimas das espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* não haviam ainda sido estudadas. Diante disso, pela primeira vez, evidenciamos um perfil enzimático para as diferentes espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Neste estudo, as características enzimáticas foram analisadas usando o sistema API ZYM<sup>®</sup> o qual é constituído por 19 substratos. Os resultados indicaram a presença das seguintes enzimas: fosfatase alcalina (FA); esterase (ES); lipase esterase (LE); lipase (LP); leucino arilamidase (LA); fosfatase ácida (FA); naftol-AS-BI-fosfohidrolase (NF);  $\alpha$ -glucosidase (AG);  $\beta$ -glucosidase (BG); N-acetil- $\beta$ -glucosaminidase (NG);  $\alpha$ -mannosidase (AM).

O sistema API ZYM<sup>®</sup> empregado revelou-se satisfatório e promissor como proposta para diferenciar fenotipicamente as espécies: *S. brasiliensis*, *S. luriei* e *S. albicans* com características bem peculiares. Os isolados identificados molecularmente como *S. luriei*, *S. brasiliensis* e *S. albicans* evidenciaram características bem específicas com base no perfil enzimático. *S. brasiliensis* foi a única espécie com atividade de lípase (LP); *S. albicans* foi a única espécie que evidenciou atividade de leucino-arilamidas (LA). Já *S. luriei* foi a única espécie sem atividade da enzima naftol-AS-BI-fosfohidrolase (NF). Todos os isolados evidenciaram atividade das enzimas fosfatase alcalina (FA) e  $\alpha$ -glucosidase (AG). Os 37 isolados de *Sporothrix schenckii* testados poderiam ser classificados em 15 biótipos diferentes, com 37,8% dos isolados apresentando reações positivas para ES, LE, FA, NF e AG.

Baseados nos resultados anteriores sugerem-se que os testes de atividade enzimática podem se constituir em testes fenotípicos úteis para identificar espécies de *Sporothrix*. Todavia, estudos adicionais, com um maior número de espécies não-*schenckii*, são

necessários para caracterizar melhor o achado. Também o desenvolvimento de testes futuros para comparar as características intraespecíficas do complexo *Sporothrix*, será bem-vindo.

Finalmente, entendemos que os achados do presente estudo podem ser assim resumidos: a) as espécies do complexo *S. schenckii* podem ser mais comuns do que se admite, visto identificarmos três delas numa amostra de 40 isolados; b) há problemas de resistência ao itraconazol entre elas; c) o perfil enzimático pode se constituir numa alternativa para a identificação fenotípica.

## 6 CONCLUSÕES

- Os estudos genotípicos e fenotípicos permitiram a identificação das espécies: *S. brasiliensis* (2,5%), *S. luriei* (2,5%), *S. albicans* (2,5%) e *S. schenckii* (92,5%) dentre os 40 isolados testados.
- Com base nas CIMs, os isolados evidenciaram maior sensibilidade à terbinafina, cetoconazol e anfotericina B; já, ao fluconazol e a caspofungina foram menos sensíveis. Frente ao itraconazol a maioria dos isolados foi sensível; todavia, *S. luriei* e *S. albicans* evidenciaram CIM >16µg/mL e CIM >128 16µg/mL, respectivamente.
- A avaliação das combinações [terbinafina + cetoconazol] e [terbinafina + itraconazol] mostraram-se vantajosas quando comparadas a atividade individual destes fármacos.
- Nenhuma espécie de *Sporothrix* evidenciou sensibilidade ao voriconazol quando testado isoladamente. A associação [voriconazol + terbinafina] foi sinérgica frente a alguns isolados, mas expressivo antagonismo (45%) foi também detectado.
- O API ZYM<sup>®</sup> evidenciou distintos perfis enzimáticos entre espécies de *S. luriei*, *S. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. schenckii*. Na espécie *S. schenckii* foram detectados 15 diferentes biótipos de perfis enzimáticos.

## REFERÊNCIAS

AFELTRA, J. R. G. et al. Potent synergistic in vitro interaction between nonantimicrobial membrane-active compounds and itraconazole against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* resistant to itraconazole. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 4, p. 1335–43, 2004.

ALMEIDA-PAES, R. et al. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v. 11, n. 5, p. 554-62, 2009.

ALVARADO-RAMIREZ, E.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2420-3, 2007.

ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 523-5, 2010.

AMORIM, D. S. **Fundamentos de Sistemática Filogenética**. Ribeirão Preto: Holos, 2002. 136p.

ARNOLD, W. N. et al. Acid-Phosphatases of *Sporothrix schenckii*. **Journal of General Microbiology**, v. 132, n. 12, p. 3421-32, 1986.

ARRIEL, N.H.C.O. et al. Outras aplicações dos marcadores. In: **Marcadores Moleculares**. Viçosa: UFV. 2006. p. 145-204.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution**. 2. ed. Sunderland: Chapman & Hall, 2004. 667p.

BARCHIESI, F. et al. *In vitro* interaction of terbinafine with amphotericin B, fluconazole and itraconazole against clinical isolates of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 59-65, 1998.

BARCHIESI, F.; DIFRANCESCO, L. F.; SCALISE, G. *In vitro* activities of terbinafine in combination with fluconazole and itraconazole against isolates of *Candida albicans* with reduced susceptibility to azoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 8, p. 1812-14, 1997.

BARROS, M. B. D.; PAES, R. D.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-54, 2011.

BARROS, M. B. D. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 4, p. 529-35, 2004.

BARROS, M. B. D. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-9, 2001.

BAVA, A. J.; NEGRONI, R. The epidemiological characteristics of 105 cases of cryptococcosis diagnosed in the Republic of Argentina between 1981- 1990. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 4, p. 335-40, 1992.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão new antifungic drugs: a review. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 159 -72, jul.-dez./2004.

BORREGO, J. A. B.; MAYORGA, J.; TARANGO-MARTINEZ, V. M. Simultaneous bilateral lymphangitic sporotrichosis. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 4, p. 247-9, 2009.

BUNCE, P. E. et al. Disseminated sporotrichosis in a patient with hairy cell leukemia treated with amphotericin B and posaconazole. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 197-201, 2011.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. E. Endemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 145-9, 2001.

BUTLER, M. J.; DAY, A. W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 1115-36, 1998.

CALLENS, S. F. J. et al. Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 52, n. 2, p. 144-6, 2006.

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

CARLOS, I. Z.; SGARBI, D. B. D.; PLACERES, M. C. P. Host organism defense by a peptide-polysaccharide extracted from the fungus *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v. 144, n. 1, p. 9-14, 1998.

CASADEVALL, A. Cards of virulence and the global virulome for humans. **Microbe**, v. 1, n. 8, p. 359-364, 2006.

CASTREJON, O. V.; ROBLES, M.; ZUBIETA ARROYO, O. E. Fatal fungaemia due to *Sporothrix schenckii*. **Mycoses**, v. 38, n. 9-10, p. 373-6, 1995.

CHAPMAN, S. W. et al. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day<sup>-1</sup>) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. **Mycoses**, v. 47, n. 1-2, p. 62-8, 2004.

CHEN, S. C. A.; SORRELL, T. C. Antifungal agents. **Medical Journal of Australia**, v. 187, n. 7, p. 404-9, 2007.

CLSI/M38-A2 - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd Edition. CLSI, Wayne, PA, x, 35 p. pp. 2008.

COOPER, C. R.; DIXON, D. M.; SALKIN, I. F. Laboratory-Acquired Sporotrichosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 30, n. 2, p. 169-71, 1992.

COPETTI, M. V. et al. Equine sporotrichosis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 2, p. 135-8, 2002.

CORREA, B. et al. Morphogenesis of *Sporothrix schenckii* “in vivo” and “in vitro” through the method of variability by fluorescence. **Applied Fluorescence Technology**, v. 3, p. 1-8, 1991.

CRISEO, G.; ZUNGRI, D.; ROMEO, O. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: Lack of dimorphic stage. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 3870-1, 2008.

CUADROS, R. G.; VIDOTTO, V.; BRUATTO, M. Sporotrichosis in the Metropolitan-area of Cuzco, Peru, and in its region. **Mycoses**, v. 33, n. 5, p. 231-40, 1990.

DA ROSA, A. C. M. et al. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, n. 3, p. 451-9, 2005.

DA ROSA, D. et al. Excretion-secretion products and proteases from live *Sporothrix schenckii* yeast phase. Immunological detection and cleavage of human IgG. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 1, p. 1-7, 2009.



DEALBORNOZ, M. B.; MENDOZA, M.; DETORRES, E. D. Growth Temperatures of Isolates of *Sporothrix-Schenckii* from Disseminated and Fixed Cutaneous Lesions of Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 95, n. 2, p. 81-3, 1986.

DE BERNARDIS, F. et al. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3481-6, 1999

DE HOOG, G. S.; VITALE, R. G. Bipolaris, Exophiala, Scedosporium, Sporothrix and other dematiaceous fungi. In: MURRAY, P. R.;BARON, E. J., et al. (Ed.). **Manual of clinical microbiology**. 9th. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. p.1898-917.

DE HOOG, G. S. et al. **Atlas of Clinical Fungi**. 2. ed. Centralbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.

DERAY, G. Amphotericin B nephrotoxicity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 37-41, 2002.

DE-OLIVEIRA-NOBRE, M. et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 37, n. 3, p.134-40, 2001.

DÍAZ, I. A. C. La termoterapia local como tratamiento de la esporotricosis cutánea. **Revista Médica del Uruguay**, v. 27, p. 50-5, 2011.

DIXON, D. M.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp from the largest United States epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 951-4, 1992.

DONABEDIAN, H. et al. Disseminated cutaneous and meningeal Sporotrichosis in an Aids patient. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 18, n. 2, p. 111-5, 1994.

DUNSTAN, R. W. et al. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 1986.

ENGLE, J.; DESIR, J.; BERNSTEIN, J. M. A rose by any other name. **Skinmed**, v. 6, n. 3, p. 139-41, 2007.

FERNANDES, K. S.; MATHEWS, H. L.; LOPES BEZERRA, L. M. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 195-203, 1999.

FIGUEIREDO, C. C. et al. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial Pathogenesis**, v. 36, n. 4, p. 177-88, 2004.

FONSECA-REYES, S. et al. Extracutaneous sporotrichosis in a patient with liver cirrhosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, n. 1, p. 41-3, 2007.

FRANCESCONI, G. et al. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 349-54, 2011.

FRANCESCONI, G. et al. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 11, p. 1273-6, 2009.

FREITAS, D. F. et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical mycology**, 2011.

GEZUELE, E.; DA ROSA, D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 22, n. 3, p. 147-50, 2005.

GHOSH, A. et al. Sporotrichosis in Himachal Pradesh (North India). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 41-5, 1999.

GHOSH, A. et al. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v. 45, n. 11-12, p. 449-54, 2002.

GILGADO, F. et al. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, p. 4930-42, 2005.

GORI, S. et al. Pulmonary sporotrichosis with hyphae in a human immunodeficiency virus-infected patient - A case report. **Acta Cytologica**, v. 41, n. 2, p. 519-21, 1997.

GOTTLIEB, G. S. et al. Disseminated sporotrichosis associated with treatment with immunosuppressants and tumor necrosis factor-alpha antagonists. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 6, p. 838-40, 2003.

GREMIAO, I. D. F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346-51, 2011.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454-500, 1999.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. J. Antifungal therapy. In: ANAISSIE, E. J.; MCGINNIS, M. R., et al. (Ed.). **Clinical mycology**. 2nd. Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, 2009. cap. 7, p.161-95.

GULLBERG, R. M. et al. Sporotrichosis - recurrent cutaneous, articular, and central-nervous-system infection in a renal-transplant recipient. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 369-75, 1987.

GUTIERREZ GALHARDO, M. C. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, v. 46, n. 2, p. 141-51, 2008.

HARDMAN, S. et al. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with SIDA. **The Journal of infection**, v. 51, n. 3, p. 73-7, 2005.

HAY, R. J. Therapeutic potential of terbinafine in subcutaneous and systemic mycoses. **British Journal of Dermatology**, v. 141, n. 56, p. 36-40, 1999.

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

HIRANO, M. et al. A case of feline sporotrichosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 68, n. 3, p. 283-4, 2006.

HOGAN, L. H.; KLEIN, B. S.; LEVITZ, S. M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-88, 1996.

ISHIZAKI, H. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii*. **Jpn. J. Med. Mycol.** v. 44, p. 155-7, 2003.

ISHIZAKI, H. et al. Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in North and South America. **Mycopathologia** v. 142, p. 115–8, 1998.

JACOBSON, E. S. Pathogenic roles for fungal melanins. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13, n. 4, p. 708-17, 2000.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.

KAJIWARA, H. et al. Impaired host defense against *Sporothrix schenckii* in mice with chronic granulomatous disease. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5073-9, 2004.

KANBE, T. et al. Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, n. 2, p. 99-106, 2005.

KANO, R. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, v. 44, n. 7-8, p. 261-5, 2001.

KAUFFMAN, C. A. Sporotrichosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 29, n. 2, p. 231-7, 1999.

KAUFFMAN, C. A.; HAIJJEH, R.; CHAPMAN, S. H. Practice guidelines for management of patients with sporotrichosis. For the Mycoses Study Group. 74 Infectious Disease Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, p. 684- 7, 2000.

KAUFFMAN, C. A. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the infectious diseases society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1255-65, 2007.

KITAJIMA, Y. Structural and biochemical characteristics of pathogenic fungus: cell walls, lipids and dimorphism, and action modes of antifungal agents. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 41, p. 211-7, 2000.

KOHLER, L.M. et al. J.S. In Vitro Susceptibilities of Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine. **JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY**, v.42, n.9, p.4319-20, 2004.

KOHLER, L. M. et al. *In vitro* susceptibilities isolates of *Sporothrix schenckii* to amphotericin B, itraconazole, and terbinafine: comparison of yeast and mycelial forms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 52, p. 843-7, 2006.

KUSUHARA, M.; HACHISUKA, H.; SASAI, Y. Statistical-Survey of 150 Cases with Sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 102, n. 2, p. 129-33, 1990.

KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medical mycology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. ix, 866 p.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9 ed. São Paulo ; São Paulo: Sarvier, 2002. 1104 p.

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 310-50, 1999.

LIMA, O. C. et al. Immunofluorescence and flow cytometry analysis of fibronectin and laminin binding to *Sporothrix schenckii* yeast cells and conidia. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, n. 3, p. 131-40, 2004.

LIMA, O. C. et al. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 5, p. 651-7, 1999.

LIMA, O. C. et al. Involvement of fungal cell wall components in adhesion of *Sporothrix schenckii* to human fibronectin. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 11, p. 6874-80, 2001.

LINDSLEY, M. D. et al. Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 3505-11, 2001.

LIU, X. M.; LIN, X. R. A case of cutaneous disseminated sporotrichosis. **Journal of Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 95-9, 2001.

LOPES-BEZERRA, L. M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais Da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

LOPES JORGE, O. et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, p. 541-5, 1999.

LOSMAN, J. A.; CAVANAUGH, K. Cases from the Osler medical service at Johns Hopkins University. **American Journal of Medicine**, v. 117, n. 5, p. 353-6, 2004.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Revista Medica de São Paulo**, v. 21, p. 433-50, 1907.

MADRID, H. et al. *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 26, n. 3, p. 218-22, 2009.

MAGAND, F. et al. Autochthonous cutaneous sporotrichosis in France. **Annales de Dermatologie Et de Venereologie**, v. 136, n. 3, p. 273-5, 2009.

MAGO, N.; KHULLER, G. K. Biosynthesis of major phospholipids in *Candida albicans*. **Current Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 369-72, 1990.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 10, p. 3198-206, 2007.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Medical Mycology**, v. 46, n. 6, p. 621-5, 2008.

MARIMON, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3251-6, 2006.

MARQUES, S. A. et al. Sporotrichosis of the domestic cat (*Felis catus*): human transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. 4, p. 327-30, 1993.

MARQUES, S. A. et al. Sporotrichosis: survey and clinical aspects from Botucatu School of Medicine, state of São Paulo-Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 72, n. 4, p. 343-7, 1997.

MAYORGA, R. et al. Study of a sporotrichosis endemic in Guatemala. **Sabouraudia-Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 16, p. 185-98, 1978.

MC GINNIS, M. R. et al. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. **Med. Mycol.** v. 39, p. 369-71. 2001.

MEINERZ, A. et al. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 60-2, 2007.

MENDES-GIANNINI, M. J. S. et al. Binding of extracellular matrix proteins to *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 6, p. 1550-9, 2006.

MESA-ARANGO et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **J. Clin. Microbiol.** v. 40, p. 3004–11, 2002.

MILLER, M. A. J. S. D.; KEELING, J. H. Ant sting sporotrichosis. **Cutis**, v. 69, n. 6, p. 439-42, 2002.

MIYAKI, C.Y. et al. Reconstrução Filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto; Holos, 2001. p. 97-107.

MORERA-LOPEZ, Y.; TORRES-RODRIGUEZ, J. M.; JIMENEZ-CABELLO, T. *In vitro* susceptibility of fungal and yeast clinical isolates to itraconazole and voriconazole. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22, n. 2, p. 105-9, 2005.

MORRIS-JONES, R. et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* *in vitro* and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 7, p. 4026-33, 2003.

NEELY, M. N.; GHANNOUM, M. A. The exciting future of antifungal therapy. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, p. 897-914, 2000.

NEI, M.; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Oxford: Oxford University Press. 2000. 333p.

NEI, M. et al. The optimization principle in phylogenetic analysis tend give incorret topologies when the number of nucleotides or aminoacids is small. **Proceeding of the national Academy of Sciences**, v.95, n.21, p. 12390- 7, 1998.

NEYRA, E. et al. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 1348-52, 2005.

NOBRE, M. O. et al. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 1, p. 36-41, 2002.

NOBRE, M.O. et al. Drogas Antifúngicas para Pequenos e Grandes Animais. **Ciência Rural**, v. 32, p. 175-84, 2002b.

NOSANCHUK, J. D.; CASADEVALL, A. Budding of melanized *Cryptococcus neoformans* in the presence or absence of L-dopa. **Microbiology-Sgm**, v. 149, p. 1945-51, 2003.

ODABASI, Z. et al. *In vitro* activity of anidulafungin against selected clinically important mold isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1912-5, 2004.

O'DONNELL, K., E. CIGELNIK, H. I. NIRENBERG. Molecular systematics and phytogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia** v. 90, p. 465-93, 1998.

OLIVEIRA, D. C. et al. Susceptibilities to antifungal agents of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* and *S. luriei* of the *S. chenckii* complex identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047-8, 2011.

PAPPAS, P. G. et al. Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v. 30, n. 1, p. 65-70, 2000.

READ, S. I.; SPERLING, L. C. Feline Sporotrichosis - Transmission to Man. **Archives of Dermatology**, v. 118, n. 6, p. 429-31, 1982.

REAL JÚNIOR, Nelson. Cabala é o caminho para o autoconhecimento. Cidadão net, 11 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.cidadaonet.com.br/?pg=noticias-conteudo&id=7284>>. Acesso em: 01 maio 2012.

REISS, E. et al. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. **Medical Mycology**, v. 38, n. 1, p. 147-59, 2000.

REX, J. H. et al. Antifungal susceptibility testing: Practical aspects and current challenges. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 643-58, 2001.

RIVITTI, E. A.; AOKI, V. Deep fungal infections in tropical countries. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 171-90, 1999.



ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect. Immun.** v. 68, p. 3696–703, 2000.

RUIZ-BACA, E. et al. Isolation and some properties of a glycoprotein of 70 kDa (Gp70) from the cell wall of *Sporothrix schenckii* involved in fungal adherence to dermal extracellular matrix. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2, p. 185-196, 2009.

RUSSO, C.A.M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S.R. (Ed). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos. 2001. p.130-6.

SAENZ-DE-SANTAMARIA, M; GUI SANTES, J. A.; MARTINEZ, J. Enzymatic activities of *Alternaria alternata* allergenic extracts and its major allergen (Alt a 1). *Mycoses* 49, 288-92, 2006.

SATYANARAYANA, T.; CHAVANT, L.; MONTANT, C. Applicability of API ZYM for screening enzyme activity of thermophilic moulds. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 85, n. 4, p. 727-30 . 1985.

SCHENCK, B. R. On refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the Sporotricha. **Bulletin of the Johns Hopkins Hospital**, v. 9, p. 286-90, 1898.

SCHENEIDER, H. **Métodos de análise Filogenética um guia prático**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.130-6.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, n. 1, p. 147-9, 2001.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**, v. 152, n. 6, p. 172-5, 2003.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 224, n. 10, p. 1623-9, 2004.

SCHUBACH, A. et al. Primary conjunctival sporotrichosis - Two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cornea**, v. 24, n. 4, p. 491-3, 2005.

SCOTT, E. M.; TARIQ, V. N.; MCCRORY, R. M. Demonstration of synergy with fluconazole and either ibuprofen, sodium-salicylate, or propylparaben against *Candida albicans in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 12, p. 2610-14, 1995.

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

SHAW, J. C.; LEVINSON, W.; MONTANARO, A. Sporotrichosis in the acquired immunodeficiency syndrome. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 21, n. 5 Pt 2, p. 1145-7, 1989.

SILVA-VERGARA, M. L. et al. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with SIDA. **Medical Mycology**, v. 43, n. 2, p. 187-90, 2005.

SILVEIRA, C. P. et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 1607-10, 2009.

STEADHAM, J. E.; GEIS, P. A.; SIMMANK, J. L. Use of carbohydrate and nitrate assimilations in the identification of dematiaceous fungi. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 5, n. 1, p. 71-5, 1986.

TACHIBANA, T. et al. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical Mycology**, v. 39, n. 3, p. 295-8, 2001.

TEIXEIRA, P. A. C. et al. Cell surface expression of adhesins for fibronectin correlates with virulence in *Sporothrix schenckii*. **Microbiology-Sgm**, v. 155, p. 3730-8, 2009.

TERRELL, C. L. Antifungal agents. Part II. The azoles. **Mayo Clinic Rochester**, v.74, n.1, p. 78-100, 1999.

TORRES-RODRÍGUEZ, J. M. et al. Esporotricosis In: \_\_\_\_\_ **Micología Médica**, Barcelona, Marron, 1993. Cap. 16, p. 157-66.

TRAVASSOS, L. R. Antigenic structures of *Sporothrix schenckii*. **Immunology Serology**, v. 47, p. 193-221, 1989.

TRILLES, L. et al. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3952-4, 2005.

TSUBOI, R. et al. Isolation and Properties of Extracellular Proteinases from *Sporothrix schenckii*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 9, p. 4104-9, 1987.

URABE, H.; HONBO, S. Sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v. 25, n. 4, p. 255-7, 1986.

VAN DUIN, D.; CASADEVALL, A.; NOSANCHUK, J. D. Melanization of *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum* reduces their susceptibilities to amphotericin B and caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3394-400, 2002.

VICENTINI, A. P. et al. Binding of *Paracoccidioides brasiliensis* to Laminin through Surface Glycoprotein Gp43 Leads to Enhancement of Fungal Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 4, p. 1465-9, 1994.

VILELA, R. et al. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 24, n. 2, p. 161-3, 2007.

WARE, A. J. et al. Disseminated sporotrichosis with extensive cutaneous involvement in a patient with SIDA. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 40, n. 2, p. 350-5, 1999.

WATANABE, S. et al. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. **Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 45, n. 3, p. 165-75, 2004.

WHEELER, M. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3696-703, 2000.

WILHELM DE BEER, Z., et al. **J. Wingfield**. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia* v, 95, p. 434-41, 2003.

WHITTEMORE, J. C.; WEBB, C. B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. **Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne**, v. 48, n. 4, p. 411-4, 2007.

WOODS, J. P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 327-31, 2003.

YEGNESWARAN, P. P. et al. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 11, p. 1198-200, 2009.

ZHANG, Z. Y. et al. Genotyping of *Sporothrix schenckii* by analysis of ribosomal DNA regions. **Mycoses**, v. 49, n. 4, p. 305-10, 2006.

ZHANG, X. H. et al. *In vitro* activity of itraconazole in combination with terbinafine against clinical strains of itraconazole-insensitive *Sporothrix schenckii*. **Eur J Dermatol**, 21, 573-6, 2011.