

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS,  
HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DA  
ESPOROTRICOSE FELINA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Talissa Bazzi**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS,  
HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DA  
ESPOROTRICOSE FELINA**

**Talissa Bazzi**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

**Orientadora: Profa. Glaucia Denise Kommers**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2015**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências Rurais  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS,  
HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DA ESPOROTRICOSE  
FELINA**

elaborada por  
**Talissa Bazzi**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
Mestre em Medicina Veterinária

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Glauca Denise Kommers, PhD. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)

**Rafael Almeida Figuera, Dr. (UFSM)**

**Maria Andréia Inkelmann, Dr. (Unijuí)**

Santa Maria, 30 de setembro de 2015

# RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria

## **CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS, HISTOMORFOLÓGICAS E HISTOQUÍMICAS DA ESPOROTRICOSE FELINA**

AUTORA: Talissa Bazzi  
ORIENTADORA: Glaucia Denise Kommers  
Santa Maria, 30 de setembro de 2015

Esporotricose é uma infecção fúngica subaguda ou crônica, causada por espécies do complexo *Sporothrix*. A doença já foi descrita em humanos e em diversas espécies animais, mas ocorre com maior frequência em gatos, cavalos e cães. Baseado em vários relatos de surtos na literatura, a espécie mais predominante em gatos das regiões Sul e Sudeste do Brasil é *S. brasiliensis*. As formas de transmissão para humanos incluem a ocupacional e a zoonótica. A forma de apresentação mais frequente em gatos é de múltiplas lesões de pele e mucosas. Os métodos de diagnóstico compreendem o isolamento e identificação do agente em cultura, a histopatologia, a citologia, o teste intradérmico da esporotriquina, a técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e a reação em cadeia de polimerase (PCR). O diagnóstico histopatológico é realizado observando-se as características morfológicas do fungo e a respectiva reação inflamatória. Os principais objetivos deste estudo retrospectivo foram caracterizar os aspectos histomorfológicos e histoquímicos da esporotricose em 10 gatos, além de avaliar os aspectos epidemiológicos, clínicos e os achados macroscópicos obtidos dos protocolos de biópsias e necropsias dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. A doença afetou predominantemente gatos machos, sem raça definida e na forma cutânea disseminada. As lesões macroscópicas caracterizaram-se como nódulos cutâneos (ulcerados ou não) e como massas e placas ulceradas. Na histopatologia observou-se uma relação entre a quantidade de leveduras observada e dois padrões de resposta inflamatória. O primeiro padrão caracterizou-se por numerosas leveduras encontradas, na sua maioria, no interior de numerosos macrófagos com citoplasma abundante e muitas vezes vacuolizado. A quantidade de neutrófilos variava de leve a moderada e havia infiltrado geralmente leve de linfócitos e plasmócitos. O segundo padrão caracterizava-se por leve quantidade de leveduras observadas geralmente livres no espaço extracelular, numerosas células epitelioides e infiltrado predominantemente acentuado de neutrófilos. As leveduras eram redondas, ovais ou alongadas (em forma de charuto). Foram utilizadas várias técnicas histoquímicas como a impregnação pela prata de Grocott, ácido periódico de Schiff e azul Alciano que facilitaram a visualização, caracterização da morfologia e quantificação dos organismos. A coloração de Giemsa permitiu a visualização do agente, porém não permitiu destacá-los dos debris celulares. Os organismos foram negativos para grânulos de melanina pela coloração de Fontana-Masson em todos os casos. O estudo histomorfológico e histoquímico permitiu demonstrar características fúngicas determinantes para o estabelecimento do diagnóstico de esporotricose através dessa ferramenta diagnóstica.

Palavras-chave: Esporotricose felina. Complexo *Sporothrix* spp.. Doenças de gatos.

# ABSTRACT

MSc Dissertation  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária  
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

## **Clinical, epidemiological, histomorphological and histochemical characteristics of the feline sporotrichosis**

AUTHOR: Talissa Bazzi  
ADVISER: Glaucia Denise Kommers  
Santa Maria, September 30, 2015

Sporotrichosis is an acute or subacute mycotic infection caused by the *Sporothrix* complex species. The disease was already described in humans and in several animal species, mostly in cats, horses and dogs. Based on several outbreak reports in the literature, the species more predominant in cats of the Southeast and South regions of Brazil is *S. brasiliensis*. The transmission to humans include the occupational and the zoonotic forms. The presentation form more often seen in cats is multiple skin and mucosal lesions. The diagnostic methods include the isolation and identification of the agente in culture, the histopathology, the cytology, the intradermal sporotrichin test, the immunohistochemistry technique, and the polymerase chain reaction (PCR). The histopathological diagnosis is based on the morphological characteristics of the fungus and the respective inflammatory reaction. The main objectives of this retrospective study were to characterize the histomorphological and histochemical aspects of sporotrichosis in 10 cats, and also to evaluate epidemiological and clinical aspects, and gross findings obtained from the biopsy and necropsy protocols of the archives of the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria. The disease affected mostly male mongrel cats, and was mostly observed in the cutaneous disseminated form. Gross lesions were characterized by cutaneous nodules (ulcerated or not) and by ulcerated masses or plaques. By histopathology, there were a relationship between the fungal load and two patterns of inflammatory response. The first pattern was characterized by high fungal load, and most yeasts were inside of numerous macrophages with abundant, many times vacuolated cytoplasm. The amount of neutrophils ranged from mild to moderate in this pattern. The second pattern was characterized by numerous epithelioid cells and many neutrophils. The fungal load was low and most yeasts were observed in the extracellular space. The yeasts were round, oval or cigar-shaped. Several histochemical techniques, such as Grocott's silver stain, periodic Schiff acid, and Alcian blue were utilized and they made it easier to visualize, to characterize the morphology, and to quantify the organisms. The Giemsa stain allowed visualizing the agent, but it not allowed to sharply highlight them from other intralesional components. Organisms were negative for melanin granules through the Fontana-Masson stain in all cases. The histomorphological and histochemical study allowed demonstrating determinant fungal characteristics to the establishment of the diagnosis by means of this diagnostic tool.

Key words: Feline sporotrichosis. *Sporothrix* spp. complex. Diseases of cats.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
<b>2. CAPÍTULO 1 Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina</b> .....	14
ABSTRACT .....	15
RESUMO .....	15
INTRODUÇÃO .....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS.....	18
DISCUSSÃO .....	19
CONCLUSÕES .....	22
REFERÊNCIAS.....	23
<b>3. CONCLUSÃO</b> .....	35
<b>4. REFERÊNCIAS</b> .....	36

# 1. INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma infecção fúngica subaguda ou crônica, causada por espécies do complexo *Sporothrix*, que compreende mais de seis espécies que podem estar intimamente relacionadas (ANTUNES et al. 2009; VÁSQUEZ-DEL-MERCADO et al., 2012). Dentre as espécies existentes, a que está mais relacionada com a esporotricose humana é *Sporothrix schenckii* (LOPES-BEZERRA et al. 2006). No Brasil, as espécies isoladas de gatos são *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (RODRIGUES et al., 2014). As espécies *S. luriei* e *S. pallida* também já foram isoladas em outros países (RODRIGUES et al., 2012).

Esse é um fungo dimórfico, isto é, a forma do fungo encontrado no tecido difere da forma que ele cresce no meio ambiente. A forma encontrada no ambiente é a micelial e no tecido (forma parasitária) é a leveduriforme (HOWARD 1960; GINN et al., 2007). Além disso, é um fungo geofílico, distribuído amplamente na natureza, e sapróbio, isto é, que depende de matéria orgânica em decomposição para sobreviver, assim ele é encontrado em solo rico em matéria orgânica, em folhas secas, madeira, espinhos (principalmente de roseiras), entre outros (LOPES-BEZERRA et al., 2006; ANTUNES et al., 2009). Em humanos, é considerado um risco para os que trabalham com solo, plantas ou materiais vegetais, como jardineiros, floristas, horticultores, agricultores, viveiristas e plantadores de árvores (EL-GHOLL et al., 1986), pois a infecção é adquirida por contaminação de ferida ou inoculação do organismo no tecido por perfurações causada por espinhos ou lascas de madeira (GINN et al., 2007).

A transmissão zoonótica ocorre por arranhadura ou mordedura de cães, gatos e tatus, ou através de contaminação de solução de continuidade cutânea pré-existente (SCHUBACH et al., 2012). A esporotricose felina tem alto potencial zoonótico devido à grande quantidade de organismos fúngicos nas lesões. Além disso, os gatos saudáveis podem se tornar portadores do agente nas unhas (SOUZA et al., 2006) e cavidade oral, devido aos hábitos de enterrar dejetos e afiar as unhas em árvores (ANTUNES et al., 2009; ROSSI et al., 2013). Ainda há a tendência de afetar mais gatos machos, pois eles têm um maior acesso extradomiciliar do que as fêmeas, o que resulta em maior envolvimento em brigas (por fêmeas ou território) (ROSSI et al.,

2013). A esporotricose canina é considerada rara e tem baixo potencial zoonótico (MARQUES et al., 1993; SANTOS et al., 2007).

Os fatores de virulência descritos para *Sporothrix* spp. incluem a presença de enzimas extracelulares (que causam depressão da resposta imune e têm atividade proteolítica, degradando anticorpos) (ANTUNES et al., 2009; BARROS et al., 2011; TELLÉZ et al., 2014); a termotolerância (capacidade do fungo de crescer a 35° e/ou 37°C); a composição da parede celular (contendo peróxido de ergosterol, integrinas e adesina lectina-símile) (ANTUNES et al., 2009; BARROS et al., 2011) e a presença de melanina (protege contra danos físicos e químicos) (ROMEDO-MARTINEZ et al., 2000; ANTUNES et al., 2009; BARROS et al., 2011).

Sugere-se que o clima, a temperatura atmosférica e a umidade relativa do ar influenciem no crescimento do fungo no seu estado saprofítico. Sendo assim, a doença é mais comum em zonas temperadas a tropicais (GINN et al., 2007) e rara em zonas áridas ou semi-áridas ou em países frios e úmidos (DÍAZ, 1989).

A esporotricose já foi considerada rara, mas desde a década de 60, observou-se um número significativo de casos descritos (FREITAS et al., 1964; LOPES-BEZERRA et al., 2006). Hoje é considerada endêmica na América Latina (DÍAZ, 1989). No Brasil, é endêmica no Rio de Janeiro, estado em que até o ano de 1997 diagnosticava-se três casos por ano em humanos, no ano de 2000 passou para 43 casos humanos diagnosticados, e a partir deste ano teve o número de casos em humanos e animais crescendo exponencialmente (BARROS et al., 2010). A espécie do complexo *Sporothrix* mais predominante em gatos das regiões Sul e Sudeste do Brasil foi *S. brasiliensis*; esta é considerada a espécie mais virulenta, e frequentemente envolvida na transmissão zoonótica (RODRIGUES et al., 2014).

A doença já foi descrita em humanos (SCHUBACH et al., 2012; TELLÉZ et al., 2014) e em diversas espécies animais como cães, ratos, tatus, equinos (TELLÉZ et al., 2014), asininos, bovinos, caprinos, suínos, hamsters, camelos, chimpanzés e aves domésticas (GINN et al., 2007). Ocorrendo com maior frequência em gatos, cavalos e cães (LACAZ, 2002, GINN et al., 2007); dentre estas os gatos são os mais acometidos (LARSSON, 2011).

A esporotricose é classificada nos humanos em três formas clínicas: cutânea (localizada ou disseminada), cutânea-linfática e extracutânea (LACAZ, 2002; GINN et al., 2007; TELLÉZ et al., 2014). Essa classificação é difícil de ser aplicada em cães e gatos, pois eles frequentemente têm mais de uma forma simultaneamente



(SCHUBACH et al., 2012), mesmo assim, a literatura cita que as formas cutâneas fixa ou disseminada são as mais frequentes em gatos (ANTUNES et al., 2009).

A rota usual de transmissão é a pele (DÍAZ, 1989). Os gatos adquirem a doença através de ferimento penetrante por corpo estranho ou lutando com outros gatos. Após a inoculação na pele, o fungo penetra nas camadas mais profundas do tecido, se transformando em levedura; esse processo dura em torno de 13 dias (ANTUNES et al., 2009). O agente pode permanecer na derme e subcutâneo do local da inoculação ou se espalhar pelos vasos linfáticos regionais, produzindo linfangite e linfadenite. Ainda pode se disseminar sistemicamente através dos vasos sanguíneos. Múltiplas lesões de pele podem ocorrer por causa do auto-trauma, lambedura e disseminação hematogênica. Outro meio de inoculação que pode ocorrer é pela via respiratória, através da transmissão aerógena (LARSSON, 2011; SCHUBACH et al., 2012).

A forma de apresentação mais frequente é de múltiplas lesões de pele e mucosa (conjuntival, nasal, oral e genital) (SCHUBACH et al., 2012). A lesão inicial de esporotricose caracteriza-se pela formação de nódulos subcutâneos firmes, que lentamente tornam-se macios à maleáveis (“gomosos”). A medida que isso ocorre, passam a drenar conteúdo seroso ou purulento e progridem para a formação de úlceras marcadamente exsudativas, com bordas ligeiramente definidas (LARSSON et al., 1989). Ainda, podem apresentar sinais relacionados com a forma extracutânea, principalmente sinais respiratórios, tais como espirros, descarga nasal e dispneia, seguidos por linfadenomegalia. Há outros sinais sistêmicos que podem ser observados, tais como anorexia, vômito, perda de peso, febre e desidratação (SCHUBACH et al., 2012).

Há casos em que se observa agravamento das lesões e há autores que acreditam que esse agravamento ocorra pela co-infecção pelos vírus da imunodeficiência felina (FIV) ou da leucemia felina (FeLV) (ANTUNES et al., 2009; SCHUBACH et al., 2012). Entretanto, essa correlação não foi comprovada (SCHUBACH et al., 2004; MIRANDA et al., 2013) e a infecção por FIV e FeLV não é considerada como fator predisponente (ANTUNES et al., 2009). Outra especulação é de que a virulência dos fungos, as espécies envolvidas e as diferentes susceptibilidades dos indivíduos são fatores que permitem a ocorrência de doença grave em gatos. Porém, mais estudos são necessários para compreender essas correlações (MIRANDA et al., 2013).

As lesões de pele são mais encontradas na cabeça (especialmente no focinho e ao redor dos olhos), na cauda e nos membros posteriores (SCHUBACH et al., 2012). Esses locais são descritos como os mais afetados durante as brigas (ROSSER; DUNSTAN, 2006).

Histologicamente, as lesões cutâneas de esporotricose felina são caracterizadas por epiderme acantótica e ulcerada, com crostas e exsudação variável, acompanhadas geralmente por inflamação piogranulomatosa intensa (sem granulomas organizados), na derme, podendo se estender ao subcutâneo e músculos esqueléticos subjacentes (ANTUNES et al., 2009). Geralmente é observada grande quantidade de leveduras, que podem ser vistas dentro de macrófagos ou neutrófilos e extracelularmente (SCHUBACH et al., 2012). Pode ser observada também inflamação com predomínio de células epitelioides e poucos exemplares de leveduras, semelhante à esporotricose descrita em cães (MIRANDA et al., 2013).

O diagnóstico histopatológico é realizado observando-se as características morfológicas do fungo, ou seja, a presença de leveduras medindo 2 a 8µm, nas formas oval, redonda e alongada (“charuto”) (LACAZ et al., 2002; GINN et al., 2007; GROSS et al., 2009; SCHUBACH et al., 2012; MAHAJAN, 2014). Também são descritos brotamentos de base estreita ou em tubo (GUARNER; BRANDT, 2011; SCHUBACH et al., 2012).

A utilização de colorações especiais, como a impregnação pela prata de Grocott (GMS) e ácido periódico de Schiff (PAS), são colorações utilizadas para facilitar a visualização e caracterização do agente (LACAZ, 2002), evidenciando-se leveduras escuras no GMS e rosadas no PAS (SCHUBACH et al., 2012). O GMS apresenta uma maior sensibilidade que o PAS (MARQUES et al., 1992; MIRANDA et al., 2009). A coloração de Fontana-Masson já foi descrita para detectar grânulos de melanina em *Cryptococcus* spp. (KWONG-CHUNG et al., 1981; GUARNER; BRANDT, 2011; GALIZA et al., 2014). Os grânulos de melanina são considerados um fator de virulência importante de *Sporothrix* spp. (BARROS et al., 2011), mas a sua evidenciação pela coloração de Fontana-Masson em tecidos infectados foi descrita somente como um halo castanho-fraco na parede celular da levedura, porém a intensidade da cor não foi comparável à aquela fortemente vista na parede de *Cryptococcus* spp., independentemente do tecido hospedeiro (KWONG-CHUNG et al., 1981).

O método de diagnóstico definitivo de esporotricose é o isolamento e identificação do agente em cultura (SCHUBACH et al., 2012; MAHAJAN, 2014; CHOMEL, 2014). O cultivo é realizado em ágar Sabouraud dextrose, ágar batata, infusão cérebro-coração, acrescidos ou não de nutrientes, antibacterianos ou de antifúngicos. Os cultivos são mantidos a 25 e 37°C durante 10 a 15 dias, para caracterização do dimorfismo e avaliação macro e micromorfológicas das colônias (ANTUNES et al., 2009). Este método de diagnóstico é dificultado ou impossibilitado quando não há suspeita clínica de esporotricose e o material já se encontra muitas vezes fixado em formol (MIRANDA et al., 2011), ou quando a cultura é negativa por diferentes motivos, tais como a contaminação da amostra. Nestes casos a morfologia fúngica intratecidual característica é uma ferramenta diagnóstica importante (JENSEN et al., 1996).

Outro método diagnóstico inclui o exame direto das lesões, através de citologia do exsudato aspirado das lesões (BARROS et al., 2011; LARSSON, 2011). A citologia é submetida às colorações de Gram, Wright, Giemsa ou Rosenfeld, evidenciando as leveduras arredondadas, ovaloides ou em forma de “charuto” (LARSSON, 2011).

Também pode ser realizado o teste intradérmico da esporotriquina, utilizada para levantamento epidemiológico da micose em humanos e para diferenciação entre esporotricose e leishmaniose em cães (ANTUNES et al., 2009). Utiliza-se antígeno, que é aplicado intradermicamente e é realizada leitura da eventual lesão, após 48 horas. Esta é uma reação muito sensível, porém pouco específica (LARSSON 2011).

O teste de imuno-histoquímica (IHQ) também tem sido utilizado para confirmação da etiologia da esporotricose em cães (MIRANDA et al., 2011). Entretanto, não há disponibilidade de anticorpos comerciais para esse fim, ficando a técnica restrita a alguns centros diagnósticos que o produzem. Segundo uma revisão ampla sobre esporotricose (LARSSON, 2011), a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi desenvolvida para a detecção do agente, diretamente a partir de amostras de tecido do animal afetado, recorrendo-se a “primers” oligonucleotídeos baseados no gene quitina-sintetase 1 (CHS1) de *S. schenckii*.

Quanto ao tratamento, em um estudo *in vitro* sobre a susceptibilidade de antifúngicos para *Sporothrix* spp. no Brasil, a terbinafina foi a droga para a qual houve maior sensibilidade, seguida do cetoconazol e do itraconazol (STOPIGLIA et al., 2014). O antifúngico deve ser utilizado por meses, podendo a terapia se prolongar por até um ano; ainda é indicado que o tratamento seja mantido após a remissão lesional

por mais quatro semanas. Diferentes respostas ao tratamento podem ocorrer devido ao diferente grau de severidade das formas clínicas da doença ou devido à falta de adesão ao tratamento por parte dos proprietários do animal de estimação, o que pode resultar em falha terapêutica (LARSSON, 2011)

Os diagnósticos diferenciais de esporotricose a serem considerados incluem criptococose, candidíase, histoplasmose, leishmaniose, síndrome leproide felina e o carcinoma de células escamosas. *Cryptococcus* spp. é considerada como o principal diagnóstico diferencial histopatológico em gatos (GROSS et al., 2009). *Cryptococcus* spp. se diferencia de *Sporothrix* spp. devido às seguintes características (do primeiro): o tamanho das leveduras (5 a 10µm), presença da cápsula polissacarídica e de melanina na parede fúngica (GALIZA et al., 2014). A presença de melanina permite com que *Cryptococcus* spp. seja fortemente positivo na coloração de Fontana-Masson (KWONG-CHUNG et al., 1981; GALIZA et al., 2014) e a cápsula polissacarídea é fortemente corada pelo azul Alciano e pela Mucicarmina de Mayer (GUARNER; BRANDT, 2011).

A candidíase é diferenciada por ser uma infecção superficial, atingindo primariamente a epiderme, e por apresentar leveduras (de 3 a 5 µm de diâmetro), e pseudo-hifas (que são estruturas alongadas, tubulares, septadas em forma de cadeia). *Candida* spp. é positiva no PAS e no GMS (ANTUNES et al., 2009; GUARNER; BRANDT, 2011).

A infecção por *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* se difere por ser constituída por infiltrado inflamatório predominantemente histiocítico, as leveduras apresentam-se em agregados no interior de macrófagos, e são ovais e pequenas (2 a 4 µm de diâmetro) (GUARNER; BRANDT, 2011). No HE pode-se observar halo claro na periferia das leveduras, semelhante a uma capsula, porém corresponde a parede celular fúngica espessa a qual não é corada (ANTUNES et al., 2009). A parede celular é realçada com GMS e PAS (GUARNER; BRANDT, 2011).

A leishmaniose diferencia-se por apresentar na histopatologia numerosos amastigotos, arredondados a ovais, de 1 a 2 µm de largura e 2 a 4 µm de comprimento. Estes organismos são visíveis no HE e são negativos no GMS e PAS (GROSS et al., 2009).

A síndrome leproide felina (LARSSON, 2011), causada por micobactérias, é diferenciada pela histopatologia, onde observam-se organismos intracelulares filamentosos acinzentados na coloração de HE. Na coloração de Ziehl-Neelsen

identificam-se bacilos álcool-ácido-resistentes no interior de macrófagos ou de vacúolos na derme. Os organismos são também positivos pelo GMS (GROSS et al. 2009).

Um diagnóstico diferencial relacionado à localização da lesão é o carcinoma de células escamosas (SCHUBACH et al., 2012), afetando principalmente o plano nasal, as pálpebras, e o pavilhão auricular de gatos de pelos e pele brancos (GROSS et al. 2009). Neste caso, as características da proliferação neoplásica de ceratinócitos observada na histopatologia permite a diferenciação de esporotricose.

Os resultados serão apresentados na forma de um artigo científico intitulado “Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina”.

## **2. CAPÍTULO 1**

### **Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina**

Talissa Bazzi, Stella Maris Pereira de Melo, Rafael A. Fighera e Glauca D. Kommers

Artigo a ser submetido para a revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*.

## Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina<sup>1</sup>

Talissa Bazzi<sup>2</sup>, Stella Maris P. de Melo<sup>4</sup>, Rafael A. Fighera<sup>3</sup> e Glaucia D. Kommers<sup>3\*</sup>

**ABSTRACT.** – Bazzi T., Melo S.M.P., Fighera R.A., & Kommers G.D. 2015. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina [Clinical, epidemiological, histomorphological and histochemical characteristics of the feline sporotrichosis]. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com)

Sporotrichosis is a mycotic infection caused by the *Sporothrix* complex species, affecting mostly cats, horses, and dogs. The main objectives of this retrospective study were to characterize the histomorphological and histochemical aspects of sporotrichosis in 10 cats, and also to evaluate epidemiological and clinical aspects, and gross findings obtained from the biopsy and necropsy protocols of the archives of the Laboratório de Patologia Veterinária of the Universidade Federal de Santa Maria. The disease affected mostly male mongrel cats, and was mostly observed in the cutaneous disseminated form. Gross lesions were characterized by cutaneous nodules (ulcerated or not) and by ulcerated masses or plaques. By histopathology, there were a relationship between the fungal load and two patterns of inflammatory response. The first pattern was characterized by high fungal load, and most yeasts were inside of numerous macrophages with abundant, many times vacuolated cytoplasm. The amount of neutrophils ranged from mild to moderate in this pattern. The second pattern was characterized by numerous epithelioid cells and many neutrophils. The fungal load was low and most yeasts were observed in the extracellular space. The yeasts were round, oval or cigar-shaped. Several histochemical techniques, such as Grocott's silver stain, periodic Schiff acid, and Alcian blue were utilized and they made it easier to visualize, to characterize the morphology, and to quantify the organisms. The Giemsa stain allowed visualizing the agent, but it not allowed to sharply highlight them from other intralesional components. Organisms were negative for melanin granules through the Fontana-Masson stain in all cases. The histomorphological and histochemical study allowed demonstrating determinant fungal characteristics to the establishment of the diagnosis by means of this diagnostic tool.

INDEX TERMS: feline sporotrichosis, *Sporothrix* spp. complex, diseases of cats, subcutaneous mycosis.

**RESUMO.** – Esporotricose é uma infecção fúngica causada por espécies do complexo *Sporothrix*, vista com maior frequência em gatos, equinos e cães. Os principais objetivos deste estudo retrospectivo foram caracterizar os aspectos histomorfológicos e histoquímicos da esporotricose em 10 gatos, além de avaliar

<sup>1</sup> Recebido em.....

Aceito para publicação em.....

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Patologia e Patologia Clínica Veterinária, Centro de Ciência Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, UFSM.\* Autor para correspondência: [glaukommers@yahoo.com](mailto:glaukommers@yahoo.com).

<sup>4</sup> Curso de Medicina Veterinária (Bolsista PIBIC/CNPq), CCR, UFSM.

os aspectos epidemiológicos, clínicos e os achados macroscópicos obtidos dos protocolos de biópsias e necropsias dos arquivos do Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria. A doença acometeu predominantemente gatos machos, sem raça definida e apresentou-se principalmente na forma cutânea disseminada. As lesões macroscópicas caracterizaram-se como nódulos cutâneos (ulcerados ou não) e como massas e placas ulceradas. Na histopatologia observou-se uma relação entre a quantidade de leveduras observada e dois padrões de resposta inflamatória. O primeiro padrão caracterizou-se por numerosas leveduras que se encontravam, na sua maioria, no interior de numerosos macrófagos com citoplasma abundante e muitas vezes vacuolizado. Nesse padrão, a quantidade de neutrófilos variava de leve a moderada. O segundo padrão caracterizava-se por numerosas células epitelioides, infiltrado predominantemente acentuado de neutrófilos e a quantidade de leveduras era leve e estas eram observadas geralmente livres no espaço extracelular. As leveduras eram redondas, ovais ou alongadas (em forma de charuto). Foram utilizadas várias técnicas histoquímicas como a impregnação pela prata de Grocott, ácido periódico de Schiff e azul Alciano que facilitaram a visualização, caracterização da morfologia e quantificação dos organismos. A coloração de Giemsa permitiu a visualização do agente, porém não permitiu destacá-los nitidamente de outros elementos intralésionais. Os organismos foram negativos para grânulos de melanina pela coloração de Fontana-Masson em todos os casos. O estudo histomorfológico e histoquímico permitiu demonstrar características fúngicas determinantes para o estabelecimento do diagnóstico de esporotricose através dessa ferramenta diagnóstica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: esporotricose felina, complexo *Sporothrix* spp., doenças de gatos, micose subcutânea.

## INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma micose subcutânea, subaguda ou crônica, causada por espécies do complexo *Sporothrix*. O complexo compreende pelo menos seis espécies (Antunes et al. 2009, Vásquez-del-Mercado et al. 2012): *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriei* e *S. pallida* (Rodrigues et al. 2012). As quatro primeiras já foram isoladas no Brasil (Rodrigues et al. 2014). Esporotricose já foi descrita em humanos e em várias espécies animais que incluem gatos, cães, ratos, tatus, equinos (Telléz et al. 2014), asininos, bovinos, caprinos, suínos, hamsters, camelos, chimpanzês e aves domésticas (Ginn et al. 2007), mas é diagnosticada com maior frequência em gatos (Lacaz 2002, Ginn et al. 2007).

*Sporothrix schenckii*, a principal espécie associada à doença, é um fungo dimórfico (Howard 1960, Ginn et al. 2007), geófilico e sapróbio, distribuído amplamente na natureza, em solo rico em matéria orgânica em decomposição, em folhas secas, madeira, espinhos de plantas (principalmente roseiras) e musgos (Lopes-Bezerra et al. 2006, Antunes et al. 2009). A esporotricose é considerada um risco ocupacional para indivíduos que trabalham com solo, plantas ou materiais vegetais, pois a principal forma de infecção é através da inoculação do fungo devido à perfuração por espinhos ou lascas de madeira (Ginn et al. 2007, Schubach et al. 2012). Transmissão zoonótica, através de mordidas ou arranhões de ratos, tatus, gatos e cães, também ocorrem (Schubach et al. 2012), sendo os gatos a espécie animal mais associada com



essa forma de contágio, devido principalmente à grande quantidade de leveduras nas lesões, mas também por carregarem o agente nas unhas e na cavidade oral (Souza et al. 2006, Antunes et al. 2009, Schubach et al. 2012).

A doença é mais comum em zonas temperadas a tropicais, pois se sugere que o clima, a temperatura atmosférica e a umidade relativa do ar influenciem no crescimento do fungo no seu estado saprofito (Díaz 1989, Ginn et al. 2007). Na América Latina, a esporotricose humana é considerada endêmica (Díaz 1989). No Brasil é endêmica no Rio de Janeiro, onde foi observado um crescimento exponencial de casos a partir do ano de 2000 (Barros et al. 2010). Neste contexto, *S. brasiliensis* (a espécie mais virulenta do complexo *Sporothrix*) tem sido considerado o agente predominante em gatos. Sua ocorrência é restrita às regiões Sul e Sudeste do Brasil, de acordo com a revisão de Rodrigues et al. (2014).

A classificação das formas clínicas utilizadas em humanos, cutânea localizada ou disseminada, cutâneo-linfática e extracutânea ou sistêmica (Lacaz 2002, Ginn et al. 2007, Telléz et al. 2014), é difícil de ser aplicada em cães e gatos, pois eles frequentemente têm mais de uma forma simultaneamente (Schubach et al. 2012). A rota usual de transmissão é a pele (Díaz 1989), mas também pode ocorrer por inalação, causando a forma extracutânea (Barros et al. 2010).

A infecção inicia com a inoculação do fungo, que penetra no tecido até as camadas mais profundas, onde ocorre a transição micélio-levedura; esse período dura em torno de 13 dias (Antunes et al. 2009). A levedura pode permanecer na derme e subcutâneo (local da inoculação), espalhar-se através de drenagem linfática ou disseminar-se sistemicamente pelos vasos sanguíneos (Schubach et al. 2012).

Em gatos, a esporotricose manifesta-se clinicamente como lesões cutâneas nodulares ou em placa, firmes, alopecicas e indolores que fistulam ou ulceram, liberando líquido serossanguinolento (Gross et al. 2009). Histologicamente, observa-se uma resposta inflamatória predominantemente granulomatosa, com variações principalmente quanto ao predomínio de macrófagos ou de células epitelioides e nos demais componentes da resposta inflamatória (Miranda et al. 2013).

O diagnóstico de esporotricose baseia-se no isolamento e identificação do agente em cultura (Chomel 2014). Além disso, ela pode ser diagnosticada através da correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Dados laboratoriais incluem o exame direto (citologia do exsudato das lesões) ou o exame histopatológico (Barros et al. 2011). A técnica de imuno-histoquímica também é útil no diagnóstico, porém está disponível somente em alguns centros diagnósticos (Miranda et al. 2011), pela ausência de anticorpos comerciais. Como em alguns casos a suspeita de esporotricose ocorre somente durante o exame histopatológico e, portanto, as amostras já se encontram fixadas em formol, é importante reconhecer detalhadamente as características histomorfológicas e histoquímicas para realizar o diagnóstico. O objetivo deste estudo foi analisar e discutir os aspectos histomorfológicos e histoquímicos de dez casos de esporotricose diagnosticados em gatos no Laboratório de Patologia Veterinária (LPV) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e associá-los aos sinais clínicos e aos aspectos epidemiológicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Dez casos de esporotricose felina, diagnosticados no LPV-UFSM, foram avaliados quanto aos aspectos epidemiológicos (incluindo raça, sexo e idade), histórico clínico e alterações clínico-patológicas. Esses casos foram validados através do exame histopatológico, pela evidência do agente nas lesões somado a sua morfologia característica e às suas propriedades tintoriais histoquímicas. Para isso, foram incluídos casos em que os fungos apresentavam os seguintes critérios morfológicos: 1) ocorrer na forma de levedura; 2) ser oval, redondo ou alongado (“forma de charuto”); 3) ter entre 2 e 8µm; e 4) apresentar espécimes com brotamentos de base estreita, os quais podem também ser tubulares. Esses critérios foram estabelecidos com base em Lacaz (2002), Ginn et al. (2007), Gross et al. (2009), Guarner & Brandt (2011), Schubach et al. (2012) e Mahajan (2014).

Informações detalhadas foram obtidas a partir dos laudos de biópsias (Gatos 1-5) ou de necropsias (Gatos 6-10). Os espécimes provenientes de necropsias ou biópsias haviam sido fixados em formol tamponado a 10% e processados rotineiramente para histopatologia. Seções de 3µm, coradas com hematoxilina e eosina (HE), foram reavaliadas para quantificar as leveduras, classificar e determinar a intensidade da resposta inflamatória em cada caso. Utilizaram-se também técnicas histoquímicas como a impregnação pela prata de Grocott (GMS), ácido periódico de Schiff (PAS), azul alciano (AA), Giemsa e Fontana-Masson (FM) para melhor visualização e, conseqüentemente, caracterização das leveduras. As seções foram analisadas pelas técnicas histoquímicas em duas ampliações (400x e 1000x). A quantidade de organismos foi classificada em leve (+; quando se observavam até cinco organismos por campo de 1000x), moderada (++; 6 a 50 organismos por campo de 1000x) ou acentuada (+++; mais de 50 organismos por campo de 1000x). As imagens das leveduras foram obtidas através de um microscópio Olympus BX51, com câmera digital DP21, controlada pelo programa Olympus CellSens®.

## RESULTADOS

Os dados epidemiológicos encontram-se detalhados no Quadro 1. Sete gatos não tinham raça definida (SRD), dois eram de raça e em um a raça não foi informada. Do total de dez gatos, oito eram machos e dois eram fêmeas. Em cinco casos havia informação de serem machos inteiros (Gatos 6-10). A média da idade dos gatos foi de cinco anos e seis tinham mais de cinco anos.

Os históricos clínicos dos Gatos 1, 6, 7 e 10 continham informações de que gatos de vizinhos haviam sido diagnosticados com esporotricose. Todos esses eram da mesma vizinhança. O Gato 2 foi arranhado por outro gato e depois surgiram as lesões cutâneas. As lesões no Gato 3 tinham evolução de sete meses; no Gato 6, de um mês; e no Gato 7, de um ano. Os históricos dos demais gatos não tinham informações sobre a evolução clínica. Em relação ao estado corporal, o Gato 3 tinha histórico de emagrecimento. Os Gatos 6, 7 e 10 estavam em bom estado, e os Gatos 8 e 9 estavam em mau estado corporal.

Quanto ao tratamento, as seguintes situações foram observadas nos casos estudados: (a) não havia histórico sobre tratamento específico para esporotricose (Gatos 1, 2, 3, 5, 8 e 9); (b) o Gato 4 foi tratado sem sucesso, porém não foi especificado o tipo de tratamento; (c) o Gato 6 foi tratado com antibiótico; (d) o Gato 10 recebeu tratamento específico para esporotricose (itraconazol), porém sem resposta satisfatória; (e) o Gato 7 tinha histórico de nunca ter sido tratado.

A quantidade e localização das lesões e as formas clínicas estão detalhadas no Quadro 1. Os sinais clínicos e as lesões macroscópicas foram observados como nódulos (ulcerados ou não), e como massas e placas ulceradas. Frequentemente, as áreas ulceradas eram recobertas por crostas, muitas vezes espessas (Fig.1-6).

Dos dez casos, cinco (Gatos 1, 2, 7, 9 e 10) tinham suspeita clínica de esporotricose. No Gato 2 havia diagnóstico de esporotricose pela citologia. A cultura foi realizada em amostras de pele dos Gatos 7, 9 e 10, resultando positiva no Gato 9 e negativa nos Gatos 7 e 10. O desfecho dos casos de biópsias não foi determinado. Dos casos de necropsias, somente o Gato 8 teve morte espontânea; os demais foram submetidos à eutanásia.

Todos os casos foram diagnosticados pelas alterações histológicas e pela evidência do agente intralésional, somado à sua morfologia e às suas propriedades tintoriais histoquímicas características. Na histopatologia havia infiltrado inflamatório que se estendia da derme superficial até a profunda, por vezes atingindo o tecido subcutâneo. O infiltrado inflamatório caracterizava-se pela presença de diferentes proporções de macrófagos, células (macrófagos) epitelioides, neutrófilos, linfócitos e plasmócitos. Este infiltrado era distribuído de forma multifocal (algumas vezes nodular), coalescente ou difuso. Observou-se uma relação entre a quantidade de leveduras observada no HE e dois padrões de inflamação. O primeiro padrão (Gatos 1, 2, 4, 5, 6 e 9) caracterizava-se pela presença de numerosas leveduras (++ para o Gato 1 e +++ para os demais) que se encontravam, na sua maioria, no interior de numerosos macrófagos com citoplasma abundante e muitas vezes vacuolizado (Fig.7 e 8). A quantidade de neutrófilos variava de leve a moderada e havia infiltrado, geralmente leve, de linfócitos e plasmócitos. O segundo padrão (Gatos 3, 7, 8 e 10) caracterizava-se por grande quantidade de células epitelioides, infiltrado acentuado de neutrófilos e escassos linfócitos (Fig.9 e 10). A quantidade de leveduras nesses casos era leve (+) e estas eram observadas geralmente livres.

Os organismos foram quantitativamente identificados de forma semelhante nas colorações de HE, PAS, AA e GMS (Quadro 2). Porém, quando a quantidade de leveduras era leve (+), a quantificação dos organismos foi muito facilitada pelos métodos do PAS, AA e GMS (Fig.11-16). Qualitativamente, as colorações de PAS, AA e GMS permitiram uma melhor evidência da morfologia das leveduras, quando comparadas ao HE.

As leveduras eram redondas (maioria), ovais, ou alongadas (em forma de charuto), com 2 a 8µm (Fig.17). Os brotamentos foram melhor identificados nas colorações de PAS e GMS. Os brotamentos foram vistos como projecções alongadas (tubulares) ou em base estreita a partir da levedura redonda (Fig.17 - detalhe).

A coloração de Giemsa permitiu a visualização do agente, porém não permitiu destacá-los nitidamente de debris celulares e do infiltrado inflamatório (Fig.18), dificultando a visualização quando havia poucas leveduras. Em todos os casos não foi possível detectar a presença de melanina nos organismos através da coloração de FM.

## DISCUSSÃO

Por meio deste estudo retrospectivo, foi possível caracterizar aspectos epidemiológicos e clínico-patológicos da esporotricose em dez gatos. Quanto aos dados epidemiológicos observou-se que a grande maioria dos gatos eram SRD, o que foi consistente com as observações de outros autores (Rossi et al. 2013a, Rossi et al. 2013b). Cabe ressaltar que na área de abrangência do LPV-UFSM, gatos SRD são muito representados.

Quanto ao sexo, 8/10 gatos eram machos, sendo cinco inteiros. Essa tendência da esporotricose em afetar mais machos (Miranda et al. 2013) deve-se ao maior acesso ao ambiente extradomiciliar (Gross et al. 2009), o que resulta em maior probabilidade de os machos se envolverem em brigas por fêmeas ou por território, principalmente aqueles não castrados (Schubach et al. 2012). Além disso, os gatos possuem comportamentos como cobrirem seus dejetos com terra, lutar com outros animais e escalar e afiar as unhas em árvores (Larsson et al. 1989, Antunes et al. 2009, Schubach et al. 2012), o que os predispõe a se tornarem portadores do fungo e o dispersar pelo ambiente (Schubach et al. 2012). Vale salientar que neste estudo quatro gatos machos eram da mesma vizinhança, indicando a possibilidade de disseminação da doença através da interação animal ou de uma mesma fonte ambiental.

Em todos os casos de necropsias deste estudo havia somente manifestação cutânea da doença, ocorrendo principalmente a forma cutânea disseminada. Não foi possível saber o desfecho dos casos remetidos como biópsias. As duas formas cutâneas (localizada e disseminada) têm sido descritas como as mais frequentes em gatos (Antunes et al. 2009), porém há controvérsias quanto a qual das duas seria a mais prevalente (Rossi et al. 2013b, Miranda et al. 2013). Nos gatos aqui estudados não foi possível observar uma relação entre a multiplicidade de lesões cutâneas e a carga fúngica intralesional, pois 9/10 gatos tinham múltiplas lesões cutâneas e cinco desses tinham alta carga fúngica, enquanto quatro tinham poucas leveduras nos tecidos. Entretanto, em um estudo com 86 gatos havia indicação de que um maior número de lesões cutâneas observadas clinicamente estava associado com uma maior carga fúngica (Miranda et al. 2013).

Os principais sinais clínicos/lesões macroscópicas caracterizavam-se por lesões cutâneas únicas ou múltiplas, geralmente ulceradas e crostosas. A lesão inicial de esporotricose caracteriza-se pela formação de nódulos subcutâneos, firmes, que lentamente tornam-se macios ou maleáveis (“gomosos”). À medida que isso ocorre, passam a drenar conteúdo seroso ou purulento e progridem para a formação de úlceras marcadamente exsudativas, com bordas ligeiramente definidas (Larsson et al. 1989). A evolução da doença é geralmente grave (Schubach et al. 2012).

Apesar de que em cinco gatos deste estudo retrospectivo havia suspeita clínica de esporotricose, somente em três deles havia informação sobre o envio de amostras para cultura micológica. A cultura e identificação de espécies de *Sporothrix* é considerada por muitos autores como sendo a técnica padrão-ouro de diagnóstico (Schubach et al. 2012, Mahajan 2014). Entretanto, a falta de suspeita clínica faz com que amostras de biópsias e mesmo de necropsias sejam conservadas apenas em formol, impossibilitando o envio para exame micológico (Miranda et al. 2011). Nos casos em que amostras não foram submetidas para cultura, a cultura resultou negativa ou ocorreu contaminação da cultura (com microorganismos saprófitas), os critérios da morfologia fúngica intratecidual são utilizados como ferramenta diagnóstica (Jensen et al. 1996). Nos gatos, os organismos fúngicos são considerados altamente característicos nos tecidos, permitindo a confirmação do diagnóstico definitivo de esporotricose (Gross et al. 2009).

As regiões mais afetadas nos gatos estudados foram a cabeça e membros, seguidos de cauda, abdômen, região lombar e região lateral ao saco escrotal. Na literatura, as áreas mais afetadas são a cabeça, especialmente focinho e região periocular (Schubach et al. 2012), a cauda e os membros (Antunes et al. 2009, Gross et al. 2009, Schubach et al. 2012). Esses locais são considerados os mais afetados durante as brigas (Rosser & Dunstan 2006).

Neste estudo ficou bem caracterizada a ocorrência de dois padrões de lesão histológica. Nesses padrões, o tipo de infiltrado inflamatório estava relacionado com uma diferença marcada na quantidade de leveduras intralesionais. O padrão com predomínio de macrófagos estava associado com uma carga fúngica alta e o padrão com predomínio de células epitelioides estava associado com uma carga fúngica baixa. Essa observação deve ser ressaltada, pois em grande parte da literatura veterinária somente o padrão inflamatório macrofágico associado à alta carga fúngica é mencionado na esporotricose felina (Marques et al. 1993, Ginn et al. 2007, Antunes et al. 2009). Porém, o patologista deve estar alerta para a ocorrência de um padrão com predomínio de células epitelioides e uma carga fúngica bastante baixa, a qual muitas vezes é melhor detectada por meio de técnicas histoquímicas adicionais à coloração de HE. Baixa carga fúngica tecidual em caso com cultura positiva para *Sporothrix* já foi observada, conforme revisado por Gross et al. (2009). Isso demonstra que nem sempre os gatos apresentam um alto potencial zoonótico como geralmente afirmado (Souza et al. 2006, Antunes et al. 2009, Gross et al. 2009, Schubach et al. 2012) e podem ter lesões que se assemelham a esporotricose canina (Gross et al. 2009), dificultando sobremaneira o diagnóstico.

A observação de uma relação inversa entre a intensidade de neutrófilos e a carga fúngica tecidual, com uma alta proporção de casos apresentando alta carga fúngica juntamente com intensidade leve a moderada de neutrófilos foi um aspecto característico da esporotricose felina em 86 casos avaliados (Miranda et al. 2013) e também foi observada nos gatos aqui estudados. Conforme discutido por Miranda et al. (2013), em camundongos, a maior eficiência da fagocitose fúngica pelos neutrófilos nessa espécie poderia justificar uma baixa carga fúngica em lesões ricas em neutrófilos.

Quatro gatos (Gato 3, 7, 8 e 10) com mais de cinco anos tinham carga fúngica intralesional leve. Há um estudo que diz que animais acima de cinco anos são mais resistentes à infecção (Miranda et al. 2013), porém neste estudo também havia gatos com mais de cinco anos apresentando carga fúngica moderada a alta (Gatos 1 e 5). Chama a atenção o fato de que o padrão inflamatório com predomínio de células epitelioides (com baixa carga fúngica) foi observado nesses mesmos quatro gatos. Associação do padrão inflamatório com células epitelioides com a idade acima de cinco anos também foi observada anteriormente (Miranda et al. 2013).

O número de gatos analisados neste estudo não permitiu estabelecer se o padrão inflamatório constituído por células epitelioides e infiltrado inflamatório neutrofílico acentuado estaria relacionado com um melhor controle da doença. Em um estudo com 86 gatos, os resultados da histopatologia sugeriram uma relação entre uma resposta inflamatória bem organizada (com formação de granulomas e presença de células epitelioides) e o controle da carga fúngica, bem como sua associação com a condição geral do animal e a apresentação clínica da doença. Entretanto, não foi possível determinar se as diferentes apresentações clínicas, a carga fúngica e o perfil inflamatório estavam relacionados à infecção por diferentes espécies do complexo *Sporothrix* ou a diferentes susceptibilidades dos gatos (Miranda et al. 2013).

A reação de *Splendore-Hoeppli* circundando as leveduras tem sido descrita como muito frequente na esporotricose humana (Vásquez-del-Mercado et al. 2012, Mahajan 2014). Porém, não tem sido descrita na esporotricose felina (Miranda et al. 2009, Schubach et al. 2012) e também não foi vista nos gatos deste estudo.

A utilização de um painel histoquímico permitiu ampliar o uso desta ferramenta diagnóstica na detecção de *Sporothrix* intralésionais. Neste painel, as colorações de PAS, GMS e AA foram as que melhor permitiram a visualização do agente, a identificação da sua morfologia e dimensões, bem como a sua distribuição intra e extracelular. A observação através da objetiva de imersão (aumento de 1000x) foi extremamente útil na localização das leveduras quando estas eram escassas, na identificação dos brotamentos e de detalhes morfológicos das leveduras.

Classicamente, as colorações de PAS e GMS são utilizadas na detecção de *Sporothrix* spp. (Marques et al 1992, Lacaz 2002, Gross et al. 2009, Miranda et al. 2009, Barros et al. 2011). Entretanto, a técnica do AA não tem sido mencionada para este fim. Nos casos aqui estudados, o AA se mostrou extremamente útil na detecção do agente, por corar fortemente em azul a parede da levedura, contrastando com as demais estruturas teciduais. Esta técnica já tinha sido utilizada na detecção da cápsula de polissacarídeos e da parede celular de *Cryptococcus* spp. em outro estudo (Galiza et al. 2014).

Por outro lado, a técnica de Giemsa (histológico), por ser monocromática, permitiu a visualização do agente, mas não o destacou do contexto de debris celulares e do infiltrado inflamatório. Essa coloração tem sido indicada para o exame do exsudato (pus) das lesões na citologia (Lacaz 2002).

A técnica de FM foi utilizada neste painel numa tentativa de detecção de grânulos de melanina nas leveduras, considerando que a melanina tem sido descrita como um dos fatores importantes de virulência de espécies de *Sporothrix* (Romero-Martinez et al. 2000). Entretanto, em nenhum dos casos houve detecção da melanina, fazendo pensar que as quantidades são bastante pequenas para a sensibilidade desta técnica (Kwon-Chung et al. 1981).

Adicionalmente, a negatividade no FM foi um fator importante para distinguir de criptococose, que é considerado o principal diagnóstico diferencial histopatológico em gatos (Gross et al. 2009), pois *Cryptococcus* spp. se mostram fortemente positivos nesta coloração (Kwon-Chung et al. 1981, Galiza et al. 2014). As diferenças marcantes entre *Sporothrix* spp. e *Cryptococcus* spp. estão no tamanho das leveduras (maiores), na presença da cápsula polissacarídica e de melanina na parede fúngica deste outro fungo (Kwon-Chung et al. 1981, Galiza et al. 2014). Outros diagnósticos diferenciais incluem candidíase, histoplasmose, leishmaniose, síndrome leproide felina e o carcinoma de células escamosas (em gatos despigmentados) (Larsson et al. 1989, Antunes et al. 2009, Gross et al. 2009, Guarner & Brandt, 2011).

## CONCLUSÕES

Este estudo retrospectivo de 10 casos de esporotricose em gatos permitiu concluir que:

- a) gatos machos foram os mais acometidos;
- b) as lesões cutâneas eram múltiplas na maioria dos gatos e ocorriam principalmente na cabeça, membros e cauda;

- c) a avaliação histopatológica permitiu classificar as lesões em dois padrões relacionados com cargas fúngicas de intensidades diferentes e com infiltrados inflamatórios com componentes celulares distintos;
- d) devido ao elevado número de casos atípicos (segundo padrão de lesão) observados, estudos adicionais são necessários para elucidar a patogênese dessas lesões.
- e) as técnicas histoquímicas utilizadas permitiram observar características morfológicas e tintoriais determinantes no diagnóstico de esporotricose felina, com destaque para a técnica do azul Alciano.

**Agradecimentos:** T. Bazzi (mestrado) é bolsista do CNPq. G.D. Kommers é bolsista de Produtividade do CNPq (PQ-2; Processo nº307555/2013-5). O projeto é financiado pelo CNPq – Edital Universal (Processo nº 474839/2012-5).

## REFERÊNCIAS

- Antunes T.A., Meinerz A.R.M., Martins A.A., Madrid I.M. & Nobre M.O. 2009. Esporotricose, p.109-121. In: Meireles M.C.A. & Nascente P.S. (Org.), Micologia Veterinária. Ed. Universitária UFPEL, Pelotas.
- Barros M.B.L., Schubach T.P., Coll J.O., Gremião I.D., Wanke B. & Schubach A. 2010. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Rev Panam Salud Publica*. 27(6):455-460.
- Barros M.B.L., Paes R.A. & Schubach A.O. 2011. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(4):633-654.
- Chomel B.B. 2014. Emerging and re-emerging zoonoses of dogs and cats. *Animals*. 4:434-445.
- Díaz I.A.C. 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 108:113-116.
- Ginn P.E., Mansell J.E.K.L. & Rakich P.M. 2007. Sporotrichosis, p.703-704. In: Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. (Eds), Pathology of Domestic Animals. Vol.1. 5ª ed. Elsevier, Philadelphia.
- Galiza G.J.N., Silva T.M., Caprioli R.A., Tochetto C., Rosa F.B., Figuera R.A. & Kommers G.D. 2014. Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia. *Pesq. Vet. Bras*. 34(3):261-269.
- Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J. & Affolter V.K. 2009. Esporotricose, p.289-292. In: Ibid. (Eds), Doenças de pele do cão e do gato. 2ª ed. Roca, São Paulo.
- Guarner J. & Brandt M.E. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21<sup>st</sup> century. *Clin. Microbiol. Rev.* 24(2):247-280.
- Howard D.H. 1960. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. *J Bacteriol* 81:464-469.
- Jensen H.E., Aalbaek B., Lind P. & Krogh H.V. 1996. Immunohistochemical diagnosis of systemic bovine zygomycosis by Murine Monoclonal Antibodies. *Vet. Pathol.* 33(2):176-183.
- Kwon-Chung, K.J., Hill W.B. & Bennett J.E.. 1981. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. *J. Clin. Microbiol.* 13:383-387.
- Lacaz C.S. 2002. Esporotricose e outras Micoses Gomosas, p.479-487. In: Lacaz C.S., Porto E., Martins J.E.C., Heis-Vaccari E.M. & Takahashi de Melo N. (ed), Tratado de micologia médica Lacaz. 9ª ed. Savier, São Paulo.
- Larsson C.E, Gonçalves M.A., Araujo V.C., Dagli M.L.Z., Correa B. & Fava Neto C. 1989. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonótico. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*. 31(5):351-358.
- Lopes-Bezerra L.M., Schubach A. & Costa R.O. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Cien.* 78(2):293-308.
- Mahajan V.K. 2014. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatol. Res. Pract.* 2014:1-13.
- Marques M.E.A., Coelho K.I.R., Sotto M.N. & Bacchi C.E. 1992. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. *J. Clin. Pathol.* 45:1089-1093.
- Marques S.A., Franco S.R.V.S., Camargo R.M.P., Dias L.D.F., Haddad Júnior V. & Fabris V.E. 1993. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*. 35(4):327-330.
- Miranda L.H.M., Conceição-Silva F., Quintella L.P., Kuraiem B.P., Pereira S.A. & Schubach T.M.P. 2013. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Microbiol. Infect. Dis.* 36(2013):425-432.

- Miranda L.H.M., Quintella L.P., Menezes R.C., Santos I.B., Oliveira R.V.C., Figueiredo F.B., Lopes-Bezerra L.M. & Schubach T.M.P. 2011. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Vet. J.* 190(2011):408-411.
- Miranda L.H.M., Quintella L.P., Santos I.B., Menezes R.C., Figueiredo F.B., Gremião I.D.F., Okamoto t., Oliveira R.V.C., Pereira S.A., Tortelly R. & Schubach T.M.P. 2009. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia.* 168:79-87.
- Rodrigues A.M., Hoog G.S., Zhang Y. & Camargo Z.P. 2014. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg. Microbes Infect.* 3:1-10.
- Romero-Martinez R., Wheeler M., Guerrero-Plata A., Rico G. & Torres-Guerrero H. 2000. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect. Immun.* 68(6):3696-3703.
- Rosser E.J. & Dunstan R.W. 2006. Sporotrichosis, p.608-612. In: Greene C.E. (Ed), *Infectious Diseases of the dog and cat.* 3<sup>a</sup> ed. Elsevier, Philadelphia.
- Rossi C.N., Odaguiri J. & Larsson C.E. 2013a. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. *Acta. Sci. Vet.* 41:1112-1116.
- Rossi C.N., Odaguiri J. & Larsson C.E. 2013b. Clinical and epidemiological characterization of sporotrichosis in dogs and cats (São Paulo, Brazil). *C. Agrárias.* 34(6):3889-3896.
- Schubach T.M.P, Menezes R.C. & Wanke B. 2012. Sporotrichosis, p.645-650. In: Greene C.E. (Ed), *Infectious Diseases of the dog and cat.* 4<sup>a</sup> ed. Elsevier, St Louis.
- Souza L.L., Nacente P.S., Nobre M.O., Meinerz A.R.M. & Meireles M.C.A. 2006. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Braz. J. Microbiol.* 37:372-374.
- Téllez M.D., Batista-Duharte A., Portuondo D., Quinello C., Bonne-Hernández R. & Carlos I.Z. 2014. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. *Microbiology.* 160:2352-2365.
- Vásquez-del-Mercado E., Arenas R. & Padilla-Desgarenes C. 2012. Sporotrichosis. *Clin. Dermatol.* 30:437-443.





Fig.1. Esporotricose felina; Gato 10. Placas ulceradas, bem circunscritas, eritematosas, circulares a ovaladas e úmidas (exsudato), localizadas na borda lateral da orelha, na base medial da orelha e na lateral da face.



Fig.2. Esporotricose felina; Gato 7. Lesão ulcerativa e crostosa comprometendo todo o plano nasal, se estendendo da ponte ao espelho nasal, e na orelha esquerda (base e borda).



Fig.3. Esporotricose felina; Gato 7. Placa ulcerada, circular e bem delimitada na face dorso-lateral da região metacarpiana.



Fig.4. Esporotricose felina; Gato 10. Nódulo digital alopécico que caracteriza paroníquia.



Fig.5. Esporotricose felina; Gato 10. Úlceras bem circunscritas ovaladas e úmidas localizadas na região lombar e lateral a cauda.



Fig.6. Esporotricose felina; Gato 7. Úlceras multifocais na face dorso-lateral da cauda.

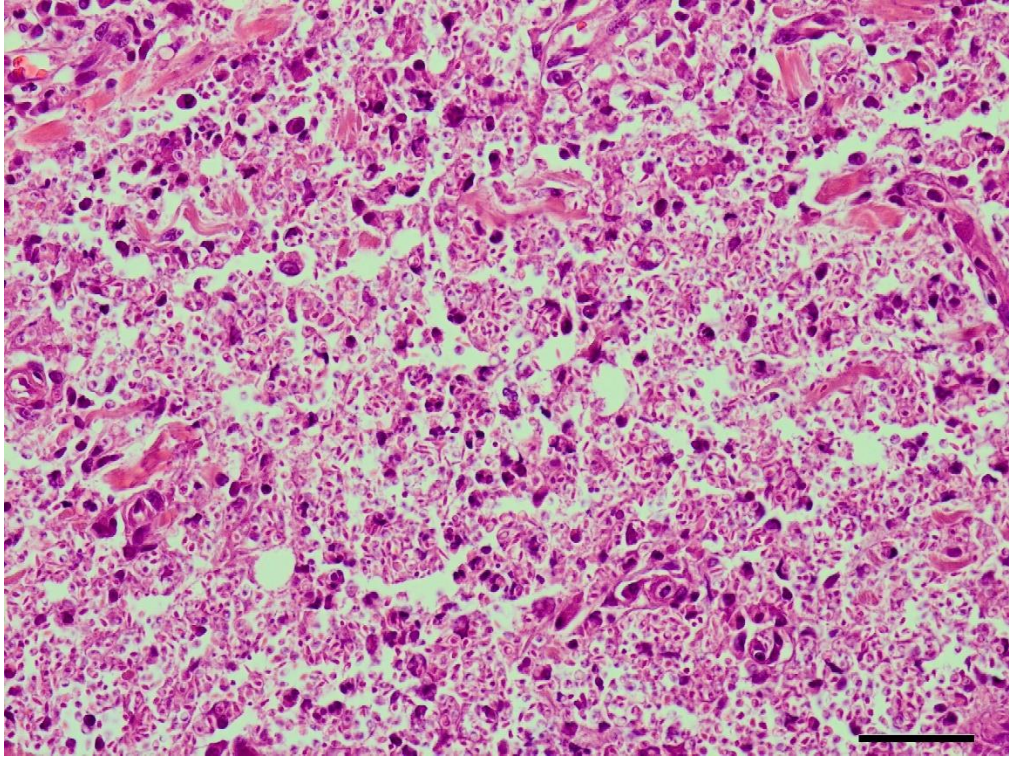


Fig.7. Esporotricose felina; Gato 6. Infiltrado inflamatório composto de macrófagos com citoplasma abundante e preenchido por numerosas leveduras. Há leve quantidade de neutrófilos esparsos. HE, obj. 40x.

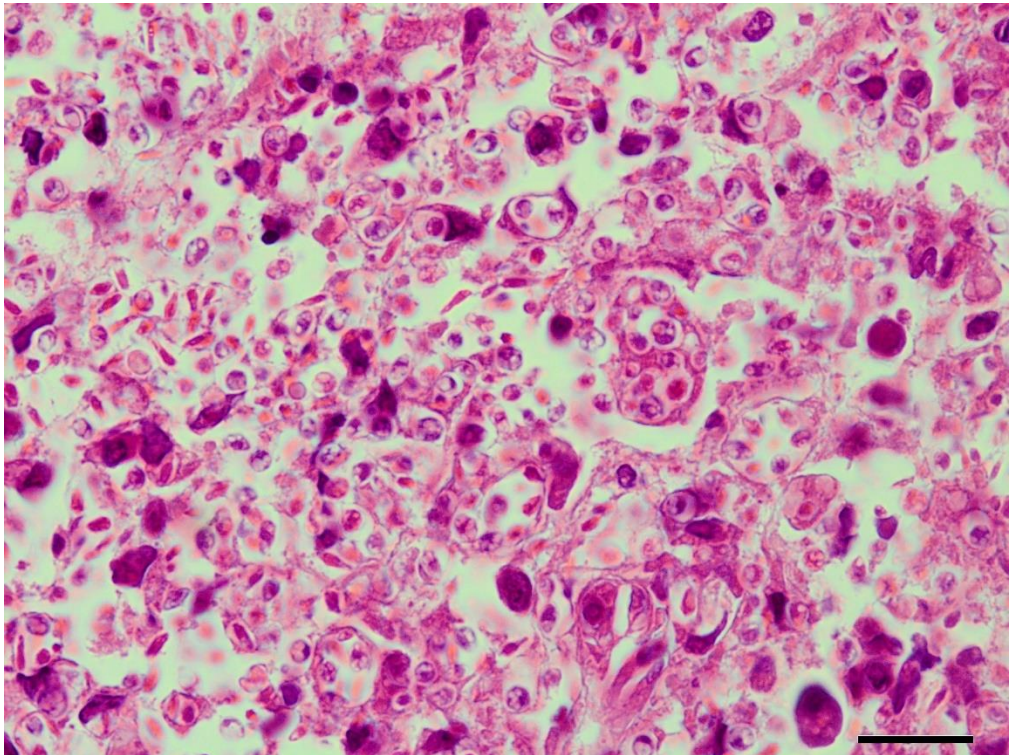


Fig.8. Esporotricose felina; Gato 6. Macrófagos preenchidos por leveduras redondas, ovais e alongadas (em forma de charuto). Há exemplares de leveduras extracelulares. HE, obj. 100x.

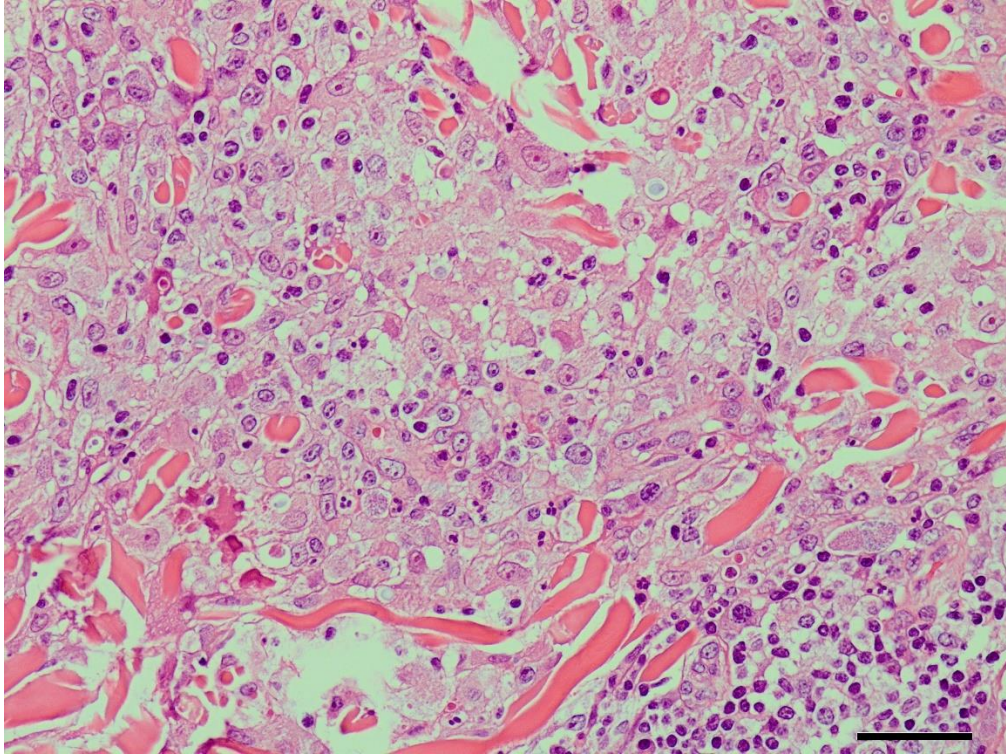


Fig.9. Esporotricose felina; Gato 3. Infiltrado inflamatório composto de numerosas células epitelioides e poucos neutrófilos e linfócitos. HE, obj. 40x.

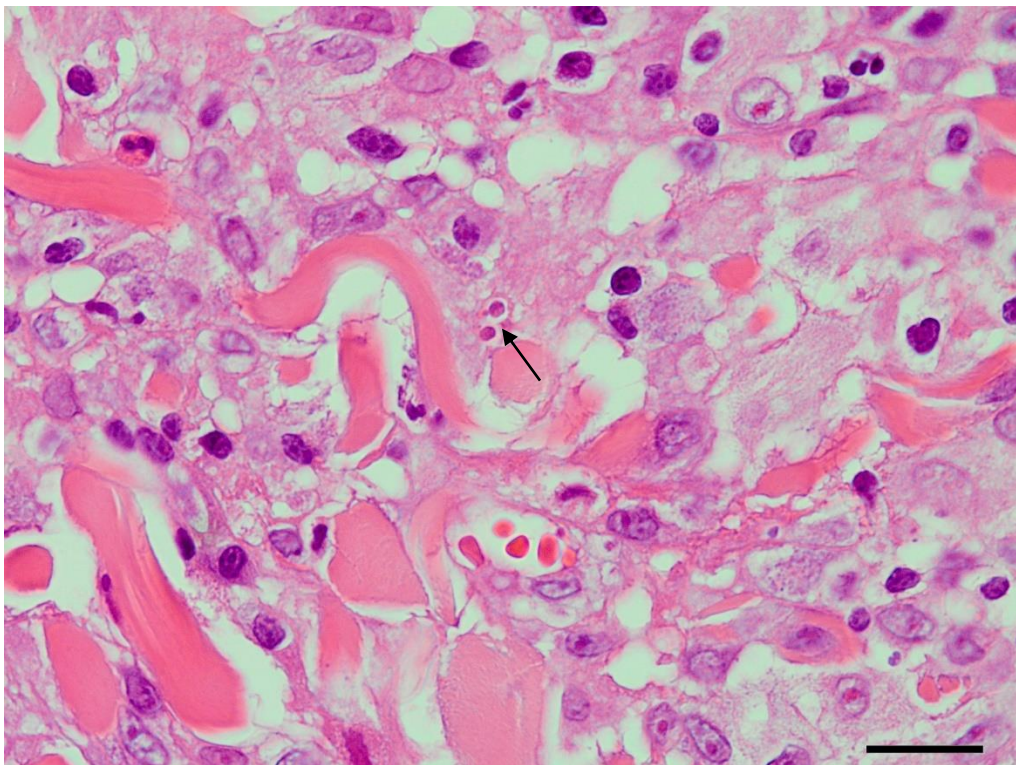


Fig.10. Esporotricose felina; Gato 3. Escassa quantidade de leveduras (seta) em meio às células epitelioides. HE, obj. 100x.

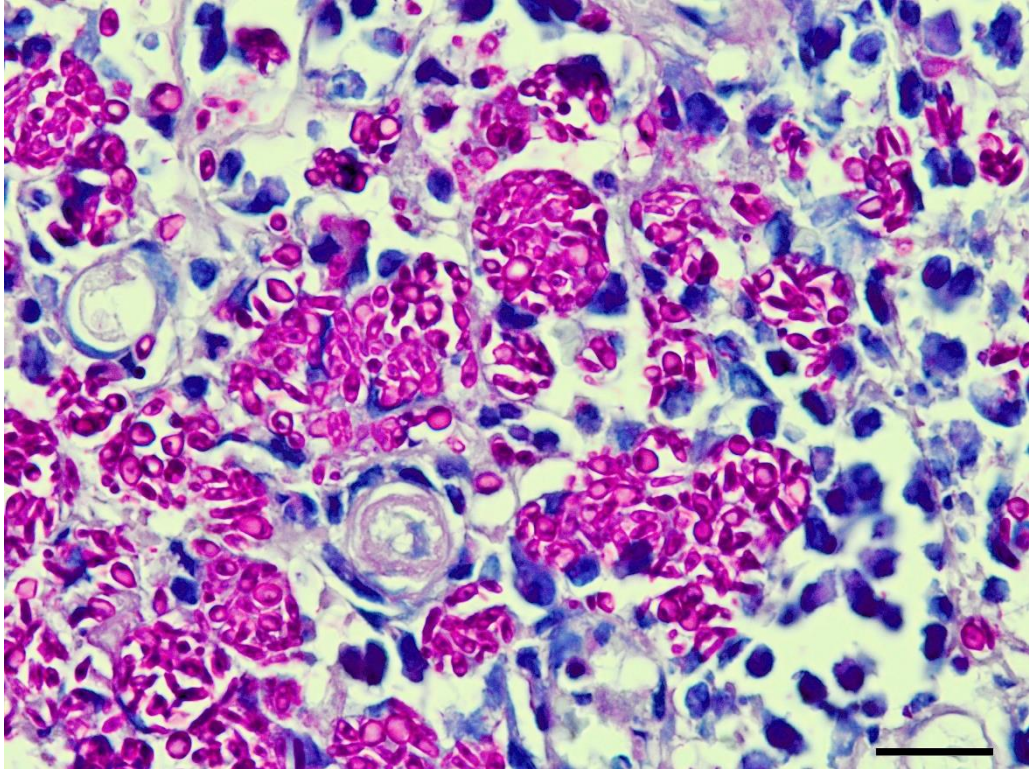


Fig.11. Esporotricose felina; Gato 4. Numerosas leveduras coradas em rosa, predominantemente no interior de macrófagos (mesmo padrão de lesão das Fig.7 e 8). Ácido periódico de Schiff, obj. 100x.

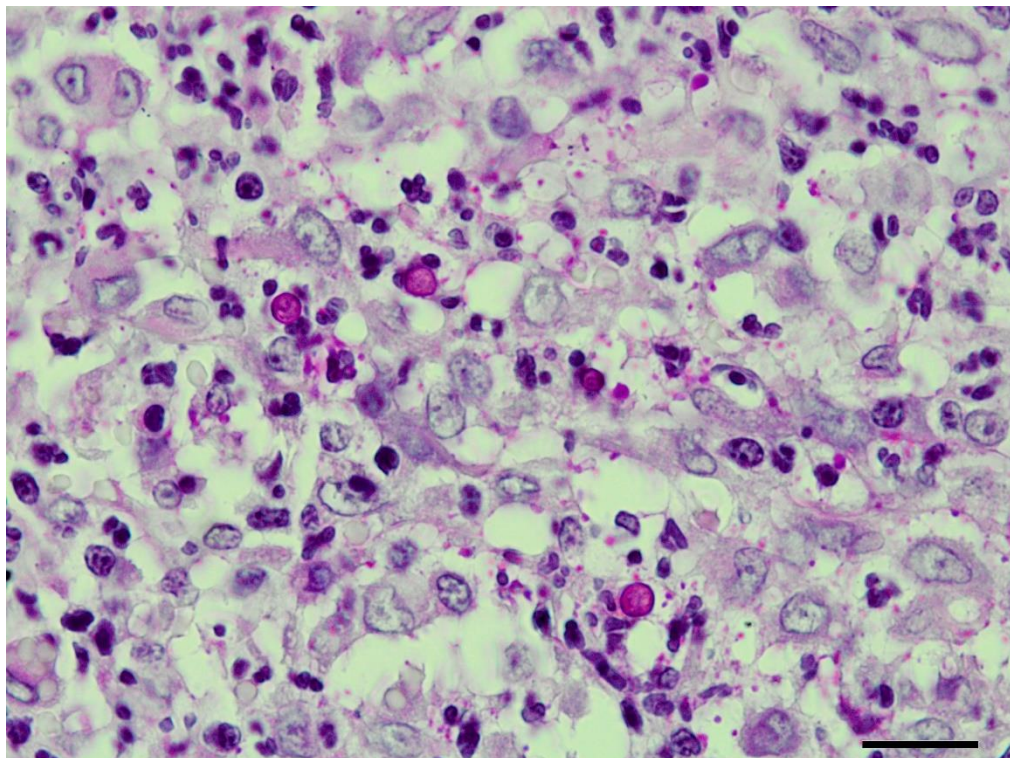


Fig.12. Esporotricose felina; Gato 7. Escassas leveduras coradas em rosa em meio ao infiltrado inflamatório (mesmo padrão de lesão das Fig.9 e 10). Ácido periódico de Schiff, obj. 100x.

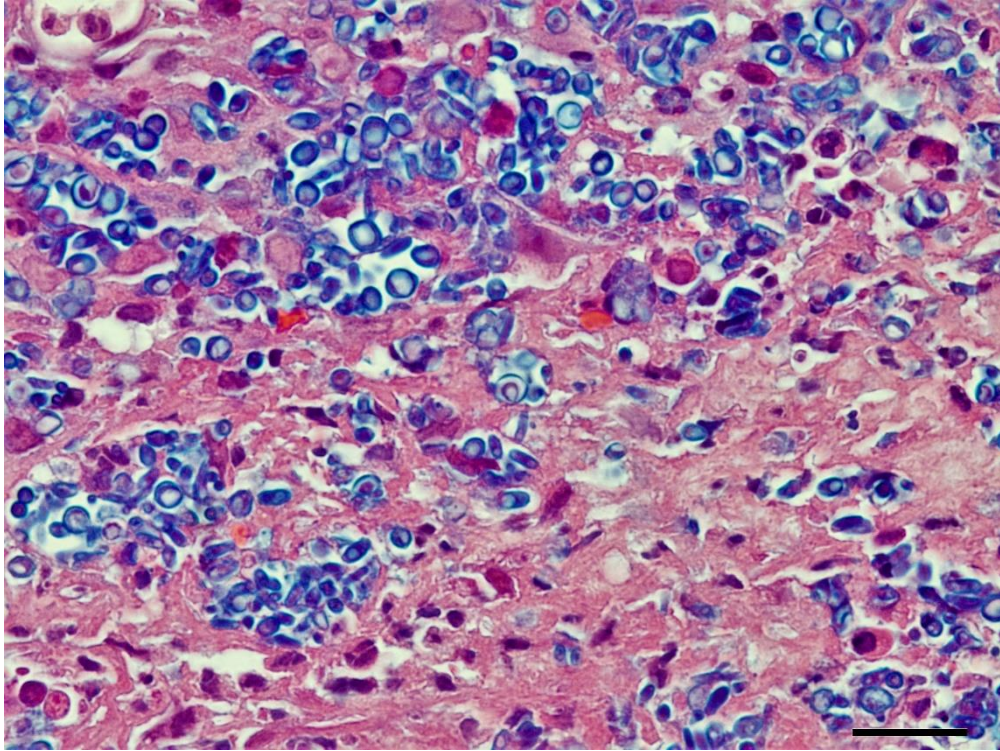


Fig.13. Esporotricose felina; Gato 4. Numerosas leveduras com a parede celular corada intensamente em azul (mesmo padrão de lesão das Fig.7 e 8). Azul alciano, obj. 100x.

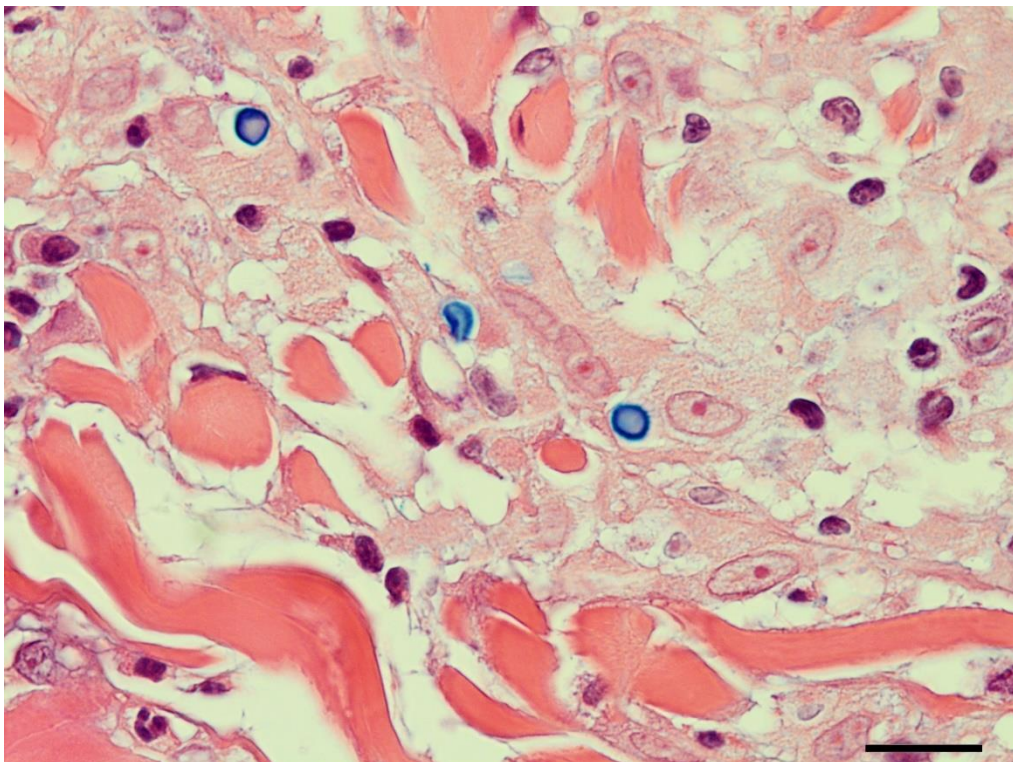


Fig.14. Esporotricose felina; Gato 3. Escassas leveduras intensamente coradas em azul em meio ao infiltrado de células epitelioides (mesmo padrão de lesão das Fig.9 e 10). Azul alciano, obj. 100x.

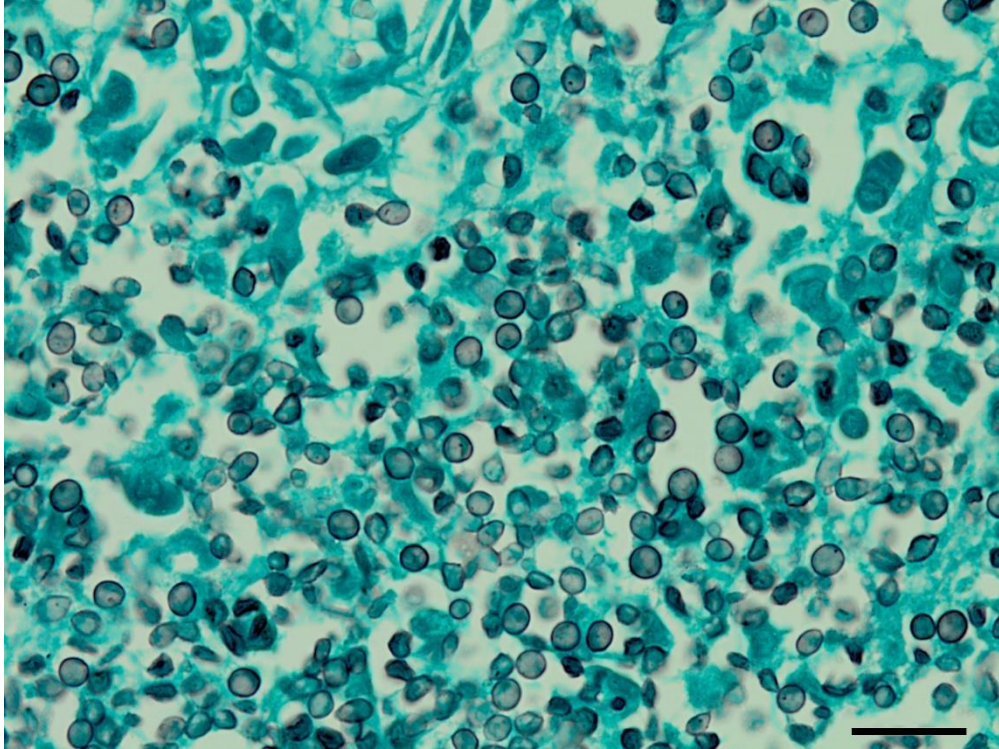


Fig.15. Esporotricose felina; Gato 6. Numerosas leveduras marrom-acinzentadas fortemente impregnadas pela prata (mesmo padrão de lesão das Fig.7 e 8). Impregnação pela prata de Grocott, obj. 100x.

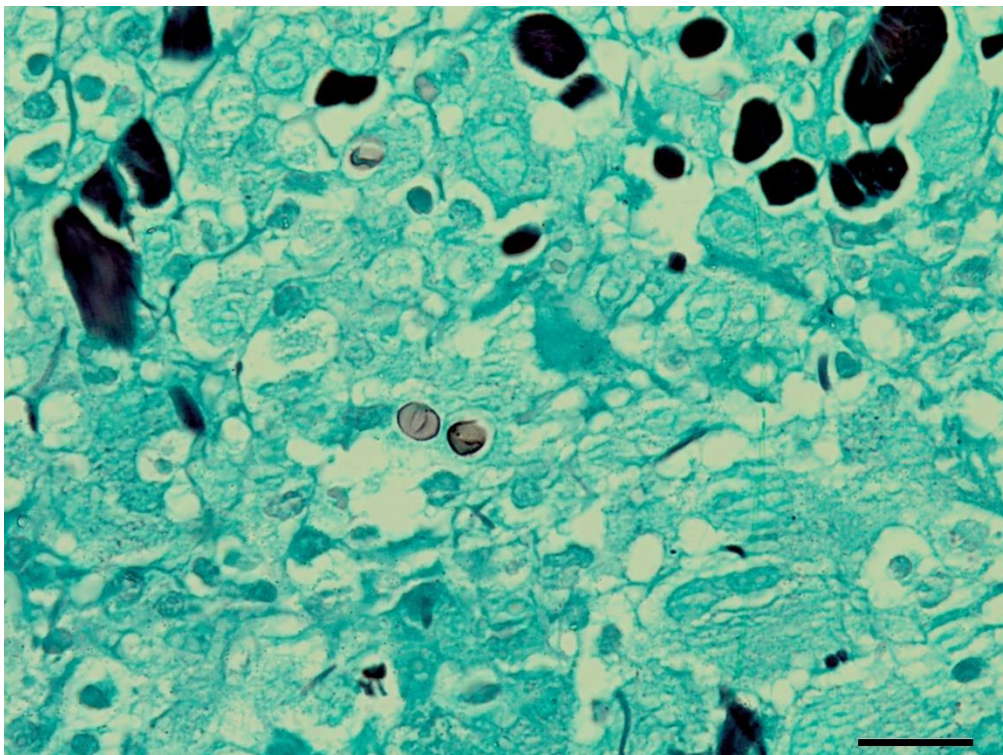


Fig.16. Esporotricose felina; Gato 3. Raras leveduras marrom-acinzentadas (mesmo padrão de lesão das Fig.9 e 10). Impregnação pela prata de Grocott, obj.100x.



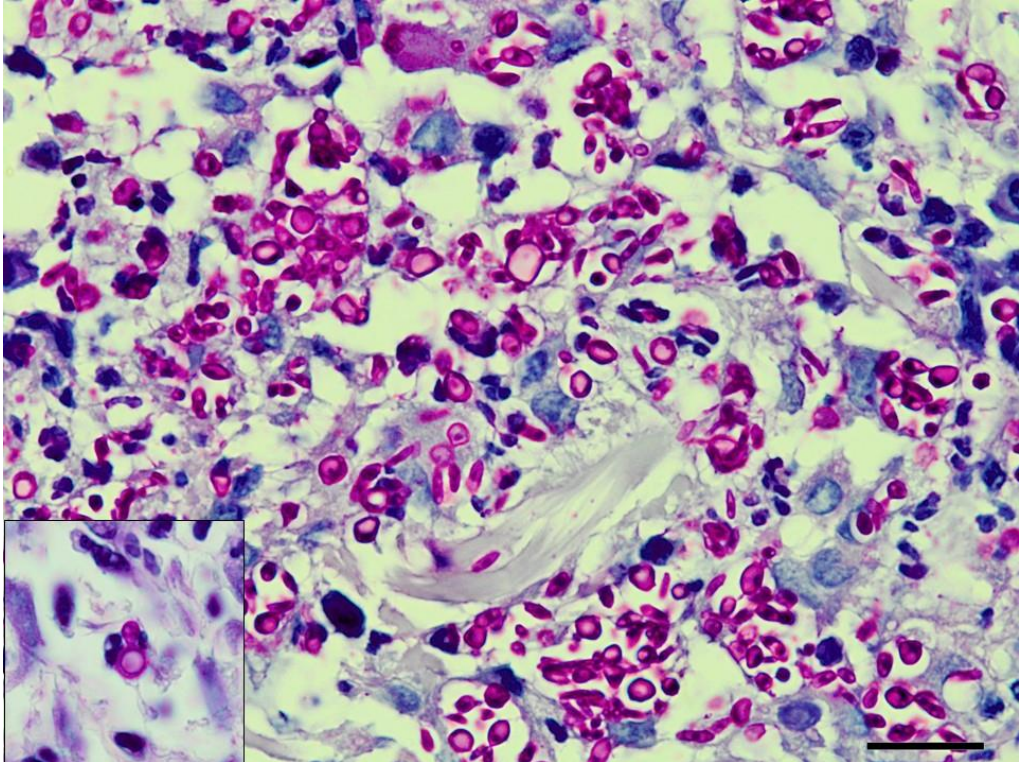


Fig.17. Esporotricose felina; Gato 4. Leveduras redondas, ovais e alongadas (em forma de charuto) coradas em rosa. Há variação no tamanho principalmente das leveduras redondas. No detalhe há um brotamento em base estreita. Ácido periódico de Schiff, obj. 100x.

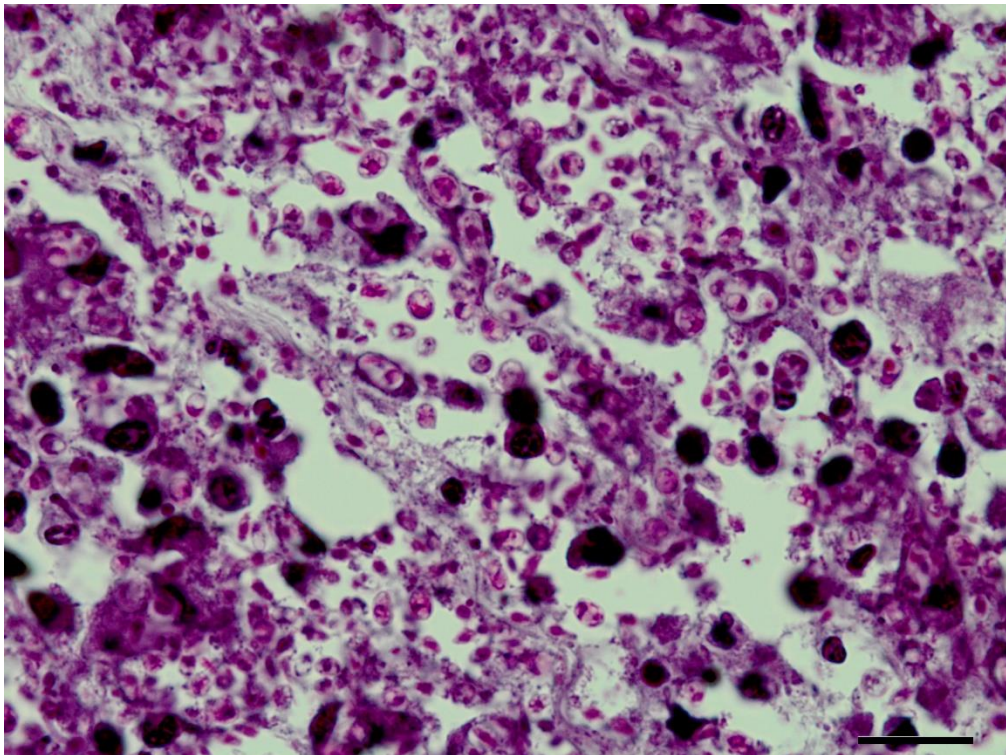


Fig.18. Esporotricose felina; Gato 6. Leveduras em meio aos debris celulares e ao infiltrado inflamatório. Giemsa, obj. 100x.

**Quadro 1. Dados epidemiológicos e alterações clínico-patológicas de 10 casos de esporotricose felina**

Gato (n <sup>o</sup> )	Raça	Sexo	Idade	Quantidade e localização das lesões cutâneas	Forma clínica
1	SRD	M	8 a	Lesão única (pata - coxim)	Cutânea localizada*
2	SRD	F	4 m	Múltiplas lesões (NI)	Cutânea disseminada*
3	Siamês	F	8 a	Múltiplas lesões (NI)	Cutânea disseminada*
4	NI	M	2 a	Múltiplas lesões (face)	Cutânea disseminada*
5	Persa	M	6 a	Múltiplas lesões (NI)	Cutânea disseminada*
6	SRD	M	3 a	Múltiplas (face, periocular, periauricular, orelhas e escápulas)	Cutânea disseminada
7	SRD	M	8 a	Múltiplas (focinho, orelha, membros anteriores e cauda)	Cutânea disseminada
8	SRD	M	10 a	Múltiplas (face, periocular, orelha, focinho, membros anteriores e posterior direito, abdômen ventral)	Cutânea disseminada
9	SRD	M	1 a	Múltiplas (orelha, periocular e membros posteriores)	Cutânea disseminada
10	SRD	M	6 a	Múltiplas (face, lábio, orelha, periauricular, focinho, região lombar, região lateral ao saco escrotal, membros anteriores e posterior direito)	Cutânea disseminada

SRD = sem raça definida; NI = não informado; M = macho; F = fêmea; a = anos; m = meses; \* = no momento do diagnóstico histopatológico.

**Quadro 2. Quantificação de organismos fúngicos através de técnicas histoquímicas em 10 casos de esporotricose felina**

Gato (n <sup>o</sup> )	HE	PAS	AA	GMS
1	++	++	++	++
2	+++	+++	+++	+++
3	+	+	+	+
4	+++	+++	+++	+++
5	+++	+++	+++	+++
6	+++	+++	+++	+++
7	+	+	+	+
8	+	+	+	+
9	+++	+++	+++	+++
10	+	+	+	+

HE = hematoxilina-eosina; PAS = ácido periódico de Schiff; AA = azul alciano; GMS = impregnação pela prata de grocott; + = leve; ++ = moderada; +++ = acentuada.

### **3. CONCLUSÃO**

Com base nos resultados apresentados, concluiu-se que a esporotricose felina em nossa região ocorre em dois padrões de apresentação histológica distintos, uma clássica em que há grande quantidade de microorganismos no interior de macrófagos espumosos e outro, semelhante aquele observado em cães e equino, em que há marcante escassez do agente. Nesses casos é fundamental o uso de técnicas histoquímicas (PAS, GMS e AA) para estabelecer o diagnóstico.

#### 4. REFERÊNCIAS

ANTUNES, T. A. et al. Esporotricose, In: MEIRELES, M. C. A.; NASCENTE, P. S. (Org.), **Micologia Veterinária**. Pelotas: Ed. Universitária UFPEL, 2009, p.109-121.

BARROS, M.B.L. et al. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.4, p.633-654, 2011.

CHOMEL, B. B. Emerging and re-emerging zoonoses of dogs and cats. **Animals**, v.4, p.434-445, 2014.

DÍAZ, I. A. C. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v.108, p.113-116, 1989.

EL-GHOLL, N. E. et al. Sporotrichosis. Florida Department of Agriculture & Consumer Services, Division of Plant Industry, **Plant Pathology**. n.286, p.4, 1986.

FREITAS, D. C. et al. Esporotricose em cães e gatos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo**, v. 7, Fase 2, 1960.

GALIZA, G. J. N. et al. Características histomorfológicas e histoquímicas determinantes no diagnóstico da criptococose em animais de companhia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.3, p.261-269, 2014.

GINN, P. E.; MANSELL, J. E. K. L.; RAKICH, P. M. Sporotrichosis, In: JUBB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. (Eds), **Pathology of Domestic Animals**, Philadelphia: Elsevier, Vol.1, 5ª Ed., 2007, p.703-704.

GROSS, T. L. et al. Esporotricose, In: Ibid. (Eds), **Doenças de pele do cão e do gato**, Roca, São Paulo, 2ª Ed., 2009, p.289-292.

GUARNER, J.; BRANDT, M. E. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21<sup>st</sup> century. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.2, p.247-280, 2011.

HOWARD, D. H. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **Journal of Bacteriology**, v.81, p.464-469, Ago., 1960.

JENSEN, H. E. et al. Immunohistochemical diagnosis of systemic bovine zygomycosis by Murine Monoclonal Antibodies. **Veterinary Pathology**, v.33, n.2, p.176-183, 1996.

KWON-CHUNG, K. J., HILL, W. B.; BENNETT, J. E. New, special stain for histopathological diagnosis of cryptococcosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.13, p.383–387, 1981.

LACAZ, C. S. Esporotricose e outras Micoses Gomosas, In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEIS-VACCARI, E. M.; TAKAHASHI DE MELO, N. (Ed), **Tratado de micologia médica Lacaz**. São Paulo: Savier, 9ª Ed., 2002, p.479-487.

LARSSON, C. E. et al. Esporotricosis felina: aspectos clínicos e zoonótico. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, n.5, p.351-358, 1989.

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

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

MAHAJAN, V. K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology Research and Practice**, v.2014, p.1-13, 2014.

MARQUES, M. E. A. et al. Comparison between histochemical and immunohistochemical methods for diagnosis of sporotrichosis. **Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.1089-1093, 1992.

MARQUES, S. A. et al. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.4, p.327-330, 1993.

MIRANDA, L. H. M. et al. Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. **The Veterinary Journal**, v.190, p.408-411, 2011.

MIRANDA, L. H. M., et al. Feline sporotrichosis: histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Disease**, v.36, p.425-432, 2013.

RODRIGUES, A. M. et al. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, p.1-8, 2012.

RODRIGUES, A. M. et al. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging Microbes and Infections**, v.3, p.1-10, 2014.

ROMERO-MARTINEZ, R. et al. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

ROSSER, E.J.; DUNSTAN R. W. Sporotrichosis, In: GREENE, C.E. (Ed), **Infectious Diseases of the dog and cat**. Philadelphia: Elsevier, 3ª Ed., 2006, p.608-612.

ROSSI, C. N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON C. E. Clinical and epidemiological characterization of sporotrichosis in dogs and cats (São Paulo, Brazil). **Ciências Agrárias**, v.34, n.6, p.3889-3896, 2013.

SANTOS, I. B. et al. Sporotrichosis – the main differential diagnosis with tegumentar leishmaniasis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.1-6, 2007.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.404-408, 2004.

SCHUBACH, T. M. P.; MENEZES R. C.; WANKE, B. Sporotrichosis, In: GREENE, C. E. (Ed), **Infectious Diseases of the dog and cat**. St Louis: Elsevier, 4ª Ed., 2012, p.645-650.

SOUZA, L. L. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.372-374, 2006.

STOPIGLIA, C. D. O. et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. **Medical Mycology**, v.52, p.56-64, 2014.

TÉLLEZ, M. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v.160, p.2352-2365, 2014.

VÁSQUEZ-DEL-MERCADO, E.; ARENAS, R.; PADILLA-DESGARENES, C.  
Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology** v.30, p.437-443, 2012.