

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Estudo das características fenotípicas, fatores de
patogenicidade e suscetibilidade de isolados de
Sporothrix schenckii frente a desinfetantes**

Isabel Martins Madrid

Pelotas, 2011

ISABEL MARTINS MADRID

Estudo das características fenotípicas, fatores de patogenicidade e suscetibilidade de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a desinfetantes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Sanidade Animal: Micologia).

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles
Co-Orientador (es): Márcia de Oliveira Nobre
Cristina Gevehr Fernandes

Pelotas, 2011

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

M183e	Madrid, Isabel Martins Estudo das características fenotípicas, fatores de pathogenicidade e suscetibilidade de isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> frente a desinfetantes / Isabel Martins Madrid. – Pelotas, 2011. – 111f. – Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Área de concentração: Sanidade animal. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária. Pelotas, 2011. - Orientador Mário Carlos Araújo Meireles. ; co-orientador Márcia de Oliveira Nobre, Cristina Gevehr Fernandes. 1.Veterinária. 2.<i>Sporothrix schenckii</i>. 3. Patogenicidade. 4.Morfologia. 5.Atividade antifúngica. 6.Testes de suscetibilidade. I.Meireles, Mário Carlos Araújo. II.Nobre, Márcia de Oliveira. III.Fernandes, Cristina Gevehr. IV.Título. CDD: 632.4
-------	---

Banca Examinadora:

- Dra. Marlete Brum Cleff - UFPel
- Dra. Patrícia da Silva Nascente - UFPel
- Dra. Melissa Orzechowski Xavier - FURG
- Dr. João Luiz Zani – UFPel (suplente)
- Dr. Mário Carlos Araújo Meireles - UFPel (orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida e por me dar saúde, força e dignidade para enfrentar os momentos ruins e seguir minha caminhada.

Aos meus pais e irmãos que sempre me apoiaram e me incentivaram para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao Tito pelo carinho, companheirismo, compreensão e amizade e, por fazer parte da minha vida.

As minhas amigas pelos momentos de distração e pelas conversas acolhedoras.

Aos meus orientadores pela confiança, incentivo e ensinamentos ao longo desta jornada.

Ao Laboratório de Micologia e em especial, às amigas que realmente participaram e me deram apoio durante os momentos difíceis, e que sabem que a sinceridade é uma virtude de poucos.

Aos professores, funcionários e técnicos da Faculdade de Veterinária pela dedicação e colaboração na execução e preparo dos materiais utilizados nesta pesquisa.

Aos clínicos de pequenos animais pela disponibilização dos casos clínicos e por confiarem no trabalho desenvolvido durante esses anos.

Enfim, um muito obrigado a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Resumo

MADRID, Isabel Martins. **Estudo das características fenotípicas, fatores de patogenicidade e suscetibilidade de isolados de *Sporothrix schenckii* frente a desinfetantes.** 2011. 111f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A esporotricose tem se destacado mundialmente nas diversas áreas da saúde como uma importante doença fúngica. Assim, este trabalho teve como objetivos: (i) estudar casos de esporotricose diagnosticados na região sul do Rio Grande do Sul num período de dez anos, (ii) estudar as características morfológicas e de patogenicidade de isolados de *Sporothrix schenckii*, (iii) determinar a suscetibilidade de *S. schenckii* a desinfetantes comerciais. Os casos de esporotricose foram analisados quanto a distribuição geográfica, forma clínica da doença, presença do fungo em diferentes sítios anatômicos e resposta tecidual. Os 42 isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos, isolados do ambiente e cepas de referência utilizados no estudo fenotípico foram avaliados quanto a macromorfologia em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol, ágar batata e ágar lactrimel incubados a 25°C e 35°C por 21 dias. A micromorfologia foi avaliada em ágar batata a 25°C enquanto que a termotolerância foi avaliada em ágar Sabouraud acrescido de extrato de levedura 1% incubado a 41°C por sete dias. O estudo ultraestrutural dos nove isolados clínicos e duas cepas de referência de *S. schenckii* foi realizado por microscopia eletrônica de transmissão. A suscetibilidade de 12 isolados de *S. schenckii* a desinfetantes foi realizada pelas técnicas de microdiluição em caldo, difusão em agar e teste de exposição direta. Os 103 casos de esporotricose em animais demonstraram que esta é uma micose endêmica na região sul do Rio Grande do Sul ocorrendo com mais frequência em felinos jovens e cães adultos. Os felinos desenvolveram principalmente a forma cutânea disseminada enquanto que em caninos, a forma cutânea fixa foi a mais frequente embora tenha ocorrido em 18,2% dos caninos, a forma respiratória com ausência de lesões cutâneas. A pesquisa do fungo *S. schenckii* em unhas, cavidade oral, mucosa conjuntival, sangue e testículos revelou alta positividade fúngica em amostras de testículos (46,6%) e cavidade oral (45,2%). O hemograma de animais com a forma cutânea fixa não apresentou alterações nos valores hematológicos enquanto que aqueles com a forma cutânea disseminada apresentaram alterações tanto no leucograma como no eritrograma, caracterizadas por leucocitose por neutrofilia e anemia normocítica e normocrômica. A análise morfológica de 42 isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* demonstrou diferenças macro e micromorfológicas nos diferentes meios de cultivo utilizados. Na avaliação da termotolerância obteve-se 26,2% dos isolados termotolerantes, sendo a maioria proveniente de casos de esporotricose felina. O estudo ultraestrutural revelou presença de grânulos de

melanina em todos os isolados de *S. schenckii* originados de esporotricose canina e correlação entre presença de melanina e espessura da parede celular. A avaliação *in vitro* de desinfetantes demonstrou maior ação antifúngica do digluconato de clorexidina nas técnicas de microdiluição em caldo e difusão em agar enquanto que o hipoclorido de sódio apresentou melhor eficácia na técnica de exposição direta. A presença de matéria orgânica interferiu na ação antifúngica de ambos os desinfetantes, entretanto, o hipoclorito de sódio apresentou melhores resultados com inativação total da carga fúngica na ausência de matéria orgânica e redução de 60% da carga fúngica na presença desta.

Palavras-chave: Esporotricose. Patogenicidade. Morfologia. Atividade antifúngica. Testes de suscetibilidade.

Abstract

MADRID, Isabel Martins. **Study of the phenotypic characteristics, pathogenicity factors and susceptibility of the *Sporothrix schenckii* isolates against disinfectants.** 2011. 111f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Sporotrichosis has been receiving attention in any world in the several areas of the health as an important fungal disease. So, this work aimed: (i) to study cases of sporotrichosis diagnosed in the south region of Rio Grande do Sul in a period of ten years, (ii) to study the morphological and pathogenicity characteristics of *S. schenckii* isolates, (iii) to determine the sensitivity of *S. schenckii* isolates to the commercial disinfectants. Sporotrichosis cases were analysed as for geographical distribution, its clinical forms of the disease, presence of the fungus in different anatomical sites and tecidual inflammatory response. The 42 *S. schenckii* isolates originating from clinical cases, environment isolates and reference strains used in the phenotypic study were evaluated as for macromorphology in Sabouraud agar added of chloramphenicol, potato agar and ágar lactrimel, incubated 25°C and 35°C for 21 days. The micromorphology was analyzed in potato agar to 25°C whereas the thermotolerance was evaluated in ágar Sabouraud added of 1% yeast extract, incubated 41°C for seven days. Ultraestructural study of nine clinical isolates and two reference strains of *S. schenckii* were carried by transmission electron microscopy. Susceptibility of 12 *S. schenckii* isolates to disinfectants was performed by the techniques of broth microdilution, agar diffusion and direct exposute test. The 103 cases of sporotrichosis in animals demonstrated that this is an endemic mycosis in the south region of Rio Grande do Sul being more frequent in young felines and adult dogs. The felines developed disseminated cutaneous form with more frequency. Therefore, in canines, the fixed cutaneous form was predominant though it has taken place in 18.2% of the dog to respiratory form with absence of cutaneous lesions. Research of the *S. schenckii* in nails, oral cavity, conjunctival mucosa, blood and testicles demonstrated high fungal positivity in samples of oral cavity (45.2%) and testicles (46.6%). The study of the hematological alterations related with the clinical form of the disease demonstrated that animals with the cutaneous fixed form of the mycosis do not present alterations in the blood count. However, animals with the cutaneous disseminated form develop important alterations characterized mainly for leucocytosis with neutrophilia and anaemia. Morphological analyzes of 42 clinical and environmental isolates of *S. schenckii* demonstrated macro and micromorphological differences in the different culture medium utilized. In the thermotolerance evaluation 26.2% isolates were capable of growth at 41°C, specially isolates of feline sporotrichosis. The ultraestructural study showed presence of granules of melanin in all *S. schenckii* isolates of canine sporotrichosis and correlation among melanin and

cell wall thickness. In vitro evaluation of disinfectants demonstrated chlorexidine digluconate antifungal activity in the microdilution broth and agar diffusion techniques and the sodium hypochlorite showed best performance in the direct exposure test. The presence of the organic matter interfered in the antifungal action of both disinfectants. Sodium hypochlorite showed better results with total elimination of the fungal load in the absence of organic matter and a reduction of 60 % of the fungal load in the presence of this.

Key-words: Sporotrichosis. Pathogenicity. Morphology. Antifungal activity. Susceptibility tests.

Lista de Figuras

ARTIGO 1

Figura 1	Distribution of the sporotrichosis cases in cats and dogs in the southf region from state of Rio Grande do Sul, Brazil.....	37
Figura 2	<i>S. schenckii</i> yeasts positively reactive for the presence of melanin by Fontana-Masson stain (400x).....	39

ARTIGO 3

Figura 1	Macromorfologia de colônias filamentosas de <i>S. schenckii</i> obtidas nos meios de cultivo Sb+Cl (a), PDA (b) e Lactrimel (c) aos 14 dias de incubação a 35°C.....	66
Figura 2	Numerosos conídios demáceos ao redor das hifas em isolado de <i>S. schenckii</i> proveniente de esporotricose felina (a) e presença de "margaridas" em isolado de esporotricose canina (b).....	67

ARTIGO 4

Figure 1	Transmission electron microcopy images of <i>S. schenckii</i> cells with (a) and without (b) melanin granules. Scale bar: 1µm.....	77
----------	--	----

ARTIGO 5

Figure 1	Fungal growth inhibition with chlorexidine digluconate (CD) and absence of inhibition with sodium hypochlorite (SH) and distilled water (DW).....	95
Figure 2	Colony-forming units reduce (mean) of <i>S. schenckii</i> against sodium hypochlorite (SH) and chlorexidine digluconate (CD) in the organic matter (OM) presence and absence.....	96

Lista de Tabelas

ARTIGO 1

Tabela 1	<i>Sporothrix schenckii</i> isolation from clinical samples of cats and dogs with sporotrichosis.....	38
----------	---	----

ARTIGO 2

Tabela 1	Felinos e caninos com esporotricose incluídos no estudo hematológico.....	49
Tabela 2	Alterações nos valores hematológicos de felinos com esporotricose cutânea.....	50

ARTIGO 3

Tabela 1	Média de crescimento dos isolados de <i>S. schenckii</i> de diferentes origens em SDA, PDA e lactrimel a 25°C e 35°C.....	65
----------	---	----

ARTIGO 4

Table 1	Analyses of the melanin layer and cell wall thickness of clinical isolates of the <i>Sporothrix schenckii</i>	78
Table 2	The differences in the cell wall thickness among isolates of <i>S. schenckii</i>	79

ARTIGO 5

Table 1	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of <i>Sporothrix schenckii</i> isolates against chlorexidine digluconate and sodium hypochlorite.....	94
---------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

BHI – infusão cérebro-corção

CD – cutânea disseminada

CD – chlorexidina digluconate

CE – células epitelióides

CF – cutânea fixa

CFU – colony-forming units

CG – células gigantes

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

DHN – dihidroxinaftaleno

DOPA - dihidroxifenilalanina

FaVet – Faculdade de Veterinária

LC – linfocutânea

LCA – ágar lactrimel

MFC – minimal fungicidal concentration

MIC – minimal inhibitory concentration

OM – organic matter

PDA – ágar batata

PMN – polimorfonucleares

PPT – proteínas plasmáticas totais

SDA – agar Sabouraud dextrose

SH – sodium hypochlorite

SRD – sem raça definida

TEM – transmisssion electron microscopy

UFPeI – Universidade Federal de Pelotas

Sumário

Agradecimentos	3
Resumo	4
Abstract.....	6
Lista de figuras.....	8
Lista de tabelas	9
Lista de abreviaturas e siglas	10
Sumário	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
Esporotricose	15
<i>Sporothrix schenckii</i>	18
Desinfetantes	20
3 ARTIGOS	
Artigo 1 Achados epidemiológicos e avaliação laboratorial da esporotricose: descrição de 103 casos em cães e gatos no sul do Brasil	22
Artigo 2 - Alterações hematológicas em caninos e felinos com esporotricose cutânea	40
Artigo 3 - Morfologia e termotolerância de diferentes isolados de <i>Sporothrix schenckii</i> do Sul do Brasil	51
Artigo 4 - Ultrastructural study of the mycelial phase of <i>Sporothrix schenckii</i> clinical isolates obtained of feline, canine and human sporotrichosis	68
Artigo 5 – Action of the sodium hypochlorite and chlorexidine digluconate in clinical isolates of <i>Sporothrix schenckii</i>	80
4 CONCLUSÃO	97
Referências	98
Anexo	108

1 INTRODUÇÃO

As doenças em pequenos animais, especialmente em cães e gatos que são animais de companhia vem sendo destaque na medicina humana e veterinária pelo fato de que o crescente convívio destes com humanos tem facilitado a transmissão de algumas doenças zoonóticas. Nas últimas três décadas, aproximadamente 75% das novas doenças infecciosas humanas emergentes foram zoonoses (BIONDO). Os cães e gatos conquistaram seu espaço na população brasileira na última década, sendo o Brasil considerado o segundo país do mundo com maior população de “pets”, perdendo apenas para os Estados Unidos. Estima-se que o Brasil possua 27,9 milhões de cães e 12 milhões de gatos sendo a relação de um cão para cada seis habitantes e um gato para cada 16 habitantes (EFEP). Neste contexto, a esporotricose que é uma micose de ocorrência mundial e de caráter zoonótico que acomete o homem e várias espécies animais tem recebido especial atenção (BARROS et al., 2010; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA 2006; NOBRE et al., 2002). Essa enfermidade é considerada a micose subcutânea e zoonótica de maior importância na clínica de pequenos animais que tem como agente etiológico o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (FERREIRO et al., 2007).

O *S. schenckii* é geofílico e saprófita de solos ricos em matéria orgânica, sendo encontrado em cascas de árvores, plantas, espinhos, musgos, palha, madeira e vegetais em decomposição (LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006). Estudos realizados em vários países demonstraram diferenças fenotípicas, moleculares e de virulência entre isolados de *S. schenckii* (ARENAS et al., 2007; FERNANDES et al., 2009; KONG et al., 2006; MARIMON et al., 2007; MESA-ARANGO et al., 2002). Dentre os fatores de patogenicidade do fungo, a melanina tem sido alvo de várias pesquisas *in vitro* e *in vivo* (ALMEIDA-PAES et al., 2009, BRITO et al., 2007, MADRID et al., 2010b, MORRIS-JONES et al., 2003, NOBRE et al., 2004, ROMERO-MARTINEZ et al., 2000).

A esporotricose é adquirida pela inoculação traumática do fungo na derme através de felpas, espinhos e materiais do ambiente contaminados ou pela arranhadura e mordedura de animais, resultando comumente no desenvolvimento de formas cutâneas (FARIAS et al., 1997). Os felinos domésticos representam a espécie animal com maior número de casos de esporotricose, sendo considerados os principais transmissores inter e intra-espécie da doença (BARROS et al., 2008; FLEURY et al., 2001; LARSSON et al., 1989, MEINERZ et al., 2007; NOBRE et al., 2001). Os animais acometidos pela micose desenvolvem formas clínicas graves com comprometimento do estado geral que resulta muitas vezes, em óbito (MADRID et al., 2010; SCHUBACH et al., 2003). Entretanto, nos últimos cinco anos, o número de casos de esporotricose em cães tem aumentado significativamente, especialmente no Brasil (FILGUEIRA, 2009; MADRID et al., 2007; SCHUBACH et al., 2006). Estes animais desenvolvem lesões clínicas variadas semelhantes as que ocorrem em outras enfermidades infecciosas, imunológicas e neoplásicas (FARIAS et al., 1997, LARSSON et al., 2000). Tendo em vista a importância da esporotricose na saúde pública e na medicina veterinária assim como, a necessidade de compreender a epidemiologia, achados laboratoriais e formas de controle e prevenção da esporotricose, o trabalho teve como objetivo (i) estudar casos de esporotricose diagnosticados na região sul do Rio Grande do Sul num período de dez anos, (ii) estudar as características morfológicas e de patogenicidade de isolados clínicos de *S. schenckii* e (iv) determinar a suscetibilidade de isolados clínicos de *S. schenckii* a desinfetantes comerciais. Os objetivos específicos foram:

- Estudar as características epidemiológicas, hematológicas, micológicas e histopatológicas da esporotricose em cães e gatos em dez anos de observação no sul do Brasil (2000-2010);
- Avaliar as características fenotípicas e a termotolerância de isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose humana, felina e canina, e de isolados do ambiente;
- Pesquisar a presença de grânulos de melanina e as diferenças na parede celular de isolados clínicos de *S. schenckii*;
- Testar a suscetibilidade de isolados de *S. schenckii* ao hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina;

- Determinar a concentração inibitória mínima de desinfetantes frente a isolados clínicos de *S. schenckii*;
- Avaliar a ação antifúngica de desinfetantes através de diferentes técnicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea causada pelo fungo *Sporothrix schenckii* que acomete o homem e diversas espécies animais como cães, gatos, cavalos, golfinhos, macacos, bovinos, camelos, ratos, aves, mulas entre outros (KWON-CHUNG; BENNETT, 1992; LACAZ et al., 2002; NOBRE et al., 2002; SCHUBACH et al., 2006). No Brasil é conhecida desde 1907, quando foi relatada a infecção no homem e em ratos no estado de São Paulo, sendo que a transmissão zoonótica por felinos foi considerada a partir da década de 50 (ALMEIDA et al., 1955; FREITAS et al., 1956; SOUZA, 1957).

Nos animais domésticos a esporotricose era considerada rara até o final da década de 90, no entanto, nos últimos dez anos vários casos têm sido descritos, principalmente em felinos domésticos (BARROS et al., 2010; COLODEL et al., 2009; FERNANDES et al., 2004; FLEURY et al., 2001; KOVARIK et al., 2008; SCHUBACH et al., 2004). Esta micose apresenta distribuição mundial sendo descrita em vários países como Austrália, China, Estados Unidos, Itália, Espanha, Marrocos, Índia, Turquia, Japão, Brasil, Uruguai, Colômbia, México, Peru e Venezuela (BARROS et al., 2010; BENCHEKROUN et al., 2008; CARFACHIA et al., 2007; CONTI-DIAZ 1989; CROTHERS et al., 2009; FEENEY et al., 2007; GURCAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2005; NAKAMURA et al., 1996; PAPAS et al., 2000; RUBIO et al., 2010; ZHANG; LIN, 2008). No Brasil, o Rio de Janeiro representa o estado com maior número de casos de esporotricose registrados em animais e humanos, sendo esta micose considerada uma epidemia (BARROS et al., 2010; SCHUBACH et al., 2004). Em outros estados como Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina, a esporotricose tem sido descrita ocasionalmente em cães e gatos (COLODEL et al., 2009; FERNANDES et al., 2004; FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998; FILGUEIRA 2009; FLEURY et al., 2001).

No Rio Grande do Sul, a primeira descrição em cães ocorreu no ano de 1964 e em gatos em 1996 (LONDERO; CASTRO; FISCHMAN, 1964; NOBRE et al., 2002). Em humanos, muitos casos relacionados à atividade ocupacional foram descritos (LONDERO; RAMOS, 1989; LOPES et al., 1999) assim como relatos de casos e estudos relacionados a terapêutica e transmissão zoonótica da enfermidade (JESUS; MARQUES, 2006; MEINERZ et al., 2007; MADRID et al., 2007; MADRID et al., 2010a; NOBRE et al., 2001; XAVIER et al., 2004).

Classicamente, a infecção ocorre pelo implante traumático do fungo na derme por felpas de madeira, espinhos e plantas contaminadas com *S. schenckii* caracterizando uma micose ocupacional também conhecida como doença dos floristas. Dessa forma, as pessoas com atividade relacionada a agricultura, jardinagem, horticultura e exploração de madeira eram consideradas as principais classes de risco. Atualmente, a transmissão zoonótica tem recebido especial atenção devido ao aumento dos casos de esporotricose transmitida por animais, especialmente felinos. Consequentemente, veterinários, enfermeiros, tratadores e proprietários de felinos passaram a ser considerados as principais classes de risco (BARROS et al., 2008; 2010; CARAVALHO et al., 1991; DONADEL et al., 1993; FARIAS et al., 1997; KOVARIK et al., 2008; LARSSON et al., 1989; MADRID et al., 2010a; MEINERZ et al., 2007; NOBRE et al., 2001; SCHUBACH et al., 2004; XAVIER et al., 2004). Assim, a mordedura ou arranhadura de felinos domésticos (*Felis catus*) tem sido relatada como a principal forma de transmissão. Estes animais podem carrear o fungo nas unhas e cavidade oral, além de apresentarem grande número de organismos fúngicos nas lesões (SCHUBACH et al., 2002; SOUZA et al., 2006). A transmissão por animais marinhos, insetos e animais silvestres é raramente relatada (MACKINNOM 1969; APUD MORRIS-JONES, 2002), entretanto, no Rio Grande do Sul ressalta-se dez casos de esporotricose humana transmitida por tatu descrita recentemente por Alves et al (2009).

A esporotricose em felinos ocorre sob formas clínicas graves que levam ao comprometimento do estado geral resultando, muitas vezes, no óbito do animal. Inicialmente, ocorre o desenvolvimento da forma cutânea fixa caracterizada por lesões nodulares que fistulam e liberam exsudato sero-sanguinolento resultando em úlceras e crostas (BARONI et al., 1998; LARSSON, 2000). Frequentemente, a doença progride para a forma cutânea disseminada através da auto-inoculação, disseminação hematógena ou linfática do fungo *S. schenckii*, podendo ocorrer

comprometimento sistêmico (FARIAS et al., 1997, IWASAKI; KAGIWARA,1988). As lesões localizam-se preferencialmente nas regiões cefálica, membros e cauda, podendo, com frequência, assemelhar-se àquelas decorrentes de criptococose, carcinoma epidermóide e piodermites decorrentes de brigas (SCHUBACH; SCHUBACH, 2000).

Nos cães, a esporotricose apresenta-se na forma cutânea fixa ou linfocutânea (FIGUEIREDO; FERREIRA, 1998; MADRID et al., 2007; SCHUBACH et al., 2006;) com sintomatologia variada sendo muitas vezes semelhantes a outras enfermidades infecciosas e neoplásicas (LARSSON et al., 1989; SANTOS et al., 2007). As lesões são encontradas na cabeça, principalmente no plano nasal sendo caracterizadas por úlceras cutâneas de evolução crônica que podem apresentar regressão espontânea (FARIAS et al., 2007; MADRID et al., 2007; SCHUBACH; SCHUBACH, 2000).

A esporotricose em humanos ocorre principalmente na forma cutânea fixa podendo evoluir para linfangite ascendente, caracterizada por nódulos ao longo da cadeia linfática que resulta no denominado “rosário esporotricótico” (DUNSTAN et al., 1986). As formas disseminadas e extracutâneas como pulmonar, óssea, articular e ocular são raras, sendo descritas principalmente em humanos, especialmente em pacientes imunodeprimidos pelo vírus da imunodeficiência humana, terapias prolongadas com antibióticos, corticóides e quimioterápicos, entre outros (APPENZELLER et al., 2005; CURI et al., 2003; HARDMAN et al., 2005; NETO et al., 1999; PADHYE et al., 1992; RAMOS-SILVA et al., 2007).

Humanos e caninos normalmente, apresentam formas clínicas restritas ao tecido subcutâneo enquanto que felinos desenvolvem formas disseminadas e sistêmicas da doença, o que ocasiona comumente a morte dos animais (FARIA et al., 1997; LARSSON, 2000). Assim, é imprescindível o diagnóstico de certeza precoce desta micose especialmente na espécie felina. Dados epidemiológicos e sinais clínicos devem ser atentamente analisados a fim de obter o diagnóstico presuntivo e conseqüentemente, encaminhar o animal para exames complementares que confirmem o diagnóstico da doença (MADRID et al., 2010a).

O exame micológico constitui o diagnóstico de certeza da esporotricose através do isolamento do *S. schenckii* em meio de cultivo e demonstração do seu dimorfismo. A histopatologia é considerada um exame auxiliar no diagnóstico, uma vez que em muitos casos de esporotricose canina e humana, as estruturas fúngicas

não são visualizadas, mesmo em casos de lesões ativas e com cultura positiva (FARIA et al., 1997; QUINTELLA et al., 2011; SCHUBACH et al., 2006). Entretanto, vários autores descrevem que a presença do fenômeno de Splendori-Hoepli é indicativa de esporotricose em humanos (CIVILA et al., 2004; FARIAS et al., 1997; GEZUELE; ROSA 2005; LACAZ et al., 2002; QUINTELLA et al., 2011). Em felinos, as lesões cutâneas de esporotricose são diferenciadas apresentando, normalmente, grande número de células leveduriformes sugestivas de *S. schenckii* (SCHUBACH et al., 2003).

2.2 *Sporothrix schenckii*

O *S. schenckii* é um fungo dimórfico que apresenta uma fase micelial no meio ambiente e *in vitro* em temperatura ao redor de 25°C, passando a leveduriforme quando em parasitismo e *in vitro* a 37°C (LACAZ et al., 2002). Este fungo geofílico é saprófita do solo rico em matéria orgânica, sendo encontrado em cascas de árvores, musgos, plantas, palha, madeira e material em decomposição, podendo permanecer por períodos prolongados nestes locais. O crescimento *in vitro* a 25°C resulta em colônias de coloração creme a marrom escuras, superfície plana a rugosa e aspecto aveludado a membranoso. A morfologia microscópica é caracterizada por hifas finas, hialinas, septadas e ramificadas com conídios hialinos piriformes no ápice dos conidióforos e ao redor das hifas. A 37°C as colônias são lisas, cremosas e de coloração creme caracterizadas microscopicamente por células ovais a alongadas (LACAZ et al., 2002; LOPES-BEZERRA; SCHUBACH; COSTA, 2006).

Diversos fatores de patogenicidade produzidos pelo *S. schenckii* tem sido estudados como a termotolerância, presença de melanina, enzimas extracelulares e constituintes da parede celular (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996). Dentre estes, a melanina desempenha importante papel na sobrevivência do fungo contribuindo para o crescimento e desenvolvimento das espécies, auxiliando na sobrevivência e competição dos fungos no meio ambiente (BEEL; WHEELER, 1986; JACOBSON, 2000). As melaninas são pigmentos marrom-escuros ou pretos produzidos por animais, plantas e microorganismos, insolúveis em água, ácidos e solventes orgânicos (BUTLER; DAY, 1998). No ambiente protege os microorganismos contra a radiação ultravioleta, dessecação e temperaturas extremas (BEEL; WHEELER, 1986; BUTLER; DAY, 1998; JACOBSON 2000; NOSANCHUK; CASADEVAL 2003).

Durante a infecção, os grânulos de melanina interferem na resposta imune, na ativação do complemento e na ação de drogas antifúngicas (JACOBSON, 2000; NOSANCHUK; CASADEVALL, 2003; ROMERO-MARTINEZ et al., 2000;). Dessa forma, várias pesquisas têm demonstrado que o fungo *S. schenckii* produz melanina dihidroxinaftaleno (DHN) nas fases filamentosa e leveduriforme, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ALMEIDA-PAES et al., 2009; BRITO et al., 2007; MADRID et al., 2010; MORRIS-JONES et al., 2002; NOBRE et al., 2004). Estudos em esporotricose experimental com isolados selvagens e mutantes albinos de *S. schenckii* demonstraram diferenças na evolução da doença especialmente, nas semanas iniciais do experimento. Ao final, verificou-se maior frequência de lesões em outras áreas corpóreas em animais inoculados com o isolado selvagem quando comparado com isolado mutante albino, embora ambos os grupos tenham apresentado resolução das lesões no ponto de inoculação (NOBRE et al., 2008; MADRID et al., 2010b).

Outro fator de patogenicidade do *S. schenckii* é a termotolerância que está relacionada ao desenvolvimento de formas clínicas extracutâneas e sistêmicas. Isolados de lesões cutâneas normalmente não são capazes de crescer em temperatura de 37°C, entretanto, alguns isolados conseguem se multiplicar nesta temperatura, podendo desenvolver a doença na forma sistêmica ou extracutânea (ALBORNOZ; MENDONZA; TORRES, 1986; TACHIBANA et al., 2001). Os isolados de esporotricose linfocutânea e extracutânea podem causar com maior frequência a forma sistêmica, demonstrando tolerância a temperatura de 37°C (KNOW-CHUNG, 1979).

Aspectos moleculares e virulência de isolados de *S. schenckii* têm sido estudados em diferentes países (DIXON et al., 1991; FERNANDES et al., 2009; HOLECHECK et al., 2004; KONG et al., 2006; MESA-ARANGO et al., 2002). Estes estudos demonstraram grande variabilidade genética entre isolados de uma mesma região geográfica assim como, entre regiões. Assim, recentemente, a espécie *S. schenckii* foi dividida em três novas espécies de acordo com características morfofisiológicas e geográficas, sendo denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (MARIMON et al., 2007).

2.3 Desinfetantes

A busca por produtos desinfetantes/antissépticos que possam ser utilizados com segurança para a limpeza e desinfecção de ambientes e equipamentos assim como, sua concentração de uso com efeito antimicrobiano tem sido estudada principalmente frente a bactérias (ESTRELA et al., 2003; JAENISCH; KUCHIISHI; COLDEBELLA, 2010; PEDRINI; MARGATHO, 2003). Protocolos para a avaliação antibacteriana de desinfetantes foram estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Entretanto, não existem no Brasil, protocolos da ANVISA para avaliação de desinfetantes frente a fungos. Assim, várias pesquisas têm sido realizadas utilizando diferentes técnicas como microdiluição em caldo, difusão em ágar e teste de exposição direta demonstrando resultados contraditórios frente a isolados dos gêneros *Candida* e *Aspergillus* (ESTRELA et al., 2003; MATTEI, 2010; THÉRAUD et al., 2004; WALTIMO et al., 1999; XAVIER et al., 2007).

O *S. schenckii* por ser um fungo geofílico sobrevive no ambiente e em diversos locais na presença de matéria orgânica, os quais são considerados uma das principais fontes de infecção. Casos de esporotricose em animais sem acesso a rua e a outros animais tem sido diagnosticados, alertando para a possibilidade de infecção a partir de fômites, gaiolas e mesas de atendimento que estejam contaminados com o fungo (MATTEI, 2010). Dessa forma, a pesquisa de produtos com amplo espectro de ação, inodoro, de baixo custo e toxicidade e com reduzida interferência de matéria orgânica é fundamental para a redução da carga infectante no ambiente. Dentre os principais agentes antissépticos/desinfetantes utilizados na desinfecção de superfícies em ambiente hospitalar e domiciliar destacam-se o hipoclorito de sódio e a clorexidina (PEDRINI; MARGATHO, 2003; QUINN et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

O hipoclorito de sódio é um composto halogenado que atua em enzimas essenciais do metabolismo microbiano resultando em morte celular (MCDONNELL; RUSSEL, 1997). Assim, na presença de água resulta na formação de ácido hipocloroso que contém cloro ativo e interrompe as funções metabólicas da célula microbiana (MCDONNELL; RUSSEL, 1997; SIQUEIRA JUNIOR et al., 1998). O hipoclorito de sódio é instável e apresenta efeito corrosivo sendo sua ação dependente de pH, luz, concentração de cloro e presença de matéria orgânica.

Apresenta como principais vantagens o baixo custo, baixa toxicidade e fácil utilização (QUINN et al., 2005). A ação antimicrobiana do hipoclorito de sódio tem sido avaliada frente à *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* encontrados em instalações avícolas, *Salmonella typhimurium* em granjas de suínos, bactérias causadoras de mastite em bovinos, bactérias e leveduras em ambientes e equipamentos, e na terapia endodôntica (ESTRELA et al., 2003; JAENISCH; KUCHIISHI; COLDEBELLA, 2010; KICH et al., 2004; MATTEI, 2010; MEDEIROS et al., 2009; MENEZES et al., 2008; PAP et al., 2006; PEDRINI; MARGATHO, 2003; SANTOS et al., 2007; SILVA et al., 2007; WALTIMO et al., 1999; XAVIER et al., 2007).

A clorexidina é uma biguanida que atua na membrana celular microbiana resultando no seu rompimento, extravasamento do conteúdo citoplasmático e morte celular. É considerada um dos agentes mais utilizados em produtos antissépticos, com amplo espectro de ação, embora apresente redução da atividade antimicrobiana na presença de matéria orgânica. A ação da clorexidina frente a bactérias é rápida, apresentando efeito antimicrobiano em 20 segundos de contato (MCDONNELL; RUSSEL, 1997). A ação da clorexidina frente a bactérias e fungos tem sido estudada na medicina humana, odontologia e veterinária, apresentando ação antimicrobiana em concentrações que variam entre 1,8 e 6,6% frente a diferentes microrganismos (ESTRELA et al., 2003; MATTEI, 2010; MEDEIROS et al., 2009; MENEZES et al., 2008; PEDRINI; MARGATHO, 2003; SANTOS et al., 2007; WALTIMO et al., 1999; XAVIER et al., 2007).

Existem poucos estudos sobre ação de produto químicos frente ao *Sporothrix schenckii* sendo que um estudo sobre resistência de fungos patogênicos frente a solventes demonstrou alta sensibilidade do *S. schenckii* ao metanol com concentração inibitória mínima (MIC) de 126 mg/mL para o metanol, 352 mg/mL ao DMSO, 442 mg/mL à acetona e 259 mg/mL ao etanol (ELLOF et al., 2007).

ARTIGO 1

Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil

*Artigo enviado para a revista **Mycopathologia***

(MYCO1693)

Epidemiological findings and laboratory evaluation of sporotrichosis: a description of 103 cases in cats and dogs in southern Brazil

Isabel Martins Madrid^{1*}, Antonella Souza Mattei¹, Márcia de Oliveira Nobre², Cristina Fernandes³, Mário Carlos Araújo Meireles¹

¹ Laboratory of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Brazil

² Department of Veterinary Clinics, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Brazil

³ Department of Pathology, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Brazil

*Corresponding author. Department of Veterinary Preventive, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Brazil. Rua Gonçalves chaves 3435, 96015-560, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. Tel: +55 53 9911.2744; Fax: +55 53 3275 7644; E-mail: imadrid_rs@yahoo.com.br

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis which affects mainly small animals in Brazil, and is considered an important disease in public health. This paper describes the epidemiological and laboratory characteristics of 103 clinical cases of sporotrichosis that were diagnosed over a 10 year period in southern Brazil. The 92 cats and 11 dogs from eight municipalities in Rio Grande do Sul State developed mostly the disseminated cutaneous and fixed cutaneous forms of the disease. Respiratory signs such as sneezing, serous nasal discharge and dyspnea were found in about 57% of the animals. The detection of *S. schenckii* in different clinical samples revealed the highest isolation in testicles (46.6%), oral cavity (45.2%) and conjunctival mucosa (38.1%). A differentiated histological pattern was found between the fixed cutaneous (FC) and disseminated (DC) manifestations of the disease; well-organized granulomas of nodular distribution and various fungal structures prevailed in the DC form in cats. Melanin detection in *S. schenckii* cells by the Fontana-Mason technique was positive in 45.4% of the samples. The study revealed that Rio Grande do Sul is an endemic sporotrichosis area, and demonstrated the possibility of involvement of other pathways in the infection and spread of the disease. In addition, it emphasized the importance of laboratory tests for mycosis confirmation, especially in dogs which develop clinical manifestations without the presence of cutaneous lesions.

KEYWORDS: Cats; Dogs; Mycosis; Epidemiology; Pathology.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by the geophilic and dimorphic *Sporothrix schenckii* fungus, which infects both humans and animals. This mycosis has been described in different animal species including dogs, cats, horses, donkeys, mules, cattle, goats, camels, swine, domestic fowl, rats, mice, hamsters, armadillos, chimpanzees and dolphins. The fungus is found associated to organic matter such as sphagnum moss, decaying vegetation, soil and wood [1, 2]. The infection occurs through a traumatic injury in the skin associated to the environment or animals, especially cats contaminated with the fungus [2-4]. Male cats play a significant part in the epidemiology of this disease because their lesions are rich in yeasts. Furthermore, symptomatic or asymptomatic cats can carry the fungus in their nails and oral cavity, transmitting it to humans or other animals by bites and scratches [5-8].

This mycosis presents a wide variety of clinical manifestations such as fixed cutaneous, lymphocutaneous, disseminated cutaneous, systemic and extracutaneous forms [2]. Cats develop more severe clinical forms with a general compromising of the animal's health that frequently results in death [4, 9]. Dogs presented the fixed cutaneous or lymphocutaneous forms, very often with diversified clinical signs, similarly to other infectious or neoplastic diseases [10-13].

Sporotrichosis has been described and considered one of the most important subcutaneous mycoses in public health in different countries [2, 3]. Studies in animal sporotrichosis in southern Brazil are scarce and related to sporadic reported cases [5, 8, 14, 15]. The present study describes the epidemiological, mycological and histopathological characteristics of sporotrichosis in small animals over a ten year observation period in the south of Brazil (2000-2010).

MATERIAL AND METHODS

A study of 103 sporotrichosis clinical cases in animals diagnosed by the Laboratory of Infectious Diseases (Mycology Sector) of the School of Veterinary of the Federal University of Pelotas, Brazil (MS, FaVet - UFPel) was performed. Factors such as animal species, sex, age, clinical form of disease, extra-cutaneous signs, respiratory alterations, time of appearance of the lesions and origin of the clinical case were analyzed.

After the clinical examination, the animals were submitted to the collection of biological samples based on clinical conditions and type of lesion. Nodules, ulcers, exudate and crusts were collected by swabs, Fine-Needle Aspiration Biopsy (FNAB) and cutaneous biopsies by punch. Anaesthesia with xilazine and ketamine

was used for all animals when biopsy from the border of active lesions was necessary. Oral cavity (mucosa and upper canine tooth) and conjunctival mucosa samples were collected by a swab, and the nails by imprint in Petri dishes containing Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and cicloheximida (Mycosel®, BBL), as described by Souza et al [7]. One milliliter of blood was collected by aseptic venipuncture for mycological culture.

All samples submitted to mycological evaluation were cultivated on Mycosel® agar, incubated at 25°C and 37°C for two weeks with daily observations. Macroscopic and microscopic morphological aspects of the colonies and the fungal dimorphism were analyzed after the incubation period.

Tissue fragments were fixed in 10% formalin prior to being embedded in paraffin for sectioning. Hematoxylin and eosin staining for qualitative and quantitative studies were performed by direct light microscopic examination on the lesions. Scores 0 (absence) to 3 (intense) were attributed to inflammatory cell count. Morphological description of the lesions was performed according to Miranda et al [16]. Grocott, Periodic Acid-Schiff (PAS) and Fontana-Masson staining were performed on these sections to evaluate the presence of intra or extralesional fungus structures and analyze melanin-like pigment.

RESULTS

Epidemiological and clinical evaluation

One hundred and three sporotrichosis cases (92 cats and 11 dogs) diagnosed by the Laboratory of Infectious Diseases (MS, FaVet – UFPEL) between 2000 – 2010 were included in the study. The animals came from seven different municipalities in the south of Rio Grande do Sul, except for a cat from the northeast of the State. Of these, 49.5% of the cases originated in Rio Grande (51/103), 35% in Pelotas (36/103), and the remaining 15.5% (16/103) from Capão do Leão (5/103), Pedro Osório (4/104), Morro Redondo (3/103), Canguçu (2/103), São Lourenço (1/103) and Bento Gonçalves municipalities (Figure 1). The disease was primarily detected in Rio Grande and Pelotas. In Rio Grande, it occurred in the urban area, as well as on Cassino Beach, and in Pelotas, it included both the urban and rural areas. After a sporotrichosis outbreak in 30 cats in the year 2000, few cases of the disease had been diagnosed until 2004; then a slight increase was observed until 2007, and the number of cases had a considerable increase between 2008 and 2010.

All the animals that developed the disease had free access outside their homes and had contact with other animals. The cats in the study showed a 45 month mean age, varying from two months to 13 years of age, and

the dogs showed a 74 month mean age, varying between three and 10 years of age. As to sex, out of the 92 cats in the study, 64 were male (69.5%) and 28 female (30.4%), while out of the 11 dogs included, six were male (54.5%) and five female (46.5%). Of the cats, 68 had no specific breed and six were Siamese; of the dogs, five were mongrel and the others were from the Dalmatian, Pinscher, Pitbull, Boxer and Labrador Retriever breeds.

The animals showed the cutaneous (fixed, lymphocutaneous or disseminated), respiratory and systemic forms of the disease. Clinically the lesions were characterized by firm, fistulated nodules draining a brownish exudate which ended up forming crusts and ulcers varying from 5 to 75 mm in diameter in cats. The disseminated cutaneous form of the disease was most common in cats, occurring in 55% of the cases, and was followed by the fixed cutaneous (40.6%) and systemic (4.4%) forms in these animals. The lesions were located on the head and/or members in cats, whereas in dogs they were found on the nasal planum. The systemic form was diagnosed in the post-mortem examination of cats, with the fungus isolation from the liver, spleen, lungs, and/or kidneys. The most common clinical form in dogs was the fixed cutaneous (54.5%), followed by the disseminated cutaneous (18.2%), respiratory (18.2%) and lymphocutaneous forms. Animals presenting the respiratory manifestation of the disease also showed an increase in volume and deformity of the nasal planum, with the absence of cutaneous lesions. Lymphadenopathy, characterized by the fullness of retropharyngeal lymph nodes, was found in all clinical forms. The time elapsed between the appearance of the lesions and the referral of the animal for clinical and laboratory evaluation for the purpose of reaching a final diagnosis for the disease varied from 1 to 36 months (average 5.6 months).

The presence of respiratory signs characterized by sneezing, seromucous discharge and dyspnea was observed in 53 cats (57.6%, n = 92) and six dogs (54.%, n = 11). General health impairment signs, such as anorexia, apathy, and dehydration were found in 45 cats (48.9%, n = 92) and three dogs (27.3%, n = 11).

Mycological findings

The mycological examination of the clinical samples of animals with sporotrichosis revealed a growth of colonies that showed both macro and micro morphological characteristics of *S. schenckii*. Macromorphological characteristics of the colonies of feline specimens showed a dark brown color, a velvety aspect and a rugged topography at 25 °C, while those from canine clinical cases were initially cream-brown and showed a membranous aspect and a high topography, only becoming rugged and developing a dark brown color after 15 – 20 days of incubation. The colonies showed a cream color at 37 °C; those from cats showed a creamy aspect and smooth surface, whereas those from dogs showed a friable aspect and a rugged surface. In the fungal isolation

evaluation by different collection methods, the highest positivity percentage was obtained from samples collected by fine-needle aspiration biopsy (100%), followed by swab (87.8%) and biopsy (79.4%). Fungus detection in oral cavity, conjunctival mucosa, blood, nail, and/or testicle samples revealed the highest isolation percentage from testicles (46.6%) and oral cavity (45.2%) samples (Table 1). In cats the fungus was isolated from 29.4 % nail, 50% oral cavity and 41% conjunctival mucosa samples, while in dogs 25% oral cavity and 12.5% conjunctival mucosa samples were positive for *S. schenckii*.

Histopathological findings

Twenty-five tissue samples of animals with sporotrichosis, 22 of which from cats and three of which from dogs, were analyzed histologically. Out of the 22 studied cats, eight showed the fixed cutaneous, 12 the disseminated cutaneous, and two the systemic forms of the disease. The three canine samples studied resulted in a histopathological diagnosis of diffuse granulomatous reaction with the absence of fungal structures in two of the samples, and scarce yeast cell occurrence in the other.

In cats, the morphological diagnosis of deep granulomatous dermatitis was determined in 22 samples, and was characterized by poorly-organized granulomas of diffuse distribution in 87.5% of the cases of fixed cutaneous sporotrichosis. On the other hand, 100% of the systemic sporotrichosis and 50% of the disseminated cutaneous samples showed well-organized granulomas of nodular distribution. As to cell components of the inflammatory infiltrate, a macrophage predominance accompanied by polymorphonuclears (PMN), epithelioid cells (EC), giant cells (GC) and lymphocytes was observed. With reference to GC, EC and lymphocyte numbers, scores 0 (absence) to 2 (moderate) were observed, whereas for macrophages score 3 (intense) was observed in 68,2% (15/22) of the cases. The occurrence of the Splendore-Hoeppli phenomenon was not observed in any of the analyzed samples.

The agent presence was detected in 77.2% (17/22) of skin samples and was characterized by the occurrence of innumerable oval and/or elongated silver-impregnated and/or PAS positive cells, except for one sample which presented a few round-shaped cells.

As to agent distribution, the highest number of yeast cells was found in lesions with a high number of macrophages (score 3) and scarce polymorphonuclear cells (score 1) showing intra macrophage distribution, intra necrosis or being dispersed in the lesion. Upon connecting the agent distribution to the clinical form of the disease, a higher predominance of disperse yeasts in the lesion or intra necrosis was found in tissue samples of

cats with the disseminated cutaneous (80%) and systemic (100%) forms of the disease. The fixed cutaneous form did not present a prevailing distribution, which was intra macrophagic and dispersed in the lesion.

The quantification of fungal structures according to the clinical manifestation of the disease revealed a high number of yeasts and buddings (score 3) in systemic (100%) and disseminated cutaneous sporotrichosis samples. Fontana-Masson staining, which was performed in 11 feline tissue samples, revealed oval cells of a dark-brown color surrounding the fungal wall in 5 (45.4%) samples, unrelated to the clinical manifestation of the disease (Figure 2).

Four of the seven testicles obtained by elective orchiectomy, as well as lung, spleen, liver and kidney samples, were sent to histological examination. Yeast cells which were compatible with *Sporothrix schenckii* were found in only one feline testicle sample showing disseminated cutaneous sporotrichosis, as well as in all internal organ samples evaluated.

DISCUSSION

The occurrence of a high number of sporotrichosis cases in animals in southern Rio Grande do Sul shows a broad distribution of the fungal agent in the environment, and is a warning to the relevance of early diagnosis and control and prevention measures, bearing in mind this is a zoonotic disease. The Mycology Sector of the Laboratory of Infectious Diseases from the Veterinary School of Pelotas Federal University is a reference center in the study and research of animal sporotrichosis, whose occurrence has been described all over the world and which is thought to be an emergent mycosis in many countries. Hundreds of cases have been diagnosed in Australia, Brazil, Uruguay, China, Colombia, the United States, India, Spain, Italy, Morocco, Japan, Mexico, Peru, Turkey and Venezuela in recent years [3, 10, 17-26]. In Brazil, Rio de Janeiro is the State showing the greatest number of reported cases both in animals and humans, and this mycosis is considered an epidemics [3, 27]. In other States, such as Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná and Santa Catarina, sporotrichosis has been occasionally described in cats and dogs [11, 15, 28-31].

In Rio Grande do Sul, many human cases connected with occupational activities have been described [32, 33]. There have been case reports and studies related to the therapeutics and zoonotic transmission of the disease [4, 8, 13-15].

The disease was first reported in Rio Grande and Pelotas counties, which have hot, wet weather, which favors the growth, multiplication and permanence of *S. schenckii* in the environment [2, 14, 34]. The animals in the

study had free outside access and contact with other animals, what favored the transmission by direct contact with the environment or by cats contaminated with the fungus. Besides, 69.5% of the sporotrichosis cases in cats occurred in males, which are considered the main fungus transmitters to other animals or to humans [3, 4, 14]. Epidemiological findings of the disease in cats are in agreement with other study reports [14, 19, 27]. A significant sex difference was not, however, found in dogs, though the sickness occurred most often in males in this study (54.5%). As to age, the mycosis occurred most frequently in young cats averaging 45 months or 3.75 years of age, whereas in dogs the average was 74 months or 6.1 years of age. Clinical and epidemiological studies in dogs with sporotrichosis are rare in Brazil. Only one epidemiological study done in Rio de Janeiro State reported a higher occurrence of the disease in young male dogs, averaging four years of age [35].

The disseminated cutaneous sporotrichosis clinical form observed in most cats (55%) is the most common in this species and is characterized by nodular, ulcerated, exudative lesions on the head and members [8, 27-29]. Fixed cutaneous sporotrichosis with nasal involvement was the most frequent form in dogs (54.5%), which is in agreement with the high occurrence rate found in other studies [13, 35]. However, the disseminated cutaneous form, considered a rare condition in dogs [10, 19, 35] occurred in 18.2 % of the cases in this study. The description of the respiratory form, which occurred in 18.2% of the dogs, was the first in Brazil. Reference literature reported one case of canine sporotrichosis with sneezing and nasal congestion signs described by Whitmore & Webb [36] in the United States.

The presence of respiratory signs has been broadly described and is considered an important infection pathway by some authors [4, 5, 10, 27, 35, 37]. Respiratory alterations found in 57.6% of the cats and 54.2% of the dogs in this study were higher than those described by Schubach et al [27] and Schubach et al [35], who reported respiratory signs in 36.8% of the cats examined in their studies; they also found that 28% of the dogs showed sneezing and 15% dyspnea and nasal discharge.

S. schenckii fungal isolation classically results in colonies varying from a cream to a dark brown color with a membranous aspect and a rugged surface at 25 °C. Yeast colonies show a white to cream color, an irregular surface and creamy consistency at 37 °C [1, 2]. The present study found a growth of *S. schenckii* colonies that was similar to that described by Lacaz et al [1]; however, feline colonies showed a different morphological pattern from canine colonies, according to a phenotypic study done by Madrid (data unpublished).

The isolation positivity of *S. schenckii* in bodily areas with the absence of lesions was higher in the oral cavity (45.2%, 19/42), followed by the testicles (46.6 %, 7/15), conjunctival mucosa (38.1%) and nails (29.4%). Souza

et al [7] obtained fungus isolation from feline nails in 29.1% of the cases, while Schubach et al [35] obtained a 39.5% nail and 41.8% oral cavity fungus isolation in cats. *S. schenckii* was isolated in 25% oral cavity and 12.5% conjunctival mucosa cases in dogs, whereas other authors obtained only a 10% fungal positivity in the oral cavity of dogs [35]. Studies aiming at *S. schenckii* detection in the conjunctival mucosa alone have not been found, except for a description of a conjunctival sporotrichosis case in a cat [38]. In the present study, a great number of cats showing a kind of corneal opacity called Florida Spot which, according to Machado et al. [39] has unknown etiology, was found. Thus, further studies must be done so as to check the connection between the high *S. schenckii* positivity in the conjunctival mucosa (45.2%) and the Florida Spot etiopathogenesis.

Of the seven cats with sporotrichosis that proved to be *S. schenckii* positive in the testicle samples, only one sample showed ulcerated and exudative cutaneous lesions. The fungus isolation in 46,6% of the testicle samples emphasizes the tropism that has been demonstrated in experimental sporotrichosis studies, once the testicles have a 5 °C lower temperature than that of the rest of the body, thus facilitating fungal multiplication [40, 41, 42]. Schubach et al [6] obtained *S. schenckii* isolation in one of seven testicle samples showing no lesions from cats with sporotrichosis that had been submitted to orchiectomy, which was suggestive of the dissemination of the agent.

The 15 blood samples sent for microbiological examination resulted in negative cultures. *S. schenckii* isolation from blood specimens is rare, though Schubach et al [6] obtained this isolation in one of five samples of disseminated cutaneous sporotrichosis in cats.

The granulomatous reaction, consisting of macrophages, polymorpho-nuclears, epithelioid and giant cells and lymphocytes observed in the present study is similar to that described in other studies [9, 19, 29-31]. However, the relation between the histopathological pattern and the clinical manifestation of sporotrichosis has not been the focus of studies by other researchers so far. The present study revealed that 87.5% of fixed cutaneous sporotrichosis cases in cats were histologically characterized by poorly-organized granulomas consisting of diffuse infiltrate, whereas the disseminated cutaneous (50%) and systemic (100%) forms showed a differentiated inflammatory pattern characterized by well-organized granulomas containing infiltrate of nodular distribution. A piece of research by Schubach et al [9] that included eight cats with disseminated cutaneous sporotrichosis showed extensive inflammatory infiltrate containing mononucleated and polymorphonucleated cells with macrophage and neutrophil predominance, which was also observed in this study.

As to fungal structure occurrence in feline tissues, a high number of yeasts in lesions with the predominance of macrophages were observed in the systemic and disseminated cutaneous sporotrichosis. On the other hand, Miranda et al [16], upon studying cutaneous lesions in dogs with sporotrichosis, detected fungal structures with a great number of neutrophils in 56.7% of the lesions.

Yeast visualization in dog samples, as well as in clinical human samples, is rare. A diffuse granulomatous reaction with fungal structure visualization was observed in 50% of the canine sporotrichosis cases in the present study. The findings were similar to those described by Miranda et al [16], who studied the histopathology of 86 tissue samples of dogs with sporotrichosis and observed a suppurative granulomatous inflammation in 71% of the cases, as well as the agent presence in 58.3% of the cases.

Quintella et al [43], upon analyzing 119 cutaneous samples of humans with sporotrichosis, observed variable histopathological characteristics and only 64.7% of fungus-positive samples. Thus, they suggested that the sporotrichosis diagnosis must be considered even when yeast structures are absent in tissues.

The Splendori-Hoepli phenomenon was not found in the tissue samples of cats and dogs with sporotrichosis in this study. This phenomenon is characterized by the presence of radiated bodies surrounded by an eosinophilic reaction found in various fungal and bacterial diseases [44]. However, several authors have stated that its occurrence in human tissue samples is an indication of sporotrichosis [45, 46]. Fleury et al [31] had already warned on the discrepancies between tissue reaction in humans and cats, and no asteroid bodies were demonstrated.

Melanin detection in *S. schenckii* cells in 45.4% of the feline tissue samples by the Fontana-Masson technique was not connected to the clinical form of the disease. Therefore, the possibility of a connection between the melanized isolates and the agent dissemination is low. Studies in experimental sporotrichosis on the role played by melanin in *S. schenckii* virulence have been done by different authors [40, 41, 47, 48]. Even so, Madrid et al [49] have recently analyzed the presence of melanin in *S. schenckii* clinical isolates by electronic microscopy and did not find melanization differences among clinical isolates, suggesting that melanin is not the main factor related to lesion severity in cats.

The growing occurrence of cases in Rio Grande do Sul demonstrates the presence of *S. schenckii* in this area, which must be considered endemic. Thus, it is important to emphasize the need to perform laboratory examinations which can confirm the mycosis, mainly in dogs, which show different clinical signs. Besides, the

presence of respiratory alterations, as well as the high fungal positivity in feline oral cavity, conjunctival mucosa and testicles, reinforces the participation of other fungal infection and/or dissemination pathways. The histopathological findings reinforce the development of disseminated clinical forms in cats, with extensive areas of inflammatory response containing numerous yeasts.

Acknowledgements. Thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. 550083/2009-0 and 474533/2004-2) for financing of this research, to Tatiane Barbosa by technical support and Dr. Luiz Carlos Severo of the Laboratório de Micologia, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, RS, Brasil by assistance with Fontana-Masson technique.

Conflict of interest. The authors have no conflict of interest.

References

1. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. Tratado de Micologia Médica. 9rd ed. São Paulo:Savvier; 2002.
2. Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc. 2006; 78(2): 293-308.
3. Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. Rev Panam Salud Publica. 2010; 27(6):455-460.
4. Madrid IM, Mattei AS, Martins AA, Nobre MO, Meireles MCA. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. Zoonoses and Public Health. 2010; 57:151-154.
5. Nobre MO, Castro AP, Caetano D, Souza LL, Meireles MCA, Ferreira L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. Rev Iberoam Micol. 2001; 18:137-140.

6. Schubach TM, Schubach A, Reis RS, Cuzzi-Maya T, Blanco TCM, Monteiro DF, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 2002; 153:83–86.
7. Souza LL, Nascente PS, Nobre MO, Meinerz ARM, Meireles MCA. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Braz J Microbiol*. 2006; 37:372-374.
8. Xavier MO; Nobre MO, Sampaio Jr DP, Antunes TA, Nascente PS, Sória FBA, et al. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 2004; 34(6):1961-1963.
9. Schubach TMP, Schubach AO, Cuzzi-Maia T, Okamoto T, Reis RS, Fialho-Monteiro PC, et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. *Vet Rec*. 2003; 152:172-175.
10. Carfachia C, Sasanelli MT, Lia RP, Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case Report. *Mycopathologia*. 2007; 163:75–79.
11. Filgueira KD. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. *Ciência Animal Brasileira*. 2009; 10(2):673-677.
12. Larsson CE, Gonçalves MA, Araujo VC, Dagli MLZ, Correa B, Fava Neto C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1989; 31:351-358.
13. Madrid IM, Xavier MO, Mattei AS, Carapeto LP, Antunes TA, Santos JR R, et al. Esporotricose óssea e cutânea em um canino. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2007; 44(6): 441-443.
14. Meinerz ARM, Nascente PS, Schuch LFD, Faria RO, Antunes TA, Cleff MB, et al. Felino doméstico como transmissor da esporotricose em trabalhador rural- relato de caso. *Arq Inst Biol*. 2007; 74(2):149-151.
15. Jesus JR, Marques SMT. Esporotricose cutânea em gato – relato de caso. *Clínica Veterinária*. 2006; 65:72-74.
16. Miranda LHM, Quintella LP, Santos IB, Menezes RC, Figueiredo FB, Gremião IDF, et al. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia*. 2009; 168:79-87.
17. Benchekroun L, Kabbaj L, Ait El Kadi M, Ait El Kadi M, Ghfir B, Moustachi A, et al. Sporotrichose à *Sporothrix schenckii* : à propos d’une observation. *Journal de Mycologie Médicale*. 2008; 18:43-45.

18. Conti-Diaz IA. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*. 1989; 108:113-116.
19. Crothers SL, White SD, Ihrke PJ, Affolter VK. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). *ESVD and ACVD*. 2009; 20:249-259.
20. Feeney KT, Arthur IH, Whittle AJ, Altman SA, Speers SJ. Outbreak of Sporotrichosis, Western Australia. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(8):1228-1231.
21. Gurcan S, Konuk E, Kilic H, Otkun M, Ener B. Sporotrichosis, a disease rarely reported from Turkey, and an overview of Turkish literature. *Mycoses*. 2007; 50:426–429.
22. Mahajan VK, Sharma NL, Sharma RC, Gupta ML, Garg G, Kanga AK. Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. *Mycoses*. 2005; 48:25-31.
23. Nakamura Y, Sao H, Takahashi H, Koide K, Hasegawa A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. *Mycoses*. 1996; 39:125-128.
24. Pappas PG, Tellez I, Deep AE, Nolasco D, Holgado W, Bustamante B. 2000. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. *Clin Infect Dis*; 30:65-70.
25. Rubio G, Sanchez G, Porras L, Alvarado Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico em um centro de referencia em Colombia. *Rev Iberoam Micol*. 2010; 27(2):75–79.
26. Zhang J & Lin J. Clinical analysis of 316 cases of cutaneous sporotrichosis. *Chinese Journal of Mycology*. 2008-04
27. Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros M, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *JAVMA*. 2004; 224(10):1623-1629.
28. Colodel MM, Jark PC, Ramos CJR, Martins VMV, Schneider AF, Pilati C. Esporotricose cutânea felina no Estado de Santa Catarina: relato de casos. *Veterinária in Foco*. 2009; 7(1):18-27.
29. Fernandes CGN, Moura ST, Dantas AFM, Blatt MCS. Esporotricose Felina – aspectos clinic-epidemiológicos: relato de casos (Cuiabá, Mato Grosso, Brasil). *MEDVEP Rev Cientif Med Vet Pequenos Anim Anim Estim*. 2004; 2(5):39-43.
30. Figueiredo JF & Ferreira FA. Esporotricose canina. *Veterinária notícias*. 1998; 4(1):115-120.

31. Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, Fujita MS, Rosa PS, Weckwerth AC, et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2001; 40:318-322.
32. Londero AT, Ramos CD. Esporotricose no Rio Grande do Sul – três décadas de observação. *An Bras Dermatol*. 1989; 64(6):307-310.
33. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, Brum LM, Westphalen JB, Altermann MJ, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999; 32(5):541-545.
34. Nobre MO, Meireles MCA, Caetano DT, Faé F, Cordeiro JMC, Meireles RM, et al. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. *Revista Brasileira de Ciências Veterinárias*. 2002; 9(1):36-41.
35. Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FF, Cuzzi-Maya T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). *Med Mycol*. 2006; 44:87-92.
36. Whittmore JC & Webb CB. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. *Can Vet J*. 2007; 48:411-414.
37. Leme LRP, Schubach TMP, Santos IB, Figueiredo FB, Pereira SA, Reis RS, et al. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. *Mycoses*. 2007; 50:210-214.
38. Silva DT, Pereira SA, Gremião IDF, Chaves AR, Cavalcanti MCH, Silva JN, et al. Esporotricose conjuntival felina. *Acta Scientiae Veterinarie*. 2008; 36(2):181-184.
39. Machado MLS, Baptista NI, Breitsameter I. Ocorrência de opacidades corneanas (Florida spots) em gatos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2004; 32(1): 65-68.
40. Madrid IM, Mattei AS, Xavier MO, Fernandes CG, Guim TN, Santin R, et al. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microbes and Infection*. 2010; 12:162-165.
41. Nobre MO, Madrid IM, Antunes TA, Martins AA, Fernandes CG, Mattei AS, et al. Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. *Journal de Mycologie Médicale*. 2008; 18:191-197.

42. Tachibana T, Matsuyama T, Ito M, Mitsuyama M. 2001. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Med Mycol*; 39:295-298.
43. Quintella LP, Passos SRL, Vale ACF, Galhardo MCG, Barros MBL, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011; 38(1):25-32.
44. Hussein MR. Mucocutaneous Splendore-Hoepli phenomenon. *J Cutan Pathol*. 2008; 35:979-988.
45. Civila ES, Bonasse J, Conti-Díaz IA, Vignale A. Importance of the direct examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol*. 2004; 43:808-810.
46. Gezuele E, Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroid esporotricósico em el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol*. 2005; 22:147-150.
47. Morris-Jones R, Youngchim S, Gomez BL, Aisen P, Hay RJ, Nosanchuk JD, et al. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infect Immun*. 2003; 71(7):4026-4033.
48. Romero-Martinez R, Wheeler M, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infect Immun*. 2000; 68(6):3696-3703.
49. Madrid IM, Mattei AS, Soares MP, Nobre MO, Meireles MCA. Ultrastructural study of the mycelial phase of *Sporothrix schenckii* clinical isolates obtained of feline, canine and human sporotrichosis. *Braz J Microbiol* (in press).

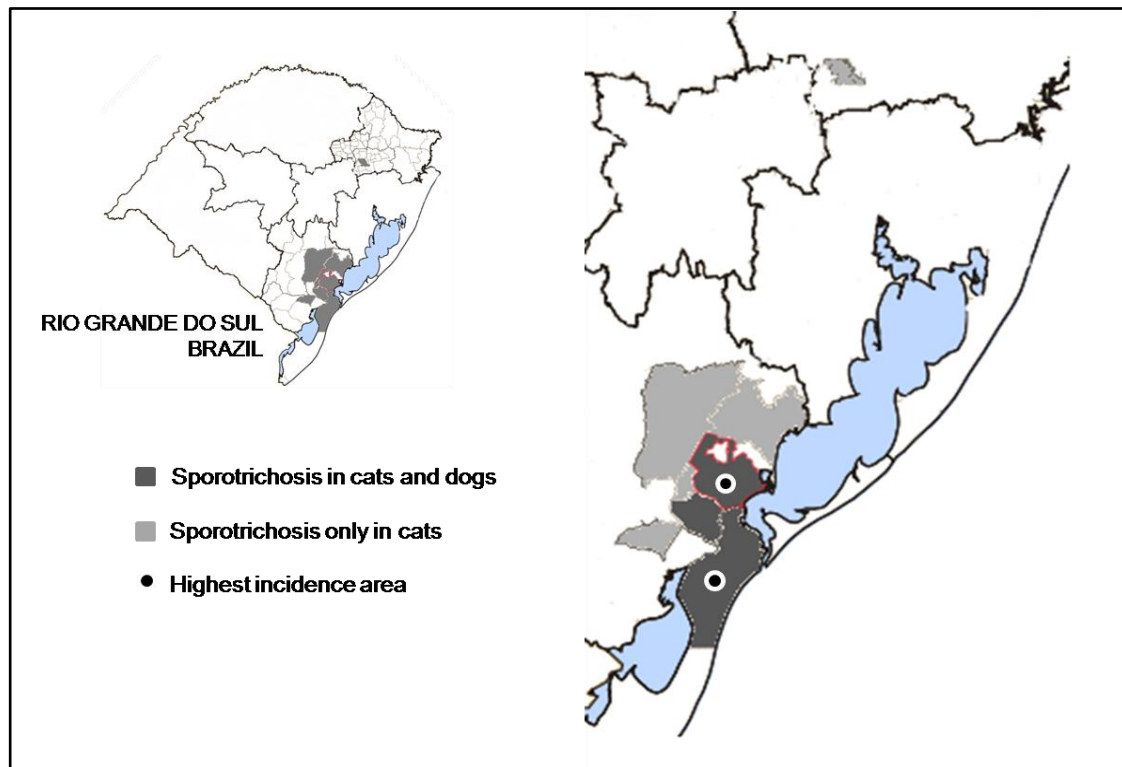


Figure 1. Distribution of the sporotrichosis cases in cats and dogs in the southf region from state of Rio Grande do Sul, Brazil.

Table 1. *Sporothrix schenckii* isolation from clinical samples of cats and dogs with sporotrichosis

Samples	FELINES	CANINES	TOTAL
	% (p/n)	% (p/n)	% (p/n)
Swab	89.1 (49/55)	81.8 (9/11)	87.8 (58/66)
Crusts	38.7 (12/31)	33.3 (1/3)	38.2 (13/34)
Cutaneous biopsy	77.4 (24/31)	100 (3/3)	79.4 (27/34)
FNAB	NO	100 (2/2)	100 (2/2)
Oral cavity	50 (17/34)	25 (2/8)	45.2 (19/42)
Conjunctival mucosa	44.1 (15/34)	12.5 (1/8)	38.1 (16/42)
Nails	29.4 (10/34)	NO	29.4 (10/34)
Blood	(0/14)	0/1	(0/15)
Testicles	46.6 (7/15)	NO	46.6 (7/15)

% percentage of positive samples

p/n = positive samples/total of samples

FNAB: fine-needle aspirative biopsy

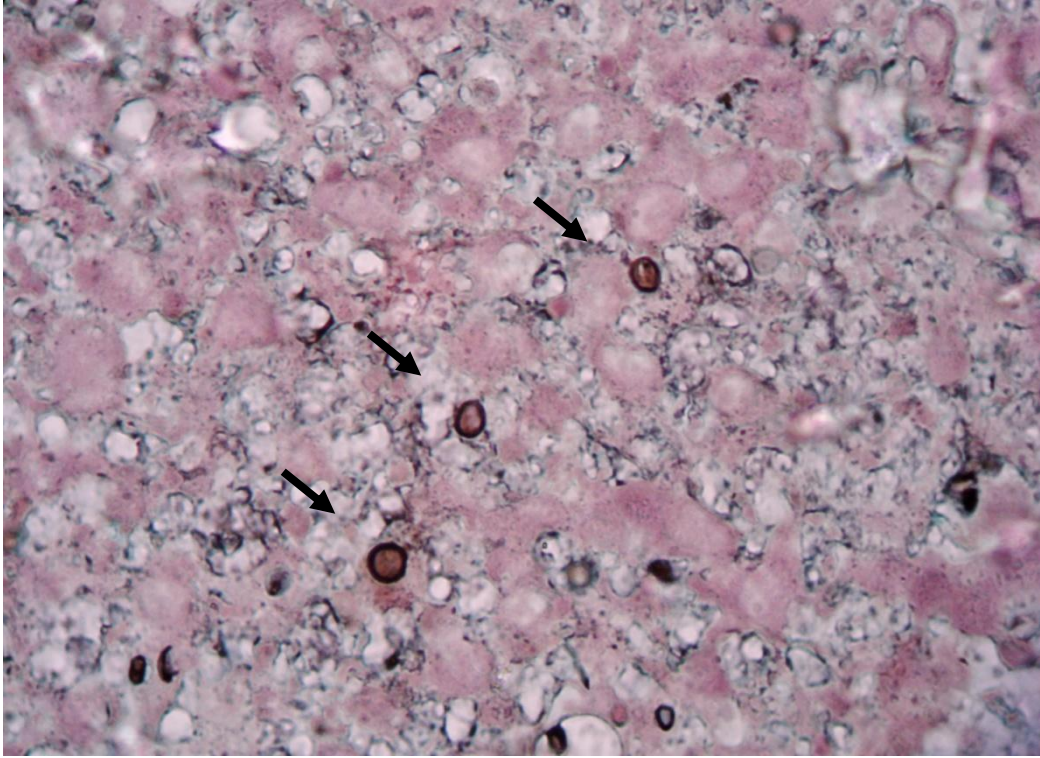


Figure 2. *S. schenckii* yeasts positively reactive for the presence of melanin by Fontana-Masson stain (400x).

ARTIGO 2

Alterações hematológicas em caninos e felinos com esporotricose cutânea

*Artigo enviado para a **Revista de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR***

Alterações hematológicas em caninos e felinos com esporotricose cutânea

Isabel Martins Madrid^{1*}, Antonella Souza Mattei², Alessandra Jacomelli Teles³, Marlete Brum Cleff⁴, Márcia de Oliveira Nobre⁵, Mário Carlos Araújo Meireles⁶

Resumo: A esporotricose é a micose subcutânea de maior ocorrência em pequenos animais, especialmente felinos e caninos. Esta doença causa lesões cutâneas ulceradas de caráter subagudo ou crônico que podem resultar no comprometimento do estado geral do animal. Este estudo avaliou alterações hematológicas em 19 cães e gatos com esporotricose relacionando-as com a forma clínica da doença. As alterações hematológicas foram observadas em 74% dos animais, sendo caracterizadas principalmente por leucocitose por neutrofilia e anemia. Os resultados demonstram que animais com a forma cutânea fixa da micose não apresentam alterações no hemograma enquanto que animais com a forma cutânea disseminada desenvolvem importantes alterações que indicam o agravamento do quadro clínico com possibilidade de evolução da micose para uma forma sistêmica.

Palavras-chave: micose, hematologia, gatos, cães

¹ MsC. Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel - Gonçalves chaves 3435, Centro CEP 96015-560, Pelotas-RS imadrid_rs@yahoo.com.br

*Parte integrante da Tese de Doutorado do primeiro autor

² Especialista em Análises Clínicas, UFRGS - Rua Uruguai 1058, Porto CEP96010-630, Pelotas-RS antonella.mattei@hotmail.com

³ Aluna de graduação, Faculdade de Veterinária, UFPel - Anchieta 1373 apto 301, Centro CEP 96015420, Pelotas-RS ale.teles@gmail.com

⁴ Dra. Profa. Terapêutica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel - Rua Xavier Ferreira 618, CEP96010-540 Porto, Pelotas-RS emebrum@bol.com.br

⁵ Dra. Profa. Clínica de Pequenos Animais, Hospital Universitário de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFPel - Praça Nova Palma 41, Laranjal CEP 96090-450 monobre@uol.com.br

⁶ Dr. Prof. Doenças Infecciosas, Faculdade de Veterinária, UFPel – Pinto Martins 462, Centro CEP 96015-000, Pelotas, RS meireles@ufpel.edu.br

Hematological alterations in dogs and cats with cutaneous sporotrichosis

Abstract: Sporotrichosis is the main subcutaneous mycosis in small animals, specially cats and dogs. This disease leads to the development of subacute or chronic cutaneous lesions that can results in the compromising of the animal general state. This study evaluated hematological alterations of 19 dogs and cats with sporotrichosis correlated with the clinical form of the disease. Hematological alterations were observed in 74% of the animals, being characterized mainly for leucocytosis with neutrophilia and anaemia. The results obtained in this study demonstrated that animals with the cutaneous fixed form of the mycosis do not present alterations in the blood count. However, animals with the cutaneous disseminated form develop important alterations that can aggravate the disease and advance the evolution of the mycosis to systemic form.

Key-words: mycose, hematology, cats, dogs

Alteraciones hematológicas em caninos y felinos con esporotricosis cutánea

Resumen: La esporotricosis es la micosis subcutánea de mayor ocurrencia en pequeños animales, específicamente felinos y caninos. Esta enfermedad produce lesiones cutáneas ulceradas de carácter sub agudo o crónico que pueden resultar en el comprometimiento del estado general del animal. Este estudio evaluó alteraciones hematológicas en 19 perros y gatos con esporotricosis relacionándolas con la forma clínica de la enfermedad. Fueron observadas alteraciones hematológicas en 74% de los animales, siendo caracterizadas principalmente por leucocitosis por neutrofilia y anemia. Los resultados demuestran que animales con la forma cutánea fija de la micosis no presentan alteraciones en el hemograma en cuanto que animales con la forma cutánea diseminada desarrollan importantes alteraciones que indican el comprometimiento del cuadro clínico con posibilidad de avanzar a la forma sistémica.

Palabras-clave: esporotricosis, hematología, gato, perros

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose zoonótica causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* que acomete uma grande variedade de espécies animais, domésticas e selvagens (MEIRELES; NASCENTE, 2009). No entanto, a espécie felina é a mais acometida pela micose, havendo inúmeros relatos descritos mundialmente (PAPAS, et al. 2000; NOBRE, et al. 2002; SCHUBACH, et al. 2003; MADRID, et al. 2008; CROTHERS, et al. 2009).

A doença apresenta curso sugabudo ou crônico, sendo causada pelo implante traumático de células de *S. schenckii* no tecido cutâneo ou pela inalação de conídios presentes no ambiente. Como resultado da infecção ocorre o desenvolvimento de lesões na pele, mucosas e/ou órgãos internos (LACAZ, et al. 2002). Esta micose é caracterizada clinicamente pelas formas cutâneas, extracutâneas e sistêmica, sendo as formas cutâneas de maior ocorrência em humanos e animais (NOBRE, et al. 2002; MEIRELES; NASCENTE, 2009).

Nos últimos anos, o crescente registro de casos de esporotricose em felinos e caninos alertou para a importância desta micose em saúde pública, uma vez que se trata de uma doença de caráter zoonótico. Neste contexto, os felinos desempenham importante papel na epidemiologia da doença, pois são os principais transmissores do fungo para humanos e animais (MADRID, et al. 2008). A necessidade de estudos visando elucidar aspectos relacionados a patogenia da doença nas espécies felina e canina embasaram a realização do presente estudo, tendo em vista a escassez de pesquisas relacionadas a parâmetros hematológicos em animais com esporotricose. Neste contexto, o trabalho teve como objetivo avaliar as alterações hematológicas em felinos e caninos com esporotricose relacionando-as com a forma clínica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo, 19 animais com esporotricose diagnosticados no Setor de Micologia do Laboratório de Doenças Infecciosas, Faculdade de Veterinária/UFPel. Os animais foram avaliados quanto às características individuais como sexo, idade e raça, e quanto aos aspectos e localização das lesões. A avaliação clínica foi realizada em todos os animais, os quais não apresentavam associação de doenças. A análise hematológica foi realizada pela colheita de sangue através da punção da veia jugular ou veia cefálica, sendo as amostras acondicionadas em tubos de ensaio contendo anticoagulante. O hemograma foi realizado através da contagem manual em câmara Neubauer e dosagem de proteínas plasmáticas totais (PPT) através de refratômetro, sendo utilizados valores de referência de acordo com Feldman et al. 2000.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 19 animais, 15 eram felinos e quatro caninos que desenvolveram esporotricose cutânea. Dos felinos, 86,7% eram machos e 13,3% fêmeas com idade média de 3,5 anos, sendo 86,7% sem raça definida (SRD). Quanto a forma clínica da doença, 33,3% (5/15) dos animais apresentavam a forma cutânea fixa e 66,7% (10/15) a forma cutânea disseminada. Dos caninos, 75% eram machos e 25% fêmeas com idade média de 5,7 anos, sendo dois sem raça definida, um da raça Pitbull e um Pinscher. Os cães desenvolveram as formas linfocutânea (50%), cutânea disseminada (25%) e cutânea fixa (25%). As características individuais estão descritas na tabela 1.

Dos 19 animais com esporotricose, 14 apresentaram alterações na série branca e/ou vermelha, sendo 73,3% (11/15) felinos e 75% (3/4) caninos (Tabela 2). As principais alterações observadas foram leucocitose (de 21600 a 25200mm³ para felinos e 15000 a 17000mm³ para caninos) por neutrofilia e anemia.

Com relação à forma clínica da micose, todos os cinco felinos com a forma cutânea fixa apresentaram valores normais, considerados fisiológicos no leucograma. Nos felinos que desenvolveram a forma cutânea disseminada, o leucograma revelou 40% (4/10) com leucocitose por neutrofilia e desvio a esquerda regenerativo que ocorre devido ao processo infeccioso e inflamatório exsudativo, 20% (2/10) normoleucometria com inversão da relação linfócito/neutrófilo e 40% (4/10) com valores dentro dos parâmetros fisiológicos. Nos caninos observou-se no leucograma, leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda regenerativo em todos os animais, com exceção de um canino com a forma linfocutânea que apresentou valores dentro dos parâmetros fisiológicos.

No eritrograma, dos cinco felinos com a forma cutânea fixa, verificou-se um com anemia normocítica e normocrômica e quatro com valores normais para a contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito. Dos dez felinos com a forma cutânea disseminada, três (30%) apresentaram valores normais, cinco (50%) anemia normocítica e normocrômica e dois (20%) anemia normocítica e hipocrômica. Dos quatro caninos, um apresentou valores normais e o restante (3/4), anemia normocítica e normocrômica, sendo um com a forma cutânea fixa e dois linfocutânea.

A contagem de proteínas plasmáticas totais (PPT) revelou valores abaixo do fisiológico caracterizando uma desidratação em 33,3% (5/15) dos felinos estudados, todos com a forma cutânea disseminada, sendo que em três destes casos a anemia estava mascarada pela desidratação.

A infecção em felinos normalmente resulta na ocorrência das formas cutânea disseminada e sistêmica, as quais são consideradas mais graves, o que frequentemente resulta no óbito desses animais (NOBRE, et al. 2002; SCHUBACH, et al. 2003). Os cães são a segunda espécie mais acometida pela doença e normalmente apresentam acometimento

linfático e cutâneo, caracterizando a forma linfocutânea da micose (SCHUBACH, et al. 2006; MEIRELES; NASCENTE, 2009).

Estudos em esporotricose cutânea felina revelaram resultados semelhantes ao encontrados no presente estudo, sendo as principais alterações hematológicas, relacionadas à anemia e leucocitose com desvio a esquerda regenerativo (SCHUBACH, et al. 2003; SILVA, et al. 2008). No entanto, em um caso de felino com demodicose associada à esporotricose e pediculose, Pereira et al. (2005) observaram anemia e leucocitose por eosinofilia, sendo esta relacionada provavelmente a infecção parasitária.

As alterações hematológicas em cães observadas por Schubach et al. (2006) diferem dos resultados obtidos no presente estudo. Estes autores obtiveram 50% dos animais com anemia e 10% com leucocitose por neutrofilia e eosinofilia, sendo os achados considerados inespecíficos e não compatíveis com doenças infecciosas. Os resultados do presente estudo demonstraram 75% de cães com aumento da contagem de leucócitos e neutrófilos, e redução dos valores de hematócrito, hemoglobina e contagem de hemáceas, resultado semelhante ao descrito por Carfachia et al. (2007) em um canino com esporotricose cutânea disseminada. Estudo comparando alterações hematológicas em cães com esporotricose e leishmaniose demonstrou significativa similaridade, sendo a principal alteração relacionada ao eritrograma (SANTOS, et al. 2007).

Os achados hematológicos em animais experimentais com esporotricose sistêmica foram semelhantes aos encontrados no presente estudo com 91% dos animais com alterações no leucograma e 75% no eritrograma (MEINERZ, et al. 2008).

CONCLUSÃO

Neste estudo foi observado que animais com a forma cutânea fixa não apresentam alterações nos valores hematológicos e que animais com a forma cutânea disseminada da micose apresentaram marcada alteração no hemograma, tanto no leucograma como no

eritrograma. Este achado indica a maior gravidade da doença, alertando para o comprometimento do estado geral do animal, o que reflete o agravamento da doença com o desenvolvimento de lesões sistêmicas.

Agradecimentos: Aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPERGS.

Referências bibliográficas

CARFACHIA, C.; et al. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case Report. **Mycopathologia**, v.163, p.75-79, 2007.

CROTHERS, S.L.; et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v.20, p.249-259, 2009.

FELDMAN, B.F.; et al. *Schalm's Veterinary Hematology 5th Ed.* Lippincott: Williams and Wilkins, 2000, 1344p.

LACAZ, C.S.; et al. *Tratado de micologia médica*. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

MADRID, I.M.; et al. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.151-154, 2010.

MEINERZ, A.R.M.; et al. Esporotricose experimental sistêmica em ratos Wistar: avaliação hematológica e perfil hepático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1026-1028, 2008.

MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009. 543p.

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

PAPAS, P.G.; et al. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.65-70, 2000.

PEREIRA, S.A.; et al. Demodicose associada à esporotricose e pediculose em gato co-infectado por FIV/FelV. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.75-78, 2005.

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

SCHUBACH, T.M.P.; T. et al. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Records**, v.152, p.172-175, 2003.

SCHUBACH, T.M.P.; et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Micology**, v.44, p.87-92, 2006.

SILVA, A.P.; et al. Esporotricose felina – relato de caso. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado-RS, 2008. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anaais/cd/resumos/R0254-1.pdf> Acesso em: 5 set. 2009.

Tabela 1. Felinos e caninos com esporotricose incluídos no estudo hematológico

Espécie	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE (Meses)	RAÇA	FORMA CLÍNICA
FELINA	S03-04	Macho	24	SRD	CF
	S01-05	Macho	18	SRD	CD
	S03-05	Macho	24	SRD	CD
	S08-06	Macho	36	SRD	CD
	S13-06	Macho	24	SRD	CD
	S17-08	Macho	24	SRD	CF
	S19-08	Macho	60	SRD	CD
	S20-08	Macho	13	SRD	CD
	S21-08	Macho	48	SRD	CF
	S25-08	Fêmea	24	SRD	CD
	S26-08	Macho	60	SRD	CD
	S28-08	Macho	36	Siamês	CD
	S31-09	Fêmea	36	SRD	CD
	S32-09	Macho	2	Siamês	CF
	S35-09	Macho	60	SRD	CF
CANINA	S02-05	Macho	108	SRD	CD
	S10-06	Macho	84	Pinscher	LC
	S11-06	Macho	48	Pitbull	LC
	S15-07	Fêmea	36	SRD	CF

SRD: sem raça definida; CF: cutânea fixa; CD: cutânea disseminada; LC:linfocutânea

Tabela 2. Alterações nos valores hematológicos de felinos com esporotricose cutânea

FC	LEUCOGRAMA				ERITROGRAMA			PPT 5,6 - 7,5g%
	Eosinófilos 110-234 mm ³	Monócitos 55-780 mm ³	Linfócitos 1100- 10725 mm ³	Neutrófilos 1925-14625 mm ³	Eritrócitos 5-10 milhões/mm ³	Hemoglobina 8-15%	Hematócrito 24-45%	
CF	N	N	N	N	N	N	N	N
CF	N	N	N	N	-	-	-	N
CF	-	N	N	N	N	N	N	N
CF	-	N	N	N	N	N	N	N
CF	N	N	N	N	N	N	N	N
CD	N	-	N	N	N	N	N	N
CD	N	-	+	-	N	-	N	+
CD	-	-	N	+	-	-	-	+
CD	N	N	N	N	N	N	N	+
CD	N	N	N	N	-	-	-	+
CD	N	N	-	N	-	-	-	+
CD	-	+	N	+	N	-	N	+
CD	-	N	N	+	N	N	N	N
CD	N	-	N	N	-	-	-	+
CD	-	N	N	+	N	N	N	N

FC: forma clínica

PPT: proteínas plasmáticas totais

CF: cutânea fixa

CD: cutânea disseminada

- : abaixo dos valores de referência para a espécie

+ : acima dos valores de referência para a espécie

N: valores dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie

ARTIGO 3

Morfologia e termotolerância de diferentes isolados de *Sporothrix schenckii* do Sul do Brasil

*Artigo enviado para a revista **Arquivos do Instituto Biológico***
(Arq.007/11)

**Morfologia e termotolerância de diferentes isolados de *Sporothrix schenckii* do Sul do
Brasil**

Isabel Martins Madrid¹, Rosema Santin², Luis Filipe Damé Schuch¹, Angelita Reis Gomes¹,
Márcia de Oliveira Nobre³, Mário Carlos Araújo Meireles¹

¹ Laboratório de Doenças Infecciosas, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de
Veterinária, UFPel Rua Gonçalves chaves 3435, CEP96015-560, Pelotas-RS, Brasil; +55 53
9911.2744, Fax +55 53 3275.7644; imadrid_rs@yahoo.com.br

¹ Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, RS

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, RS

³ Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, RS

Resumo

O fungo *Sporothrix schenckii* é o agente etiológico da esporotricose em animais e humanos. Esta micose é considerada de grande importância em saúde pública estando associada à inoculação traumática do fungo na pele. Considerando as diferenças clínicas, epidemiológicas e moleculares descritas em vários estudos, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características fenotípicas e termotolerância de 36 isolados clínicos de *S. schenckii* provenientes de esporotricose felina, canina e humana, quatro isolados do ambiente e duas cepas de referência. Os 42 isolados de *S. schenckii* provenientes de cinco municípios da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil foram utilizados para a análise fenotípica, termotolerância e conversão para a fase leveduriforme. Os cultivos em agar lactrimel, agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e agar batata a 25 e 35°C demonstraram diferenças na morfologia das colônias e na velocidade de crescimento ($p=0,026$) entre as cepas de referência e os isolados clínicos e do ambiente. Na avaliação da termotolerância, 26,2% dos isolados foram capazes de crescer a 41°C. Todos os isolados foram convertidos para a fase leveduriforme. O estudo da micromorfologia demonstrou diferenças estatísticas ($p<0,01$) entre isolados clínicos de felinos e o restante dos isolados em relação a conídios pigmentados e formas de “margaridas”. Nossos resultados demonstram diferenças morfológicas entre isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* provenientes de uma mesma região e uma maior probabilidade de desenvolvimento de formas clínicas disseminadas e sistêmicas por isolados de esporotricose felina devido à termotolerância.

Palavras-chave: esporotricose, fungo dimórfico, morfologia, crescimento

Morphology and thermotolerance of different *Sporothrix schenckii* isolates from South of Brazil

Abstract

Sporothrix schenckii is the etiological agent of sporotrichosis in animals and humans. This mycosis is considered of great importance in public health and it is associated with traumatic inoculation in the skin. Due to clinical, epidemiological and molecular differences described in other studies, the aim of this study was to evaluate phenotypic and thermotolerance characteristics of 36 *S. schenckii* isolates from clinical cases of feline, canine and human sporotrichosis, four environmental isolates and two reference strains. Forty-two *S. schenckii* isolates from five towns of the south region of the Rio Grande do Sul, Brazil were used to phenotypic analyses, thermotolerance and conversion to the yeast phase. Culture on lactrimel agar, Sabouraud dextrose agar added chloramphenicol and potato dextrose agar at 25 °C and 35 °C showed differences in the colonies morphology and growth rate ($p=0,026$) among reference strains and, clinical and environmental isolates. In the thermotolerance evaluation 26.2 % of isolates were capable of growth at 41°C. All isolates showed conversion to the yeast phase. Microscopic morphologies study showed statistical differences ($p<0,01$) among clinical isolates of felines and other species in relation to sessile pigmented and sympodial conidia. Our results demonstrated morphological differences among *S. schenckii* clinical and environmental isolates from the same region and a great probability of development of disseminated and systemic clinical forms by isolates from sporotrichosis feline due to it thermotolerance.

Key-words: Sporotrichosis, dimorphic fungus, morphology, growth

74 **Introdução**

75 *Sporothrix schenckii* é um fungo geofílico e dimórfico, encontrado na forma micelial
76 no meio ambiente e *in vitro* em temperatura ao redor de 25⁰C, e na forma de levedura quando
77 em parasitismo e *in vitro* a 37⁰C. Este fungo é encontrado em cascas de árvores, musgos,
78 plantas, palha, madeira e material orgânico em decomposição, podendo permanecer por
79 períodos prolongados nestes locais (BARROS *et al.*, 2008; NOBRE *et al.*, 2008). Possui fatores
80 de patogenicidade como enzimas extracelulares, termotolerância, diferentes constituintes da
81 parede celular e presença de grânulos de melanina que aumentam suas chances de
82 sobrevivência no ambiente e no hospedeiro (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006; MADRID *et al.*,
83 2010a).

84 O fungo *S. schenckii* é o agente etiológico da esporotricose em animais e humanos.
85 Esta doença é considerada a micose subcutânea de maior ocorrência na América do Sul e com
86 grande importância em saúde pública (BARROS *et al.*, 2008; MADRID *et al.*, 2010b). Nos
87 últimos anos, vários estudos têm sido conduzidos com relação a fatores de patogenicidade do
88 *S. schenckii* visando compreender as variações clínicas e de suscetibilidade antifúngica do
89 agente (KONG *et al.*, 2006; NOBRE *et al.*, 2008). Assim, várias pesquisas foram realizadas
90 comparando aspectos moleculares e virulência de isolados de *S. schenckii* em diferentes
91 países (DIXON *et al.*, 1991; FERNANDES *et al.*, 2009; HOLECHEK *et al.*, 2004; KONG *et al.*,
92 2006; MESA-ARANGO *et al.*, 2002). Estes estudos demonstraram grande variabilidade genética
93 entre isolados de uma mesma região geográfica assim como, entre regiões. Recentemente, a
94 espécie *S. schenckii* foi dividida em três novas espécies de acordo com características
95 morfofisiológicas e geográficas, sendo denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*
96 (MARIMON *et al.*, 2007). Tendo em vista os diferentes achados moleculares a respeito do *S.*
97 *schenckii* e a escassez de estudos morfológicos visando a comparação de isolados clínicos e
98 do ambiente, este estudo objetivou avaliar as características fenotípicas e a termotolerância de

isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose humana, felina e canina, e de isolados do ambiente.

Materiais e Métodos

Foram utilizados 36 isolados de *S. schenckii* provenientes de casos clínicos de esporotricose em gatos (22), cães (7) e humanos (7), quatro isolados do ambiente e duas cepas de referência (IOC1226 e IOC1113) provenientes de esporotricose humana obtidas do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), totalizando 42 isolados. Para reativação dos isolados, estes foram repicados em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, sendo as placas incubadas a 25°C por sete dias. Posteriormente, as colônias obtidas foram subcultivadas para o estudo fenotípico e de termotolerância.

Para o estudo fenotípico, os isolados foram semeados, em duplicata, em placas de Petri contendo agar Sabouraud Dextrose acrescido de cloranfenicol (SDA)⁴, agar batata (PDA)⁵ e agar lactrimel (LCA)⁶. As placas foram incubadas a 25°C e 35°C durante 21 dias, sendo as colônias avaliadas a cada sete dias quanto à velocidade de crescimento e às características macroscópicas das colônias como coloração, aspecto, topografia e pigmentação. A avaliação microscópica dos isolados de *S. schenckii* foi realizada através de microcultivo em lâmina contendo PDA, incubado a 25°C por sete dias. Após a incubação foi analisada a forma e coloração dos conídios, quantificação de conídios demáceos e de formas como “margaridas” em graus + (escasso), ++ (moderado) e +++ (intenso).

A conversão da fase filamentosa para leveduriforme foi realizada através da semeadura dos isolados de *S. schenckii* em caldo infusão cérebro-coração (BHI) com incubação em estufa shaker a 37°C por sete dias, sob agitação constante de 100 ciclos/minuto. Após o período de incubação foi realizado exame direto através de esfregaço e coloração de

⁴ SDA – Acumedia, Michigan, USA

⁵ PDA – Acumedia, Michigan, USA

⁶ Lactrimel - 20g farinha de trigo, 7g mel, 20g leite em pó integral, 20g agar-agar, 1000 mL de água destilada

Gram para verificar a presença de células leveduriformes. Para avaliação da termotolerância, os isolados foram subcultivados em SDA acrescido de extrato de levedura 1% e incubados a 41°C por sete dias, sendo realizado também, o exame microscópico das colônias.

Resultados

Os 42 isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* utilizados para os estudos fenotípicos e de termotolerância pertenciam a cinco municípios da região sul do Rio Grande do Sul sendo eles: Rio Grande, Pelotas, Capão do Leão, Pedro Osório e Canguçu, com exceção de dois isolados do Instituto Oswaldo Cruz (IOC-FIOCRUZ, RS).

O estudo da macromorfologia dos isolados de *S. schenckii* demonstrou o crescimento de colônias com diferentes colorações, topografia e textura nos meios de cultivo utilizados. Além disso, verificaram-se diferenças na velocidade de crescimento das colônias com relação à temperatura e meio de cultivo (Tabela 1). O crescimento com relação à origem dos isolados demonstrou diferença estatística entre as cepas de referência e os isolados clínicos e do ambiente ($p=0,026$), com o crescimento mais lento das cepas de referência. Com relação aos meios de cultivo, observou-se crescimento mais lento das colônias em ágar lactrimel quando comparado ao SDA e PDA. A coloração das colônias variou de creme a marrom-escura, sendo que no agar Lactrimel houve predominância de colônias marrom-escuras de textura aveludada e de topografia plana, enquanto que no PDA e SDA, as colônias apresentaram colorações creme-acinzentadas ou creme-acastanhadas de textura aveludada ou membranosa e de topografia elevada ou rugosa (Fig 1).

O estudo da micromorfologia dos isolados demonstrou diferentes graus de pigmentação dos conídios e formas como “margarida”, sendo verificada uma relação inversa na quantidade destes. De modo geral, foram observadas hifas finas, septadas, hialinas e ramificadas com conidióforos delgados, conídios hialinos e pigmentados de formato esférico. Quando comparados os isolados provenientes de casos clínicos em felinos com os outros

isolados observou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,0003$) com relação à quantidade de conídios pigmentados. Isolados de felinos apresentaram grau +++ para conídios demáceos enquanto que os isolados de humanos e caninos apresentaram grau + e ++. Com relação à quantidade de formas como “margaridas” observou-se diferença estatística ($p=0,0091$) entre isolados de felinos e isolados de outras origens com nenhuma amostra de felino apresentando esta característica (grau +++) (Fig 2).

Em todos os isolados foi confirmado o dimorfismo, com a conversão da fase filamentosa para leveduriforme. Microscopicamente, as leveduras de *S. schenckii* eram caracterizadas por células ovais a alongadas com brotamento unipolar. O estudo da termotolerância demonstrou 11/42 (26,2%) dos isolados com capacidade de crescer a 41°C, dos quais seis eram isolados provenientes de felinos, dois de humanos, um de canino e dois do ambiente. Nenhuma cepa de referência cresceu nesta temperatura. As colônias apresentavam coloração creme, textura cremosa e topografia plana a rugosa. Na avaliação da relação entre presença de conídios pigmentados e termotolerância não foi observada diferença estatística, embora 54,5% dos isolados termotolerantes eram provenientes de casos de esporotricose felina.

Discussão

Os resultados da morfologia macroscópica dos 42 isolados de *S. schenckii* demonstraram diferenças na textura, topografia e coloração entre os meios de cultivo utilizados. Verificou-se que cultivos realizados em agar Sabouraud dextrose e agar batata apresentaram características similares como colônias creme-acinzentada ou creme-acastanhada, membranosas ou aveludadas, elevadas e rugosas similares as descritas na literatura (LOPES *et al.*, 2006; MESA-ARANGO *et al.*, 2002). Por outro lado, o crescimento em agar lactrimel demonstrou colônias planas, aveludadas e enegrecidas. Os resultados encontrados no presente estudo diferiram dos descritos por MARIMON *et al.* (2007), os quais

observaram colônias laranja-pálida e laranja-acinzentada utilizando como meios de cultivo o agar fubá, agar batata e agar aveia.

A análise micromorfológica dos 42 isolados de *S. schenckii* demonstrou relação inversa entre grau de pigmentação de conídios e formas de “margaridas”. Assim, foi possível observar que isolados de felinos apresentaram maior grau de pigmentação dos conídios, o que está diretamente relacionado com a presença de melanina, a qual é um importante fator de patogenicidade do fungo (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* demonstraram maior poder de invasão e disseminação tecidual de isolados pigmentados do que isolados mutante-albinos (MADRID *et al.*, 2010a; NOBRE *et al.*, 2008). Pesquisas a respeito da melanização de isolados brasileiros de *S. schenckii* demonstraram uma maior habilidade de produção de melanina em meio mínimo e em meio L-DOPA (dihidroxifenilalanina) do que em agar Sabouraud dextrose assim como, em temperatura de 30°C do que a 37°C (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2009). O fungo *S. schenckii* produz melanina DHN (dihidroxi-naftaleno) tanto na fase filamentosa quanto leveduriforme, a qual tem sido considerada um dos principais fatores de patogenicidade do fungo (MADRID *et al.*, 2010a; MORRIS-JONES *et al.*, 2002; NOBRE *et al.*, 2004; ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000). Entretanto, ALMEIDA-PAES *et al.* (2009) demonstraram a produção *in vitro* de melanina por isolados de *S. schenckii* a partir de compostos fenólicos, sugerindo assim, a produção de melanina DOPA.

Os resultados obtidos no presente estudo diferem daqueles demonstrados por MENDONZA *et al.* (2005), os quais realizaram estudo morfológico de um isolado clínico de *S. schenckii* de esporotricose humana na Venezuela, utilizando agar Sabouraud e observaram conídios ovais a alongados. Entretanto, no presente estudo a análise micromorfológica foi realizada em agar batata e com isolados clínicos de *S. schenckii* provenientes de animais, assim como, isolados do ambiente. Os resultados obtidos na avaliação micromorfológica, realizada em agar batata, se assemelham ao estudo realizado por MARIMON *et al.* (2007),

embora estes autores tenham utilizado agar fubá para o estudo microscópico de 127 isolados de *S. schenckii* provenientes de diferentes países. Estes autores sugeriram três novas espécies sendo *S. globosa*, *S. brasiliensis* e *S. mexicana*, na qual todos os isolados provenientes do Brasil demonstraram características semelhantes como a presença de conídios sésseis globosos de coloração marrom a marrom escura sendo denominados de *S. brasiliensis*. DIXON *et al.* (1991) ao avaliarem as características microscópicas de isolados clínicos e do ambiente provenientes dos Estados Unidos, observaram diferenças no arranjo, formato e tamanho dos conídios. Os achados obtidos por estes autores com relação aos isolados do ambiente são semelhantes aos obtidos no presente estudo, sendo caracterizados pela presença massiva de conídios esféricos ao redor das hifas. Além disso, os achados com relação aos isolados clínicos também foram semelhantes embora os isolados de esporotricose felina tenham demonstrado maior número de conídios ao redor das hifas do que formas semelhantes a “margaridas”.

Um dos principais fatores de patogenicidade do *S. schenckii* é a termotolerância, a qual está relacionada principalmente com a disseminação fúngica para outros órgãos (KNOW-CHUNG 1979; TACHIBANA *et al.*, 2001). No presente estudo, 26,2% (11/42) dos isolados apresentaram capacidade de crescer a 41°C, sendo 54,5% provenientes de casos clínicos de esporotricose em felinos. Esta espécie desenvolve formas clínicas mais graves do que outras, com lesões cutâneas extensas e disseminadas (MADRID *et al.*, 2010b). Esses resultados se assemelham aos descritos por FERNANDES *et al.* (2009) e MESA-ARANGO *et al.* (2002) que testaram a termotolerância a 35°C e 37°C e obtiveram maior percentual de inibição do crescimento de isolados provenientes de formas cutânea fixa de esporotricose em humanos do que em isolados de outras formas cutâneas assim como, de esporotricose em animais. Entretanto, os resultados obtidos no presente estudo diferem das pesquisas realizadas por MARIMON *et al.* (2007) e GHOSH *et al.* (2002), os quais não obtiveram crescimento a 40°C de

nenhum isolado brasileiro e indiano de *S. schenckii*. No entanto, estes autores utilizaram agar batata para avaliar o crescimento a 40°C enquanto que no presente estudo, a avaliação do crescimento a 41°C foi realizada em agar Sabouraud dextrose acrescido de extrato de levedura 1%. A termotolerância do *S. schenckii* é um dos fatores que determinam o desenvolvimento de formas clínicas extracutâneas e sistêmicas. Isolados de lesões cutâneas normalmente não são capazes de crescer em temperatura de 37°C, entretanto, alguns isolados conseguem se multiplicar nesta temperatura, podendo desenvolver a doença na forma sistêmica ou extracutânea (TACHIBANA *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos demonstraram que isolados clínicos de esporotricose linfocutânea e extracutânea foram capazes de causar a forma sistêmica da doença, sendo considerados termotolerantes (KNOW-CHUNG, 1979).

Tendo em vista as diferenças fenotípicas e de termotolerância entre isolados clínicos de esporotricose em felinos e isolados clínicos provenientes de humanos e cães observadas no presente estudo e a necessidade de realização de estudos fisiológicos e moleculares para determinação da espécie conforme descrito por MARIMON *et al.* (2007), neste estudo não foi utilizada a nomenclatura proposta por estes autores. Dessa forma, não foi possível afirmar que os isolados do sul do Brasil utilizados podem ser classificados como *S. brasiliensis*. Além disso, a maioria dos estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares com isolados de *S. schenckii* são provenientes de casos de esporotricose em humanos, o que difere do presente estudo que é essencialmente com isolados originados de casos clínicos de esporotricose em animais. Dessa forma, estudos moleculares estão sendo realizados com a finalidade de compreender as diferenças morfológicas observadas e relacioná-las com as formas clínicas, origem do isolado e suscetibilidade a antifúngicos e extratos vegetais.

Nossos resultados demonstram diferenças morfológicas entre isolados clínicos e do ambiente de *S. schenckii* de uma mesma região e uma maior probabilidade de

desenvolvimento de formas disseminadas e sistêmicas por isolados provenientes de casos de esporotricose felina devido à termotolerância.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Processo n. 550083/2009-0 pelo financiamento desta pesquisa e à Tatiane Barbosa pelo auxílio técnico.

Referências

- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*, v.11, p.554-562, 2009.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S.R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiology and Infection*, v.136, p.1192–1196, 2008.
- DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E.; COLES, F.B. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.6, p.1106-1113, 1991.
- FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; AMARAL, C.C.; SASAKI, A.A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z.P. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. *The Open Mycology Journal*, v.3, p.48-58, 2009.

- 269 HOLECHECK, S.; CASQUERO, C.J.; ZURITA, M.S.; GUEVARA, C.J.; MONTOYA, P.Y.
 270 Variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas em Abancay, Perú. *Revista*
 271 *Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, v.21, n.2, p.87-91, 2004.
- 272 GHOSH, A.; MAITY, P.K.; HEMASHETTAR, B.M.; SHARMA, V.K.; CHAKRABARTI A.
 273 Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses*, v.45, p.449-454, 2002.
- 274 KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed
 275 cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. *Journal Infection Disease*, v.139,
 276 p.424-431, 1979.
- 277 KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes,
 278 virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clinical Microbiology*
 279 *Infection*, v.12, n.11, p.1077-1081, 2006.
- 280 LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and
 281 Sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.78, n.2, p.293-308, 2006.
- 282 MADRID I.M., MATTEI A.S., XAVIER M.O., GUIM, T.N.; FERNANDES, C.G.; NOBRE,
 283 M.O.; MEIRELES, M.C.A. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis.
 284 *Microbes and Infection*, v.1, p.:162-165, 2010a.
- 285 MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.A.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.
 286 Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic
 287 and therapeutic aspects. *Zoonoses and Public Health*, v.57, p.151-154, 2010b.
- 288 MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J.
 289 *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* species of clinical
 290 interest. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, p.3198-3206, 2007.
- 291 MENDONZA, M.; HUNG, M.B.; DÍAZ, A.M.; ZAMBRANO, E.A.; DÍAZ, E.;
 292 ALBORNOZ, M.C. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse
 293 culture media. *Journal de Mycologie Médicale*, v.15, p.127-135, 2005.

MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PEREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZUNIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.40, n.8, p.3004–3011, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ B.L., AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infection and Immunity*, v.71, n.7, p.4026-4033, 2003.

NOBRE M.O., ANTUNES T.A., MEIRELES M.C.A., FERREIRO L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. *Acta Scient Veterin* 2004; 32(2): 119-123.

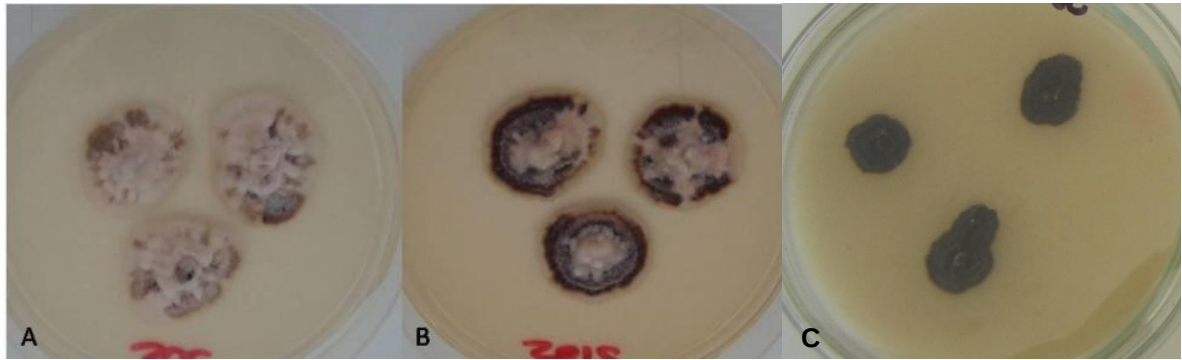
NOBRE, M.O.; MADRID, I.M.; ANTUNES, T.A.; MARTINS, A.A.; FERNANDES, C.G.; MATTEI, A.S.; SPANAMBERG, A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. *Journal Mycologie Médicale*, v.18, p.191-197, 2008.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*, v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. *Medical Mycology*, v.39, p.295-298, 2001.

Tabela 1. Média de crescimento dos isolados de *S. schenckii* de diferentes origens em SDA, PDA e lactrimel a 25°C e 35°C

Temperatura	Tempo	Origem	Sb+Cl (cm)	PDA (cm)	Lactrimel (cm)
25°C	7 dias	Cão	0,93	1,14	0,96
		Gato	1,06	1,13	0,87
		Humano	9,3	1,11	0,89
		Ambiente	0,82	1,07	0,77
		IOC	0,77	0,83	0,55
	14 dias	Cão	1,77	2,08	1,89
		Gato	1,99	2	1,62
		Humano	1,81	2,19	1,92
		Ambiente	1,64	1,97	1,26
		IOC	1,6	1,43	1,17
	21 dias	Cão	2,6	2,68	2,65
		Gato	2,67	2,6	2,32
		Humano	2,44	2,63	2,55
		Ambiente	2,17	2,63	2,14
		IOC	1,98	2,01	1,88
35°C	7 dias	Cão	1,13	1,2	0,85
		Gato	0,9	0,95	0,75
		Humano	1,22	1,26	0,74
		Ambiente	1,11	0,97	0,79
		IOC	1,03	0,96	0,53
	14 dias	Cão	1,67	1,88	1,49
		Gato	1,48	1,67	1,33
		Humano	1,7	1,92	1,52
		Ambiente	1,59	1,6	1,46
		IOC	1,35	1,33	1,22
	21 dias	Cão	2,33	2,48	2,2
		Gato	2,39	2,44	2,21
		Humano	2,5	2,46	2,11
		Ambiente	2,24	2,26	2
		IOC	1,68	1,85	1,7



348

Fig 1. Macromorfologia de colônias filamentosas de *S. schenckii* obtidas nos meios de cultivo Sb+Cl (a), PDA (b) e Lactrimel (c) aos 14 dias de incubação a 35°C.

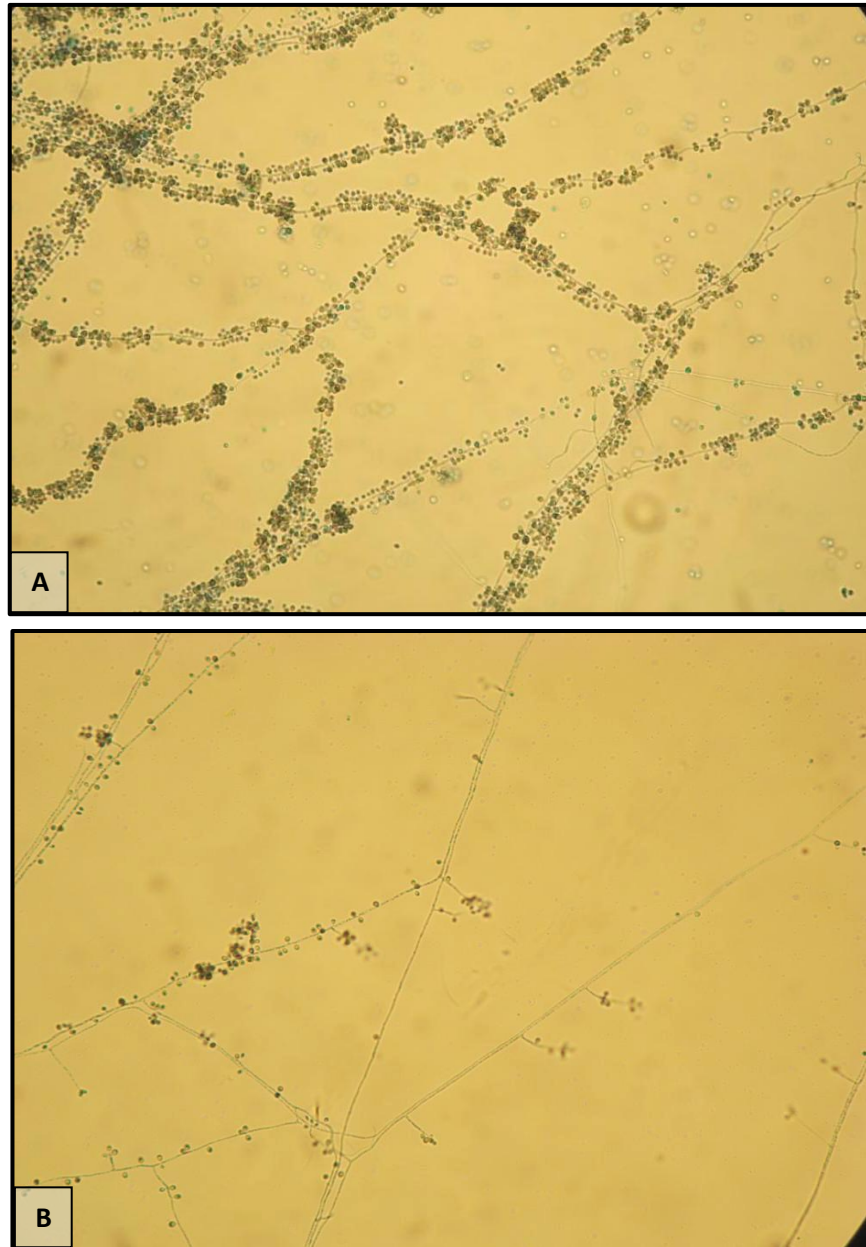


Fig 2. Numerosos conídios demáceos ao redor das hifas em isolado de *S. schenckii* proveniente de esporotricose felina (a) e presença de "margaridas" em isolado de esporotricose canina (b).

ARTIGO 4

Ultrastructural study of the mycelial phase of *Sporothrix schenckii* clinical isolates
obtained of feline, canine and human sporotrichosis

*Aceito para publicação em outubro de 2010 no **Brazilian Journal of Microbiology***
[BJM886]

[BJM] Editorial Review of Article - Accept

Quarta-feira, 6 de Outubro de 2010 13:25

De:

"Silvio Arruda Vasconcellos" <savasco@usp.br>

[Adicionar remetente à lista de contatos](#)**Para:**

"Isabel Madrid" <imadrid_rs@yahoo.com.br>

Cc:

imadrid_rs@yahoo.com.br, antonella.mattei@hotmail.com, gmpsoares@gmail.com, mo-nobre@uol.com.br, meireles@ufpel.edu.br

Dr. Isabel:

We have now completed the review of your submission "BJM-886 - Ultrastructural study of the mycelial phase of *Sporothrix schenckii* clinical isolates obtained of feline, canine and human sporotrichosis." Our decision is to accept.

Additional comments on the paper, based on the editorial and peer review, are found by logging in to the journal web site:

Submission URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/bjm/author/submission/19629>

Username: imadrid

If you have any questions, please contact me.

Brazilian Journal of Microbiology

**Ultrastructural study of the mycelial phase of *Sporothrix schenckii* clinical isolates
obtained of feline, canine and human sporotrichosis**

*Estudo ultraestrutural da fase micelial de isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* obtidos de
esporotricose felina, canina e humana*

Isabel Martins Madrid*, Antonella Souza Mattei, Mauro Pereira Soares, Márcia de Oliveira
Nobre, Mário Carlos Araújo Meireles

Laboratory of Infectious Diseases, Department of Veterinary Preventive, Faculty of
Veterinary, Federal University of Pelotas, Brazil

**Corresponding author*

Laboratory of Infectious Diseases, Department of Veterinary Preventive, Faculty of
Veterinary, Brazil. Campus universitário s/n, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil.

Tel +55(53) 3275.7312, fax +55(53)3275.9004, imadrid_rs@yahoo.com.br

ABSTRACT

Using transmission electron microscopy, we studied the presence of melanin and cell wall thickness of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from cats, dogs and humans as compared to reference strains. We detected differences regarding presence of the melanin among the clinical isolates of *S. schenckii* and a correlation between presence of melanin and cell wall thickness.

Key words: conidial, melanin, *Sporothrix schenckii*, Transmission Electron Microscopy

RESUMO

Através de microscopia eletrônica de transmissão foi estudada a presença de melanina e parede celular de isolados de *Sporothrix schenckii* obtidos de gatos, cães, humanos e cepas de referência. Este estudo demonstrou diferenças na presença de melanina entre os isolados clínicos e correlação entre melanina e espessura da parede celular.

Palavras-chave: conídios, melanina, *Sporothrix schenckii*, Microscopia Eletrônica de Transmissão

Sporothrix schenckii is a dimorphic geophilic fungus that causes subcutaneous infection in animals and humans. Classically, infection is caused by traumatic inoculation of soil, plants or organic matter contaminated with the fungus into the body. The infection is normally restricted to lymphatic or fixed cutaneous form in humans and canines; whereas, felines frequently develop the systemic and/or disseminated cutaneous form (15). Various pathogenicity factors such as thermotolerance, extracellular enzymes, composition of the cell wall and presence or absence of melanin are involved in the virulence of this fungus (5).

Melanins are dark brown to black pigments formed by the oxidative polymerization of phenolic and/or indolic compounds and are generally insoluble in water, acids and common organic solvents (1). The presence of melanins has been reported in various pathogenic fungi including *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida albicans*, *Penicillium marneffeii*, *Fonsecaea pedrosoi*, *Histoplasma capsulatum* and *Blastomyces dermatitides* (8). Studies with the fungus *Sporothrix schenckii* have demonstrated the presence of the 1,8-dihydroxynaphthalene melanin pentaketide pathway in the mycelial and yeast phases (10,14).

The presence of melanin in the cell walls of various fungi may increase their survival in the environment by providing protection against ultraviolet radiation, desiccation and extreme temperatures. During infection, melanins interfere with the immune response, complement activation and activity of antifungal drugs (2,6,13). Due to the contribution of melanins to fungal virulence, this work evaluated the presence of melanin granules and differences regarding cell wall thickness in clinical isolates of *Sporothrix schenckii*.

Nine *Sporothrix schenckii* clinical isolates from feline, canine and human cases of sporotrichosis were utilized in this study. Two reference strains obtained from Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil), IOC1113 and IOC1226, were also used. The isolates were maintained in the Laboratory of Infectious Diseases of the School of Veterinary Medicine at Federal University of Pelotas.

All isolates were inoculated on potato dextrose agar and incubated at 25°C for seven days. At the end of the incubation period, samples of *S. schenckii* cultures were fixed with

2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in cacodylate buffer, postfixed with 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer, dehydrated in a graded ethanol series (30, 50, 70, 90 and 95%) and embedded in Epon. Thick sections were stained with methylene blue and selected thin sections were stained with lead citrate and uranyl acetate. The sections were examined with a Zeiss EM 109 transmission electron microscope at 80 kilovolts.

The images obtained by transmission electron microscopy (TEM) were used to determine if there were ultrastructural differences between the cell walls of the clinical isolates of *S. schenckii* obtained from cats, dogs, humans and the two reference strains. The occurrence of melanin was qualitatively evaluated as "absent" or "present". Twenty cells of each strain were measured using Adobe Photoshop 7.0. Differences in cell wall thickness were statistically evaluated with the Tukey's test using the program Statistix 8.0.

TEM demonstrated various degrees of difference in melanin content and cell wall thickness between *Sporothrix schenckii* isolates obtained from the canine, feline and human clinical cases of sporotrichosis (Table 1). Melanin was detected as electron-dense granules distributed around the cell walls of *S. schenckii* conidia. The fungal cells were classified into two categories: (1) cells with absence of melanin granules and (2) cells with presence of melanin granules (Fig 1). Analyses of the cell walls revealed that wall thickness ranged from 38.1 to 142.86 nm in cells devoid of melanin (category 1) and from 63.49 to 250.79 nm in cells in which melanin was present (category 2). Twenty cells from each sample were analyzed. Significant differences were found among the reference strains and the isolates obtained from dogs, cats and humans, with a p value < 0.001 as assessed by the Tukey test (Table 2).

Fungal cells exhibited oval, round or pear shapes and variable sizes. The internal structures of the cells were similar, independent of the presence or absence of melanin granules.

The fungus *Sporothrix schenckii* is found in the form of hyphae and conidia in soil rich in decaying vegetation, sphagnum moss, grass and bark of trees. The survival of this fungus in the environment is determined by various factors, including the presence of melanin in the

cell wall. This pigment is not essential for fungal growth and development, but can contribute to virulence of the pathogen (1,2). Melanized *S. schenckii* cells have been shown to be less susceptible to death induced by ionizing irradiation or reactive oxygen and nitrogen species (14). In this work, we studied clinical isolates of *S. schenckii* with and without melanin around of the conidial cell wall. All isolates derived from canine sporotrichosis contained melanin granules; whereas, only one of the feline isolates and one of the human isolates exhibited this characteristic.

S. schenckii is known to produce dihydroxynaphthalene melanin by the pentaketide pathway. In vitro studies have shown that melanized cells are more resistant to phagocytosis and death caused by human monocytes or murine macrophages than mutant albino cells (14). In addition, in vivo studies have demonstrated differences in virulence between pigmented and albino mutant isolates of *S. schenckii* (12). Absence of electron dense granules has been demonstrated in a mutant albino strain of *S. schenckii* produced by means of exposition to UV radiation (300ergs/mm²); conversely, the wild-type strain did exhibit granules in the external cell wall (11). Other ultrastructural studies on *Sporothrix schenckii* failed to detect a melanin layer in the external cell wall but found differences in cell wall thickness between the mycelial and yeast phases (3,4,7). In the present study, the thickness of the cell wall of isolates devoid of melanin granules was smaller than that of isolates in which melanin was present. Therefore, higher cell wall thickness is directly connected to the presence of melanin. Consequently, presence of melanin and cell wall thickness interfere with the action of phagocytes and of antimicrobials. The results of the present study are in agreement with those of Mandal *et al* (9), who noticed that presence of melanin was directly proportional to the thickness of the cell wall in *Cryptococcus neoformans* isolates.

The research of virulence factors of the mycelia phase is important because the infection occurs by traumatic inoculation of conidia into the body (15). Our results demonstrate differences regarding presence melanin among *Sporothrix schenckii* isolates

obtained from canine, feline and human cases of sporotrichosis and also a correlation between presence of melanin and cell wall thickness.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by financing this research. To Simone Silveira da Silva for the technical support.

REFERENCES

1. Bell, A.A.; Wheeler, M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annual Rev Phytopathol* 24, 411-451.
2. Butler, M.J.; Day, A.W. (1998). Fungal melanins: a review. *Can J Microbiol* 44, 1115-1136.
3. Findlay, G.H.; Vismer, H.F.; Liebenberg, N.W. (1979). Spore ultrastructure in *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*, 69, 167-170.
4. Garrison, R.G.; Boyd, K.S.; Mariat, F. (1975). Ultrastructural studies of the mycelium-to-yeast transformation of *Sporothrix schenckii*. *J Bact* 124, 959-968.
5. Hogan, L.H.; Klein, B.S.; Levitz, S.M. (1996). Virulence factors of medically important fungi. *Clin Microbiol Rev* 9(4), 469-488.
6. Jacobson, E.S. (2000). Pathogenic roles for fungal melanins. *Clin Microbiol Rev* 13, 708-717.
7. Lane, J.W.; Garrison, R.G.; Field, M.F. (1969). Ultrastructural studies in the yeastlike and mycelia phases of *Spororichum schenckii*. *J Bact* 100, 1010-1019.
8. Langfelder, K.; Streibel, M.; Jahn, B.; Haase, G.; Brakhage, A.A. (2003). Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biol* 38, 143-158.
9. Mandal, P.; Roy, T.S.; Das, T.K.; Banerjee, U.; Xess, I.; Nosanchuk, J.D. (2007). Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing

Cryptococcus neoformans clinical isolates from India: na electron microscopic study.
Braz J Microb 38, 662-666.

10. Morris-Jones, R.; Youngchim, S.; Gomez, B.L.; Aisen, P.; Hay, R.J.; Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A.; Hamilton, A.J. (2003). Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. *Infec Immun*, 71, 4026-4033.
11. Nobre, M.O.; Antunes, T.A.; Meireles, M.C.A.; Ferreira, L. (2004). Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. *Acta Scient Veterinar* 32(2), 119-123.
12. Nobre, M.O.; Madrid, I.M.; Antunes, T.A.; Martins, A.A.; Fernandes, C.G.; Mattei, A.S.; Spanemberg, A.; Meireles, M.C.A.; Ferreira L. (2008). Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. *J Mycologie Médicale* 18, 191-197.
13. Nosanchuk, J.D.; Casadevall, A. (2003). The contribution of melanin to microbial pathogenesis. *Cell Microbiol* 5, 203-223.
14. 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, 3696-3703.
15. Schubach, T.M.; Schubach, A.; Reis, R.S.; Cuzzi-Maya, T.; Blanco, T.C.M.; Monteiro, D.F.; Barros, B.M.; Brustein, R.; Zancoppe-Oliveira, R.M.; Fialho-Monteiro, P.C.F.; Wanke, B. (2001). *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia* 153, 83–86.

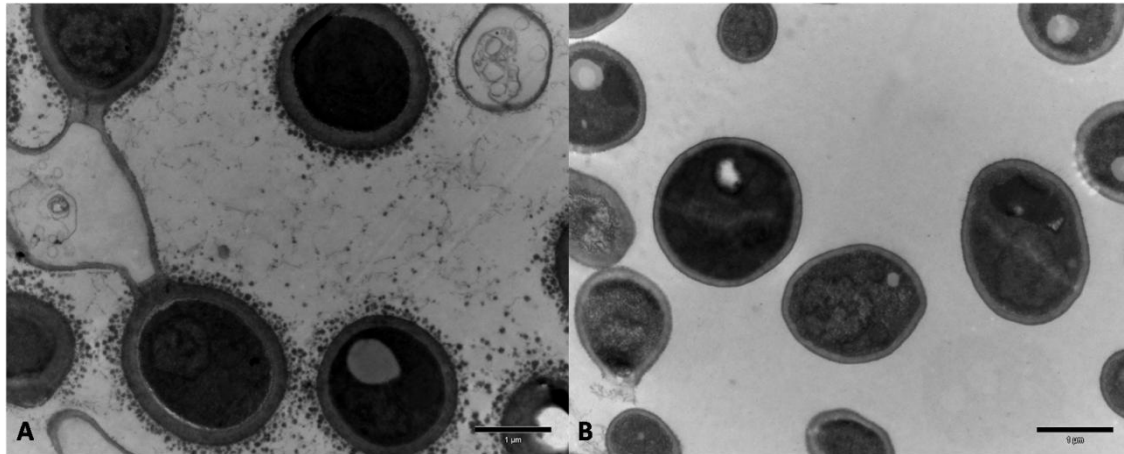


Figure 1. TEM images of *S. schenckii* cells with (a) and without (b) melanin granules. Scale bar: 1 μ m

213 Table 1. Analyses of the melanin layer and cell wall thickness of clinical isolates of the
 214 *Sporothrix schenckii*.

Samples	Origin	Score	Mean $\pm$ SD(nm)
IOC1226	Reference strain	1 [†]	56.98 $\pm$ 5.09
IOC1113	Reference strain	1	70.79 $\pm$ 21.65
S08-06	Cat	2 [‡]	141.90 $\pm$ 33.56
S30-09	Cat	1	91.90 $\pm$ 24.81
S34-09	Cat	1	115.87 $\pm$ 11.58
H1	Human	2	168.25 $\pm$ 23.57
H2	Human	1	109.36 $\pm$ 22.17
H4	Human	1	98.25 $\pm$ 24.45
S02-05	Dog	2	114.60 $\pm$ 20.34
S10-06	Dog	2	169.05 $\pm$ 26.71
S11-06	Dog	2	160.16 $\pm$ 50.30

215 [†]1 absence, [‡]2 presence

216

217

218

219

220

221

222

223

224

225

226

227

228 Table 2. The differences in the cell wall thickness among isolates of *S. schenckii*.

Clinical Isolates	Mean $\pm$ SD(nm)
Dog	147.94 $\pm$ 41.91 ^A
Human	125.29 $\pm$ 38.59 ^B
Reference strain	63.89 $\pm$ 17.03 ^C
Cat	116.56 $\pm$ 32.07 ^B

229 P<0,0001

ARTIGO 5

Inhibitory effect of sodium hypochlorite and chlorexidine digluconate in clinical
isolates of *Sporothrix schenckii*

*Artigo enviado para a revista **Mycoses***

(MYC-OA-2011-040)

Inhibitory effect of sodium hypochlorite and clorexidine digluconate in clinical isolates of *Sporothrix schenckii*

Isabel Martins Madrid^{1*}, Antonella Souza Mattei², Rosema Santin², Marlete Brum Cleff¹, Mário Carlos Araújo Meireles¹

¹ Laboratory of Infectious Diseases, Federal University of Pelotas, Brazil

² Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

Antifungal activity of disinfectants

Key-words: susceptibility tests; dimorphic fungus; antifungal activity

*Corresponding author. MSc, Departamen of Veterinary Preventive, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Campus Universitário s/n, 96010-900, RS, Brazil. Tel: +55 53 9911.2744; Fax: +55 53 3275. 7644; E-mail: imadrid_rs@yahoo.com.br

ABSTRACT

Sporothrix schenckii isolates from clinical cases of canine, feline and human sporotrichosis and from the environment were cultured on potato dextrose agar at 35 °C for seven days. Subsequently, fungal structures were removed from the medium and the inoculum was adjusted to a final cell density of 1 to 5 x 10⁶ CFU mL⁻¹. Antifungal evaluations of 4 % sodium hypochlorite and 6.6 % chlorexidine digluconate were performed by the broth microdilution, agar diffusion and direct exposure techniques. The minimal inhibitory concentration (MIC) was smaller than 8.3 µl/ml for chlorexidine digluconate and 80 to 40 µl/ml for sodium hypochlorite. Inhibition zones were not found in agar diffusion for sodium hypochlorite, and zones averaging 1.9 mm were found for chlorexidine digluconate. In the direct exposure test sodium hypochlorite demonstrated best performance at 20 min contact, as chlorexidine digluconate presented minor antimicrobial activity.

1. INTRODUCTION

Sporothrix schenckii is the causative agent of sporotrichosis in humans and animals. The mycelial phase of this fungus is found in the environment associated to soil, organic matter, sphagnum moss, wood, thorns and plants which are thought to be important infection sources [1, 2]. The increase in this fungal infection occurrence in the last years is a warning on the importance of correct environment disinfection. The choice of broad action specter, odorless, low cost and low toxicity products with reduced organic matter interference is thus fundamental to significantly reduce the population of the fungal pathogen in the environment [3].

Fungi are considered microorganisms that show an intermediary resistance to disinfectants; bacterial spores, on the other hand, show great resistance, and viruses/prions, minor resistance. So chemical agents such as 1 % sodium hypochlorite, 70 % ethanol, phenolic and chlorine compounds are considered efficacious [4]. Products most often used in hospital and household environment disinfection are compounds which contain chlorexidine and sodium hypochlorite [5]. Sodium hypochlorite is a halogen compound that acts on essential enzymes to microbial metabolism, resulting in cell death. Chlorexidine is a biguanide that acts on the membrane cell [6, 7]. Evaluation of the antifungal activity of chemicals has been done by different methods. A standard protocol has not been established as yet [8, 9, 10, 11]. The techniques used in Brazil are in agreement with those of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [12] and the National Health Surveillance Agency (Anvisa). Guidelines for bacterial agents, including *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella choleraesuis*, have been standardized and adaptations for evaluation against fungi are required.

Several studies have evaluated the action of disinfectants against a great variety of bacterial species and some yeasts, as *Candida* spp., or mycelial fungus, as *Aspergillus* spp. [3, 5, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17, 18]. However, research involving dimorphic fungi, especially *Sporothrix schenckii*, has not been developed as yet. The aim this study was (i) evaluate the susceptibility of clinical isolates of *Sporothrix schenckii* to sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate; (ii) compare the susceptibility of isolates of different origins; (iii) determine the minimal fungicidal disinfectant concentration against *S. schenckii* and (iv) compare antifungal disinfectant action through the use of different techniques.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Fungal isolates and inoculum

Twelve fungal *Sporothrix schenckii* isolates from clinical cases of canine (3), feline (3) and human (3) sporotrichosis, as well as from the environment (3), were used in this study (Anexo 1). Inoculum of the mycelial phase consisted of conidia and hyphal fragments cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA, Acumedia, Michigan, USA) at 35 °C for seven days. Fungal structures were removed from the surface medium and transferred to sterile tubes containing a 0.9 % saline solution. The inoculum was spectrophotometrically standardized at 70 % transmittance at 530nm at a final cell density of $1 \text{ to } 5 \times 10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$.

2.2 Disinfectants

To perform the in vitro susceptibility tests, sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate were used. The 4% sodium hypochlorite (Indústria Anhembí S/A, São Paulo, Brazil) and 6.6% chlorhexidine digluconate (Chemitec, São Paulo, Brazil) concentrations recommended by manufacturers were evaluated by the direct exposure and agar diffusion tests. Six dilutions that varied from 2 to 0.062 times the

concentration recommended by the disinfectant manufacturers were tested by the broth microdilution test.

2.3 Disc diffusion

This test was performed in accordance with guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), document M51-A, adapted to disinfectants and the dimorphic fungus. Sterilized filter paper discs (Whatman number 1.5 mm diameter) were separately impregnated with the dilution-use of the disinfectants and sterile distilled water (control) 24 h before the technique performance. Subsequently, discs were placed on Sabouraud Dextrose Agar added (Acumedia, Michigan, USA) with chloramphenicol (SDA) previously inoculated with the fungus. The technique was done in duplicate and the plates were incubated at 35 °C for seven days. Antifungal activity was assessed by measuring the diameter of the growth-inhibition zone in millimeters for the test microorganism and comparing it to the control.

2.4 Broth Microdilution

The broth microdilution test was performed in accordance with CLSI guidelines, document M38-A2, adapted to disinfectants. A 100 µl aliquot of the fungal inoculum diluted in RPMI 1640 (1:50) (Sigma Chemical Co, Steinheim, Alemanha) buffered to a pH 7.0 with 0.165 mol l⁻¹ MOPS (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, Brazil) was added to each microdilution well containing 100 µl of the disinfectant previously diluted in RPMI 1640. The microplates were incubated at 35 °C for five days. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) was defined as the lowest disinfectant concentration at which no growth could be seen. To determinate Minimal Fungicidal Concentration (MFC), 10 µl aliquots from each well were spread on SDA Petri dishes and incubated at 25 °C for five days.

2.5 Direct exposure test

In vitro susceptibility in tubes was performed according to protocol as described by Schuch et al (2008) [17]. Four test tubes containing 4 ml of the recommended concentration of each disinfectant were used. Two of them were added with 1 ml sterile distilled water, and the other two with 1 ml UHT milk. The tubes were vigorously shaken on a Vortex mixer; following, 100 µl fungal inoculum was added. At one, two, five and ten minute intervals, 50 µl aliquots were collected and transferred to tubes containing 2.5 ml nutrient broth added with chemical neutralizers. One percent sodium thiosulfate was used to neutralize sodium hypochlorite, and 0.6 % soy lecithin was used to neutralize chlorexidine digluconate; subsequently, a 100 µl aliquot was seeded in triplicate on Petri dishes containing SDA and incubated at 35 °C for five days for obtaining the colony-forming units (CFU) count and calculating the mean.

2.6. Analysis of results

The diffusion test result was obtained from the average of duplicates of each microorganism. For MIC, the average of duplicates from the reciprocal of the lowest dilution where there was inhibition of microbial growth was done. For the direct exposure test, the result was expressed by the average of duplicates in the inhibition index (ii), whose formula is: $ii = 1 - (\log_{10} \text{tratio} + 1)^{-1}$. The analysis of all data was performed by the ANOVA and Tukey tests for comparison of means through the Statistix 6.0 software.

3. RESULTS

3.1. Disc diffusion

Disinfectant evaluation by the diffusion method showed significant differences in antifungal activity among the chemicals tested ($p = 0.000$). chlorexidine digluconate showed 19 mm inhibition zones on average, whereas sodium hypochlorite and

control did not show inhibition zones (Fig. 1). In relation to the origin of *S. schenckii* isolates, significant differences were not found and an average 18 mm zone for feline, 20 mm for canine, 19 mm for human sporotrichosis isolates and 21 mm for environmental isolates were found.

3.2. Broth microdilution

Chlorexidine digluconate showed lower MIC and MFC values than those dilution recommended by the manufacturer for use ($66.7 \mu\text{l ml}^{-1}$) against all fungal isolates. MIC and MFC values for chlorexidine digluconate varied from 4.2 to $8.3 \mu\text{l ml}^{-1}$ for *S. schenckii* environment isolates, and $<4.2 \mu\text{l ml}^{-1}$ for feline, canine and human isolates. MIC and MFC for sodium hypochlorite were smaller than those indicated as the use dilution ($40 \mu\text{l ml}^{-1}$) in five (41.7 %) *S. schenckii* isolates from canine (3), feline (1) and human (1) sporotrichosis clinical cases. However, seven (58.3 %) isolates presented MIC and MFC values over $40 \mu\text{l ml}^{-1}$ (Table 1).

3.3. Direct exposure test

The results of the direct exposure test showed significant differences as to the tested disinfectants ($p = 0.000$) and organic matter presence ($p = 0.000$); significant differences related to the sample origin were not observed. The total fungal load elimination was obtained after 2 min contact with sodium hypochlorite in the absence of organic matter for all isolates. On the other hand, a 60 % reduction in fungal inoculum in the presence of organic matter was only obtained after 20 min contact. In relation to chlorexidine digluconate, antifungal activity was confirmed by 25 % of fungal inoculum decrease after 20 min contact in the absence of organic matter. Antifungal action at the end of contact time was not observed in the presence of organic matter (Fig. 2).

4. DISCUSSION

Sporotrichosis has been recognized worldwide as an important health problem [1, 19]. Thus, concern on the appropriate treatment and disease control has prompted both professionals and researchers aiming to establish procedures to reduce the number of infectant units in the environment. The present study has evaluated the disinfectant susceptibility of clinical and environmental isolates of *S. schenckii* through a variety of techniques. In all techniques used, a significant difference in susceptibility related to the origin of isolates was not found, in spite of the fact that environmental isolates showed higher inhibition values in the agar diffusion and broth microdilution techniques when compared to other isolates. The present study obtained results which were similar to those reached by Menezes et al. [9], with lower MIC and MFC values for chlorhexidine than for sodium hypochlorite. Xavier et al. [18], on evaluating chlorhexidine digluconate action in the presence of *Aspergillus* spp isolates also obtained lower MIC values than those recommended by the manufacturer's. Research with 2 % sodium hypochlorite and 2 % chlorhexidine has been done against *Candida albicans* by using the agar diffusion and direct exposure techniques [8, 20]. The results obtained by the present study were similar to those described by Estrela et al [8] and Waltimo et al [20], with best performance for sodium hypochlorite in the direct exposure test, while chlorhexidine performed best in the agar diffusion test. However, these results were different from those obtained in a study by Pedrini and Margatho [3] upon evaluating the antimicrobial action of sodium hypochlorite and chlorhexidine digluconate by the agar diffusion technique, which in that occasion they obtained satisfactory results for both disinfectants.

The results referring to the chlorhexidine antifungal action in the absence of organic matter obtained in this study differed from those obtained by Schuch et al. [17].

These authors demonstrated total bacterial inactivation after 10 min contact in the absence of organic matter with chlorexidine digluconate. However, they obtained a significant reduction in antibacterial action in the presence of organic matter. Thus, there was a similar antimicrobial activity reduction in the presence of organic matter between the study done by Schuch and colleagues [17] and the present study.

The low sodium hypochlorite action in the diffusion test in this study can be partly explained by the Sabouraud agar acid pH used in the test, corresponding to 5.6 ± 0.2 . The stability of sodium hypochlorite solutions, according to Siqueira [21] is related to pH; thus, the more alkaline the pH, the longer the stability of hypochlorite solutions. Besides, sodium hypochlorite, in the presence of water, results in hypochlorous acid, which contains active chloride and interrupts the metabolic functions of the microbial cell [22]. Consequently, the good antimicrobial activity found in the direct exposure test may be connected with the hypochlorite chemical reaction in the presence of water, resulting in active chloride. On the other hand, the RMPI medium used in the microdilution test has proteic components (organic matter) which interfere in the sodium hypochlorite action. This organic matter interference in antimicrobial activity has been proved in the present study by the results obtained in the direct exposure test.

According to Santos et al. [5], the disinfectant efficacy must be evaluated within 5 – 20 min contact, must consider 10 min for sodium hypochlorite. Thus, a 10 min contact of sodium hypochlorite with the fungal inoculum in the presence of organic matter was found to reduce 40 % of the fungal load on average in this study, while fungal elimination was obtained after 2 min contact in the absence of organic matter. These data emphasize the importance of previous water and soap wash for the purpose of removing dirt that could eventually reduce the sodium hypochlorite action

[5]. Jaenisch et al. [14] and Kich et al. [15], however, did not observe antimicrobial action reduction of 1% sodium hypochlorite in the presence of organic matter. Thus, the results obtained in the present study, which found a 50 % reduction in 4 % sodium hypochlorite antifungal activity in the presence of organic matter, differ from those obtained by the authors mentioned above.

The *in vitro* susceptibility test suffers interference from several factors, including components in the medium used, pH, and exposure time [9, 16]. Therefore, the choice of which test to use to evaluate antifungal action of a specific product depends on the purpose of use of the disinfectant. In this study, the direct exposure test was the one that best reproduced the way of use of disinfectants, when compared to the microdilution and diffusion tests. The results obtained showed the higher antifungal potential of sodium hypochlorite as compared to chlorexidine digluconate both in the presence and absence of organic matter against *Sporothrix schenckii*.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc 550083/2009-0) by financing of this research.

REFERENCES

- [1] Lopes-Bezerra LM, Schubach A, Costa RO. 2006. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *An Acad Bras Cienc*, **78**(2):293-308.
- [2] Madrid IM, Mattei AS, Xavier MO et al. 2010. Role of melanin in the pathogenesis of the sporotrichosis. *Microbes and Infection*, **12**:162-165.

- [3] Pedrini SCB, Margatho LFF. 2003. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. *Arq Inst Biol*, **70**(4):391-395.
- [4] Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJ, Leonard FC. (Ed.), 2005. Desinfecção e outros aspectos do controle de doenças. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. Artmed, Porto Alegre, pp 466-478.
- [5] Santos LR, Neto JFS, Rizzo NN et al. 2007. Eficácia de desinfetantes e anti-sépticos empregados no hospital veterinário da UPF (HV-UPF) Brasil. *Rev Facul ZVA*, **14**(2): 156-164.
- [6] McDonnell G, Russell AD. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev*, **12**(1):147-179.
- [7] Sena NT. 2004. Estudo in vitro da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina usados como substâncias químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única. Piracicaba, Brazil: Universidade Estadual de Campinas.
- [8] Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CRA, Pécora JD, Sousa-Neto MD. 2003. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Braz Dent J*, **14**(1):58-62.
- [9] Menezes MM, Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AOC, Valera MC. 2008. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. *Cienc Odontol Bras*, **11**(2):23-28.
- [10] Pap K, Szilli M, Kiskó G. 2006. Testing antimicrobial efficiency of seven disinfectants against bacteria and fungi with surface test. *Acta Alimentaria*, **35**:163-170.

- [11] Théraud M, Bédouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. 2004. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *J Med Microbiol*, **53**:1013-1018.
- [12] AOAC (1995) *Official method of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 15.ed. Washington, p.65-77.
- [13] Bambace AMJ, Barros EJA, Santos SSF, Jorge AOC. 2003. Eficácia das soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. *Revista Biociências*, **9**(2):73-81.
- [14] Jaenisch FRF, Kuchiishi SS, Coldebella A. 2010. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Ciência Rural*, **40**(2):384-388.
- [15] Kich JD, Borowsky LM, Silva VS, et al. 2004. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos. *Acta Scien Veterin*, **32**(1):33-39.
- [16] Medeiros ES, Santos MV, Pinheiro JW, et al. 2009. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. *Pesq Vet Bras*, **29**(1): 71-75.
- [17] Schuch LFD, Wiest JM, Coimbra HS, Prestes LS, Toni L, Lemos JS. 2008. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. *Ciênc Anim Bras*, **9**(1): 161-169.
- [18] Xavier MO, Madrid IM, Meinerz ARM, et al., 2007. Atividade *in vitro* de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. *Arq Inst Biol*, **74**:49-53.
- [19] Madrid IM, Mattei AS, Martins AA, Nobre MO, Meireles MCA. 2010. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses and Public Health*, **57**:151-154.

- [20] Waltimo TMT, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MPP. 1999. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*, **32**:421-429.
- [21] Siqueira EL. 2000. Estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% p/v. MSc Thesis. São Paulo, Brazil: Universidade de São Paulo.
- [22] Siqueira Junior JF, Batista MM, Fraga RC, Uzeda M. 1998. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*, **24**(6):414-416.

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of *Sporothrix schenckii* isolates against chlorexidine digluconate and sodium hypochlorite

Isolates	ID	Digluconate Chlorexidine (CI:66.7µL/mL)	Sodium Hypochlorite (CI: 40µL/mL)
		MIC/MFC	MIC/MFC
Cats	S2408	≤ 4.2	80
	S3009	≤ 4.2	40
	S4710	≤ 4.2	20
Dogs	S0205	≤ 4.2	20
	S1006	≤ 4.2	10
	S1106	≤ 4.2	10
Humans	H2	≤ 4.2	20
	H4	≤ 4.2	80
	H8	≤ 4.2	80
Environment	A3	8.3	40
	A4	8.3	80
	A5	≤ 4.2	40

ID: Strain number

CI: Concentration recommended by manufacturers

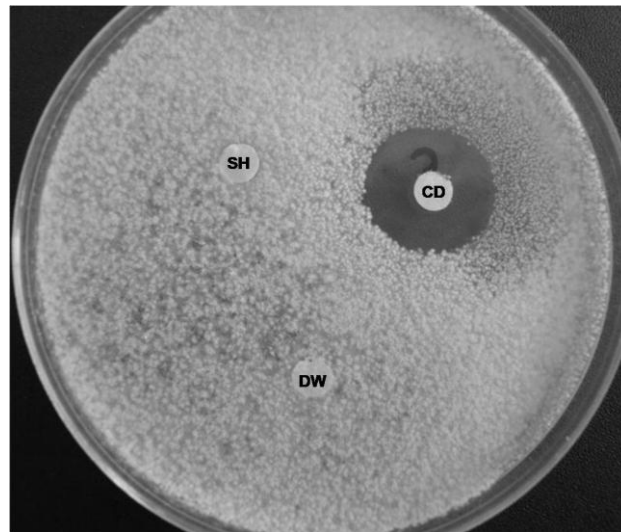


Figure 1. Fungal growth inhibition with chlorexidine digluconate (CD) and absence of inhibition with sodium hypochlorite (SH) and distilled water (DW).

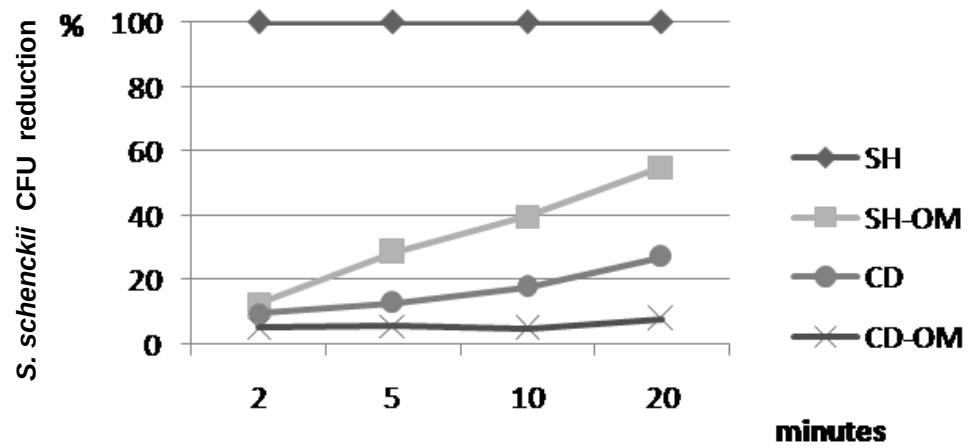


Figure 2. Colony-forming units reduce (mean) of *S. schenckii* against sodium hypochlorite (SH) and chlorhexidine digluconate (CD) in the organic matter (OM) presence and absence.

4 CONCLUSÃO

A esporotricose é uma micose endêmica no sul do Rio Grande do Sul que ocorre em felinos principalmente, na forma cutânea disseminada enquanto que em caninos, a cutânea fixa com acometimento nasal é a mais freqüente. Cães também desenvolvem a forma respiratória sem acometimento cutâneo, sendo que a presença de alterações respiratórias é frequente em animais com esporotricose.

Os achados laboratoriais com relação ao hemograma demonstram que animais com a forma cutânea fixa não apresentam alterações nos valores hematológicos enquanto que aqueles com a forma cutânea disseminada apresentam marcada alteração tanto no leucograma como no eritrograma, sendo caracterizadas por leucocitose por neutrofilia e anemia normocítica e normocrômica.

Os isolados clínicos e de ambiente de *S. schenckii* de uma mesma região apresentam diferenças na morfologia macroscópica e microscópica. Assim, isolados de esporotricose felina apresentam maior número de conídios ao redor das hifas do que formas semelhantes a “margaridas”, as quais são mais freqüentes em isolados de *S. schenckii* de cães e humanos.

A melanina presente em conídios de *S. schenckii* proveniente de casos clínicos de esporotricose felina, canina e humana está diretamente relacionada à espessura da parede celular sendo que isolados de caninos apresentam maior espessura da parede celular do que isolados de felinos e humanos.

O hipoclorito de sódio e digluconato de clorexidina apresentam ação antifúngica frente a isolados de *S. schenckii*. Entretanto, não existem diferenças na suscetibilidade entre isolados na avaliação dos desinfetantes por diferentes técnicas. A técnica de exposição direta foi a que melhor reproduziu as condições reais de uso dos desinfetantes, sendo que o hipoclorito de sódio apresentou maior eficácia nesta técnica tanto na ausência quanto na presença de matéria orgânica enquanto que o digluconato de clorexidina apresentou ação antifúngica nos testes de difusão em agar e microdiluição em caldo.

Referências

- ALBORNOZ, M.B.; MENDONZA, M.; TORRES, E.D. Growth temperatures of isolates of *Sporothrix schenckii* from disseminated and fixed cutaneous lesions of sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.95, p.81-83, 1986.
- ALMEIDA, F.; SAMPAIO, S.A.P.; LACAZ, C.S.; FERNANDES, J.C. Dados estatísticos sobre a esporotricose – análise de 344 casos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.30, p.9-12, 1955.
- ALMEIDA-PAES, R.; FRASES, S.; MONTEIRO, P.C.F.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C.; ZANCOPÉ-OLIVEIRA M.C.; NOSANCHUK, J.D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. **Microbes and Infection**, v.11, p.554-562, 2009.
- AOAC (1995) **Official method of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15.ed. Washington, p.65-77.
- ARENAS, R.; MILLER, D.; CAMPOS-MACIAS, P. Epidemiological data and molecular characterization (mtDNA) of *Sporothrix schenckii* in 13 cases from Mexico. **International Journal of Dermatology**, v.46, p.177–179, 2007.
- APPENZELLER, S.; AMARAL, T.N.; AMSTALDEN, E.M.I.; BERTOLO, M.B.; NETO, J.F.M.; SAMARA, A.M.; FERNANDES, S.R.M. *Sporothrix schenckii* infection presented as monoarthritis: report of two cases and review of the literature. **Clinical Rheumatology**, 2005. DOI 10.1007/s10067-005-0095-z
- BAMBACE, A.M.J.; BARROS, E.J.A.; SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C. Eficácia das soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências**, v.9, n.2, p.73-81, 2003.
- BARONI, F.A.; CAMPOS, S.G.; DIREITO, G.M. Esporotricose em gato (descrição de um caso). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, n.1, p.25-27, 1998.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.P.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S.R. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology Infection**, v.136, p.1192–1196, 2008.
- BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.P.; COLL, J.O.; GREMIÃO, I.D.; WANKE, B.; SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v.27, n.6, p.455-460, 2010.
- BELL, A.A.; WHEELER, M.H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Reviews Phytopathology**, v.24, p.411-451, 1986.

BENCHEKROUN, L.; KABBAJ, L.; AIT EL KADI, M.; GHFIR, B.; MOUSTACHI, A.; SENOUSSE, K.; LYAGOUBI, M. Sporotrichose à *Sporothrix schenckii*: à propos d'une observation. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p.43-45, 2008.

BIONDO AW. Justificativa da proposta do Deputado Ângelo Vanhoni para incluir duas questões no censo IBGE de 2010: Quantos cães você tem em casa? Quantos gatos você tem em casa? Fatos relevantes e seu impacto em saúde pública. <http://www.zoonoses.agrarias.ufpr.br/censo_IBGE.pdf> Acessado em 12.01.2011

BRITO, M.M.S.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MORGADO, F.N.; RAIBOLT, P.S.; SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.P.; SCHÄFFER, G.M.V.; BORBA, C.M. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. **Medical Mycology**, v.45, p.721-729, 2007.

BUTLER, M.J.; DAY, A.W. Fungal melanins: a review. **Canadian Journal Microbiology**, v.44, p.1115-1136, 1998.

CARFACHIA, C.; SASANELLI, M.T.; LIA, R.P.; CAPRARIIS, D.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: Case Report. **Mycopathologia**, v.163, p.75-79, 2007.

CARVALHO, J.; CALDWELL, J.B.; RADFORD, B.L.; FELDMAN, A.R. Feline-transmitted sporotrichosis in the southwestern United States. **The Western Journal of Medicine**, v.154, p.462-465, 1991.

CIVILA, E.S.; BONASSE, J.; CONTI-DÍAZ, I.A.; VIGNALE, A. Importance of the direct examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. **International Journal Dermatology**, v.43, p.808-810, 2004.

COLODEL, M.M.; JARK, P.C.; RAMOS, C.J.R.; MARTINS, V.M.V.; SCHNEIDER, A.F.; PILATI, C. Esporotricose cutânea felina no Estado de Santa Catarina: relato de casos. **Veterinária in Foco**, v.7, n.1, p.18-27, 2009.

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

CROTHERS, S.L.; WHITE, S.D.; IHRKE, P.J.; AFFOLTER, V.K. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **ESVD and ACVD**, v.20, p.249-259, 2009.

CURI, A.L.L.; FÉLIX, S.; AZEVEDO, K.M.L.; ESTRELA, R.; VILLAR, E.G.; SARAC, G. Retinal Granuloma Caused by *Sporothrix schenckii*. **American Journal Ophthalmology**, v.136, p.205-207, 2003.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E.; COLES, F.B. Isolation and Characterization of *Sporothrix schenckii* from Clinical and Environmental Sources Associated with the Largest U.S. Epidemic of Sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.6, p.1106-1113, 1991.

DONADEL, K.W.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C.; AZULAY, R.D. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.68, n.1, p.45-52, 1993.

DUNSTAN, R.W.; LANGHAM, R.F.; REIMANN, K.A.; WAKENELL, O.S. 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.

EFEP. Feira Brasileira de Produtos e Serviços para Animais de Companhia
<<http://www.febrapet.com.br>> Acessado em 10 de janeiro de 2009.

ELOFF J, MASOKO P, PICARD J. Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays. **South African Journal of Botany**, v.73, p.667–669, 2007.

ESTRELA, C.; RIBEIRO, R.G.; ESTRELA, C.R.A.; PÉCORA, J.D.; SOUSA-NETO, M.D. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. **Brazilian Dentistry Journal**, v.14, n.1, p.58-62, 2003.

FARIAS, M.R.; COSTA, P.R.S.; FRANCO, S.R.V.S.; FERREIRA, H. Esporotricose canina e felina. **Cães & Gatos**, v.66, p.30-38, 1997.

FEENEY, K.T.; ARTHUR, I.H.; WHITTLE, A.J.; ALTMAN, S.A.; SPEERS, S.J. Outbreak of sporotrichosis, Western Australia. **Emerging Infectious Diseases**; v.13, n.8, p.1228-1231, 2007.

FELDMAN, B.F. et al. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^a ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 2000, 1344p.

FERNANDES, C.G.N.; MOURA, S.T.; DANTAS, A.F.M.; BLATT, M.C.S. Esporotricose Felina – aspectos clinic-epidemiológicos: relato de casos (Cuiabá, Mato Grosso, Brasil). **MEDVEP Revista Científica de Medicina Veterinária de Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.2, n.5, p.39-43, 2004.

FERNANDES, G.F.; SANTOS, P.O.; AMARAL, C.C.; SASAKI, A.A.; GODOY-MARTINEZ, P.; CAMARGO, Z.P. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: a forgotten and re-emergent pathogen. **The Open Mycology Journal**, v.3, p.48-58, 2009.

FERREIRO, L.; SANCHES, E.M.C.; SPANAMBERG, A.; FERREIRA, R.R.; MACHADO, M.L.S.; ROEHE, C.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.P.; SANTURIO, J.M. Zoonoses micóticas em cães e gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35(Supl 2): s296-s299, 2007.

FIGUEIREDO, J.F.; FERREIRA, F.A. Esporotricose canina. **Veterinária Notícias**, v.4, n.1, p.115-120, 1998.

FILGUEIRA, K.D. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.2, p.673-677, 2009.

FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F.; LIEBENBERG, N.W. Spore ultrastructure in *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, v.69, p.167-170, 1979.

FLEURY, R.N.; TABORDA, P.R.; GUPTA, A.K.; FUJITA, M.S.; ROSA, P.S.; WECKWERTH, A.C.; NEGRÃO, M.S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. **International Journal of Dermatology**, v.40, p.318-322, 2001.

FREITAS, D.C.; MIGLIANO, M.F.; ZANI NETO, L. Esporotricose: observação de caso espontâneo em gato doméstico (*F. catus*). **Revista de Medicina Veterinária**, v.5, p.601-604, 1956.

GARRISON, R.G.; BOYD, K.S.; MARIAT, F. Ultrastructural studies of the mycelium-to-yeast transformation of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Bacteriology**, v.124, p.959-968, 1975.

GEZUELE, E.; ROSA, D. Relevancia del cuerpo asteroid esporotricósico em el diagnóstico rápido de la esporotricosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.22, p.147-150, 2005.

GHOSH, A.; MAITY, P.K.; HEMASHETTAR, B.M.; SHARMA, V.K.; CHAKRABARTI, A. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. **Mycoses**, v.45, p.449-454, 2002.

GURCAN, S.; KONUK, E.; KILIC, H.; OTKUN, M.; ENER B. Sporotrichosis, a disease rarely reported from Turkey, and an overview of Turkish literature. **Mycoses**, v.50, p.426-429, 2007.

HARDMAN, A.; STEPHENSON, I.; JENKINS, D.R.; WISELKA, M.J.; JOHNSON, E.M. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, v.51, p.e73-e77, 2005.

HOGAN, L.H.; KLEIN, B.S.; LEVITZ, S.M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.9, n.4, p.469-488, 1996.

HOLECHECK, S.; CASQUERO, C.J.; ZURITA, M.S.; GUEVARA, C.J.; MONTOYA, P.Y. Variabilidad genética en cepas de *Sporothrix schenckii* aisladas em Abancay, Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, v.21, n.2, p.87-91, 2004.

HUSSEIN, M.R. Mucocutaneous Splendore-Hoeppli phenomenon. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.35, p.979-988, 2008.

IWASAKI, M.; KAGIWARA, M.K. Skeletal Sporotrichosis in a dog. **Companion Animal Practice**, v.2, n.4, p.27-31, 1988.

JACOBSON, E.S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.13, p.708-717, 2000.

JAENISCH, F.R.F.; KUCHIISHI, S.S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.384-388, 2010.

JESUS, J.R.; MARQUES, S.M.T. Esporotricose cutânea em gato – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v.65, p.72-74, 2006.

KICH, J.D.; BOROWSKY, L.M.; SILVA, V.S.; RAMENZONI, M.; TRIQUES, N.; KOOLER, F.L.; CARDOSO, M.R.I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.33-39, 2004.

KWON-CHUNG, K.J. Comparison of isolates of *Sporothrix schenckii* obtained from fixed cutaneous lesions with isolates from other types of lesions. **Journal of Infectious Diseases**, v.139, p.424-431, 1979.

KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Sporotrichosis. In: **Medical Mycology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, p.707-729, 1992.

KONG, X.; XIAO, T.; LIN, J.; WANG, Y.; CHEN, H.D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, n.11, p.1077-1081, 2006.

KOVARIK, C.L.; NEYRAS E.; BUSTAMANTE, B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. **Medical Mycology**, v.46, p.53-56, 2008

LACAZ, C.S. et al. **Esporotricose**. In: Tratado de Micologia Médica, 9ª ed., São Paulo: Savier, 2002. p.479-497.

LANE, J.W.; GARRISON, R.G.; FIELD, M.F. Ultrastructural studies in the yeastlike and mycelia phases of *Spororichum schenckii*. **Journal of Bacteriology**, v.100, p.1010-1019, 1969.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A.A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, v.38, p.143-158, 2003.

LARSSON, C.E.; GONÇALVES, M.A.; ARAUJO, V.C.; DAGLI, M.L.Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.31, p.351-358, 1989.

LARSSON, C.E. Esporotricose. In: Simpósio Brasileiro sobre Micoses Animais, 1, Porto Alegre, 2000, **Anais...2000**, Porto Alegre, p.66-71.

LEME, L.R.P.; SCHUBACH, T.M.P.; SANTOS, I.B.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; REIS, R.S.; MELLO, M.F.V.; FERREIRA, A.M.R.; QUINTELLA, L.P.; SCHUBACH, A.O. Mycological evaluation of bronchoalveolar lavage in cats with respiratory signs from Rio de Janeiro, Brazil. **Mycoses**, v.50, p.210-214, 2007.

LONDERO, A.T.; CASTRO, R.M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. **Sabouraudia**, v.18, p.273-274, 1964.

LONDERO, A.T.; RAMOS, C.D. Esporotricose no Rio Grande do Sul – três décadas de observação. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.64, n.6, p.307-310, 1989.

LOPES, J.O.; ALVES, S.H.; MARI, C.R.; BRUM, L.M.; WESTPHALEN, J.B.; ALTERMANN, M.J.; PRATES, F.B. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.5, p.541-545, 1999.

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.

MACHADO, M.L.S.; BAPTISTA, N.I.; BREITSAMETER, I. Ocorrência de opacidades corneanas (Florida spots) em gatos atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias da UFRGS. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.65 – 68, 2004.

MACKINNON, J.E. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. **Sabouraudia** v.7, p.38–45, 1969.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; CARAPETO, L.P.; ANTUNES, T.A.; SANTOS JR, R.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose óssea e cutânea em um canino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.44, n.6, p.441-443, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; MARTINS, A.A.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, v.57, p.151-154, 2010a.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; XAVIER, M.O.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Role of melanin in

the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. **Microbes and Infection**, v.12, p.162-165, 2010b.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; SOARES, M.P.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Ultrastructural study of the mycelial phase of *Sporothrix schenckii* clinical isolates obtained of feline, canine and human sporotrichosis. **Brazilian Journal of Microbiology** (in press).

MAHAJAN, V.K.; SHARMA, N.L.; SHARMA, R.C.; GUPTA, M.L.; GARG, G.; KANGA, A.K. Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. **Mycoses**, v.48, p.25-31, 2005.

MANDAL, P.; ROY, T.S.; DAS, T.K.; BANERJEE, U.; XESS, I.; NOSANCHUK, J.D. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.662-666, 2007.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3198-3206, 2007.

MATTEI, Antonella. **Pesquisa de fungos com potencial patogênico em ambientes e equipamentos de uso veterinário e avaliação da desinfecção hospitalar**. 2010. 83f. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A.D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**; v.12, n.1, p.147-179, 1999.

MEDEIROS, E.S.; SANTOS, M.V.; PINHEIRO, J.W.; FARIA, E.B.; WANDERLEY, G.G.; TELES, J.A.A.; MOTA, R.A. Avaliação *in vitro* da eficácia de desinfetantes comerciais utilizados no pré e pós-dipping frente amostras de *Staphylococcus* spp. isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.1, p.71-75, 2009.

MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; FARIA, R.O.; ANTUNES, T.A.; CLEFF, M.B.; SOUSA, L.L.; XAVIER, M.O.; MADRID, I.M.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Felino doméstico como transmissor da esporotricose em trabalhador rural- relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.149-151, 2007.

MEINERZ, A.R.M.; ANTUNES, T.A.; SILVA, F.V.; XAVIER, M.O.; CLEFF, M.B.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose experimental sistêmica em ratos Wistar: avaliação hematológica e perfil hepático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1026-1028, 2008.

MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009, 543p.

MENDONZA, M.; HUNG, M.B.; DÍAZ, A.M.; ZAMBRANO, E.A.; DÍAZ, E.; ALBORNOZ, M.C. Growth kinetics and morphology of *Sporothrix schenckii* in diverse culture media. **Journal de Mycologie Médicale**, v.15, p.127-135, 2005.

MENEZES, M.M.; OLIVEIRA, L.D.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C.; VALERA, M.C. Concentração fungicida mínima das soluções de clorexidina e hipoclorito de sódio sobre *Candida albicans*. **Ciência Odontológica Brasileira**, v.11, n.2, p.23-28, 2008.

MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PEREZ-MEJÍA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZÚÑIGA, G.; TORIELLO, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.8, p.3004–3011, 2002.

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. Histopathology of canine sporotrichosis: a morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). **Mycopathologia**, v.168, p.79-87, 2009.

MORRIS-JONES, R. Sporotrichosis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.27, p.427–431, 2002.

MORRIS-JONES, R.; YOUNGCHIM, S.; GOMEZ, B.L.; AISEN, P.; HAY, R.J.; NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A.; HAMILTON, A.J. Synthesis of melanin-like pigments by *Sporothrix schenckii* in vitro and during mammalian infection. **Infection and Immunity**, v.71, p.4026-4033, 2003.

NAKAMURA, Y.; SAO, H.; TAKAHASHI, H.; KOIDE, K.; HASEGAWA, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. **Mycoses**, v.39, p.125-128, 1996.

NETO, R.J.P.; MACHADO, A.A.; CASTRO, G.; QUAGLIO, A.S.S.; MARTINEZ, R. Esporotricose cutânea disseminada como manifestação inicial da síndrome da imunodeficiência adquirida - relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.1, p.57-61, 1999.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; CAETANO, D.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, p.137-140, 2001.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; CAETANO, D.T.; FAÉ, F.; CORDEIRO, J.M.C.; MEIRELES, R.M.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L. Esporotricose zoonótica na região sul do Rio Grande do Sul (Brasil) e revisão da literatura brasileira. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.9, n.1, p.36-41, 2002.

NOBRE, M.O.; ANTUNES, T.A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Production and evaluation of albino mutants of *Sporothrix schenckii*. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.32, n.2, p.119-123, 2004.

NOBRE, M.O.; MADRID, I.M.; ANTUNES, T.A.; MARTINS, A.A.; FERNANDES, C.G.; MATTEI, A.S.; SPANAMBERG, A.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Virulence differences between albino and pigmented *Sporothrix schenckii* isolates. **Journal de Mycologie Médicale**, v.18, p.191-197, 2008.

NOSANCHUK, J.D.; CASADEVALL, A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis. **Cell Microbiology**, v.5, p.203-223, 2003.

PADHYE, A.A.; KAUFMAN, L.; DURRY, E.; BANERJEE, C.K.; JINDAL, S.K.; TALWAR, P.; CHAKRABARTI, A. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of Clinical Microbiology**, setembro, p.2492-2494, 1992.

PAP, K.; SZILLI, M.; KISKÓ, G. Testing antimicrobial efficiency of seven disinfectants against bacteria and fungi with surface test. **Acta Alimentaria**, v.35, p.163-170, 2006.

PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.65-70, 2000.

PEDRINI, S.C.B.; MARGATHO, L.F.F. Sensibilidade de microrganismos patogênicos isolados de casos de mastite clínica em bovinos frente a diferentes tipos de desinfetantes. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p.391-395, 2003.

PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.P.; FIGUEIREDO, F.B.; LEME, L.R.; SANTOS, I.B.; OKAMOTO, T.; CUZZI, T.; REIS, R.S.; SCHUBACH, A. Demodicose associada à esporotricose e pediculose em gato co-infectado por FIV/FelV. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, n.1, p.75-78, 2005.

QUINN, P.J.; et al. **Desinfecção e outros aspectos do controle de doenças**. In: Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Porto Alegre: Artmed, 2005. p466-478.

QUINTELLA, L.P.; PASSOS, S.R.L.; VALE, A.C.F.; GALHARDO, M.C.G.; BARROS, M.B.L.; CUZZI, T.; REIS, R.S.; CARVALHO, M.H.G.; ZAPPA, M.B.; SCHUBACH, A.O. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.38, n.1, p.25-32, 2011.

RAMOS-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.181–187, 2007.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p.3696-3703, 2000.

RUBIO, G.; SANCHEZ, G.; PORRAS, L.; ALVARADO, Z. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico em um centro de referencia em Colombia. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.27, n.2, p.75–79, 2010.

SANTOS, I.B.; SCHUBACH, T.M.P.; LEME, L.R.P.; OKAMOTO, T.; FIGUEIREDO, F.B.; PEREIRA, S.A.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; COELHO, F.; REIS, R.S.; SCHUBACH, A.O. Sporotrichosis – The main differential diagnosis with tegumentary leishmaniosis in dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.1-6, 2007.

SANTOS, L.R.; NETO, J.F.S.; RIZZO, N.N.; BASTIANI, P.V.; OLIVEIRA, V.M.; BOSCARDIN, G.; RODRIGUES, L.B.; BARCELLOS, H.H.A.; BRUM, M.V. Eficácia de desinfetantes e anti-sépticos empregados no hospital veterinário da UPF (HV-UPF) Brasil. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia, Uruguiana**, v.14, n.2, p.156-164, 2007.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O. Esporotricose em gatos e cães – revisão. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v.5, n.29, p.21-24, 2000.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; REIS, R.S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.C.M.; MONTEIRO, D.F.; BARROS, M.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.F.; WANKE, B. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Mycopathologia**, v.153, p.83–86, 2002.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; CUZZI-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R.S.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; GALHARDO, M.C.G.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Records**, v.152, p.172-175, 2003.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; PEREZ, R.S.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, n.10, p.1623-1629, 2004.

SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.; FIGUEIREDO, F.F.; CUZZI-MAYA, T.; PEREIRA, S.A.; SANTOS, I.B.; PAES, R.A.; PAES-LEME, L.R.; WANKE, B. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Mycology**, v.44, p.87-92, 2006.

SCHUCH, L.F.D.; WIEST, J.M.; COIMBRA, H.S.; PRESTES, L.S.; TONI, L.; LEMOS, J.S. Cinética da atividade antibacteriana in vitro de extratos naturais frente a microrganismos relacionados a mastite bovina. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.161-169, 2008.

SENA, Neylla. **Estudo in vitro da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e da clorexidina usados como substâncias químicas auxiliares frente a biofilmes de espécie única**. 2004. 265f. Dissertação (Mestrado em Endodontia)-Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba.

SILVA, D.T.; PEREIRA, S.A.; GREMIÃO, I.D.F.; CHAVES, A.R.; CAVALCANTI, M.C.H.; SILVA, J.N.; SCHUBACH, T.M.P. Esporotricose conjuntival felina. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, n.2, p.181-184, 2008.

SILVA, A.P.; BECK, C.; ROSSATO, C.K.; SPEROTTO, V. Esporotricose felina – relato de caso. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA**, Gramado-RS, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0254-1.pdf>> Acesso em: 5 set. 2009.

SIQUEIRA JUNIOR, J.F.; BATISTA, M.M.; FRAGA, R.C.; UZEDA, M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. **Journal of Endodontics**, v.24, n.6, p.414-416, 1998.

SIQUEIRA, E.L. Estabilidade química da solução de hipoclorito de sódio a 0,5% p/v. **ECLER Endodontics**, v.2, n.3, p.17-26, 2000.

SOUZA, J.J. Esporotricose em cães. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Recife, 1957. **Anais...**, Recife, p.367-371.

SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; MEIRELES, M.C.A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p.372-374, 2006.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; ITO, M.; MITSUYAMA, M. *Sporothrix schenckii* thermo-intolerant mutants losing fatal visceral infectivity but retaining high cutaneous infectivity. **Medical Mycology**, v.39, p.295-298, 2001.

THÉRAUD, M.; BÉDOUIN, Y.; GUIGUEN, C.; GANGNEUX, J.P. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1013-1018, 2004.

ZHANG, J.; Lin, J. Clinical analysis of 316 cases of cutaneous sporotrichosis. **Chinese Journal of Mycology**. 2008-04

XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; SAMPAIO Jr, D.P.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, P.S.; SÓRIA, F.B.A.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1961-1963, 2004.

XAVIER, M.O.; MADRID, I.M.; MEINERZ, A.R.M.; CLEFF, M.B.; SCHUCH, L.F.D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Atividade *in vitro* de três agentes químicos frente a diferentes espécies de *Aspergillus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, p.49-53, 2007.

WALTIMO, T.M.T.; ORSTAVIK, D.; SIRÉN, E.K.; HAAPASALO, M.P.P. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. **International Endodontic Journal**, v.32, p.421-429, 1999.

WHITTMORE, J.C.; WEBB, C.B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v.48, p.411-414, 2007.

Anexo



Esporotricose em região litorânea do extremo sul do Rio Grande do Sul

A esporotricose é causada pelo fungo Sporothrix schenckii que afeta o tecido subcutâneo de animais e humanos. Este trabalho descreve casos de esporotricose em felinos e humanos, em região litorânea do Rio Grande do Sul. Os animais foram atendidos em clínica veterinária na praia do Cassino (Rio Grande), onde foi realizado exame clínico e colheita de amostras das lesões, cavidade oral e ocular, sangue e unhas dos felinos para exame micológico. Após a confirmação da micose, os animais foram tratados com itraconazol, sendo observada a cura clínica ao final de 90 dias. Os casos zoonóticos envolveram proprietário de felino e médico veterinário que apresentaram lesões cutâneas e linfangite ascendente.

I. M. MADRID¹, M. C. F. SOUZA²,
A. A. MARTINS³, A. R. M. MEINERZ⁴, M. C. A. MEIRELES⁵

¹Isabel M. Madrid, Médica Veterinária, MSc, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPel, Rua Gonçalves Chaves, 3435, CEP96015-540 Pelotas, RS, BRASIL.
isabel_madrid@ufpel.edu.br

²Márcia Feltrin Souza, Médica Veterinária MSc Consultório Veterinário Dra. Marcia Feltrin Dias, Cassino-Rio Grande, RS, BRASIL.

³Anelise Afonso Martins, Médica Veterinária, MSc, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, BRASIL.

⁴Ana Raquel Mano Meinerz, Médica Veterinária autônoma, Dra. Pelotas, RS, BRASIL.

⁵Mário Carlos Araújo Meireles, Médico Veterinário, Dr. Prof. Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel, Pelotas, RS, BRASIL.

INTRODUÇÃO MATERIAL E MÉTODOS RESULTADOS DISCUSSÃO

INTRODUÇÃO

As micoses zoonóticas têm adquirido grande importância nos últimos anos devido ao crescente convívio de animais de estimação com o homem. Dessa forma, a esporotricose que acomete várias espécies animais, especialmente os felinos domésticos (*Felis catus*), tem sido considerada como uma micose emergente e de grande importância em saúde pública^{1,2}. É causada pelo fungo dimórfico, *Sporothrix schenckii*, que tem como habitat o solo rico em matéria orgânica, vegetais, cascas de árvores e musgos^{3,4}.

A esporotricose pode ocorrer sob diversas formas clínicas, no entanto, a forma cutânea é a de maior ocorrência no homem e nos animais sendo a infecção ocasionada pela

inoculação traumática do fungo na derme, seja por felpas de madeira ou espinhos de roseiras assim como, pela arranhadura e mordedura de felinos doentes ou portadores^{5,6}. Desse modo, o felino desempenha papel importante na cadeia de transmissibilidade da doença, podendo ser um carreador assintomático do fungo⁷.

A doença tem distribuição mundial sendo mais frequente em regiões de clima tropical e subtropical. No Brasil, ocorre mais comumente no estado do Rio de Janeiro onde já foram descritos centenas de casos em humanos, cães e gatos^{1,8}. No entanto, em outros estados, a esporotricose é ocasionalmente relatada não sendo claro ainda, se a doença é pouco frequente nessas regiões ou se ocorre falta de diagnóstico. Neste contexto, o trabalho descreve os primeiros casos de esporotricose em região litorânea do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Os felinos foram atendidos em um consultório veterinário da praia do Cassino (Rio Grande/RS), onde foram colhidos dados de

identificação como idade, sexo, raça, habitat, presença de outros animais em contato e averiguado o histórico clínico do animal. Durante o exame clínico foram visualizadas lesões cutâneas ulceradas que drenavam exsudato sanguinolento, localizadas em membros e/ou cabeça, sendo realizado o diagnóstico presuntivo de esporotricose.

Para a confirmação do diagnóstico, o médico veterinário coletou amostras de secreção e tecido das lesões, assim como, amostras da cavidade oral e ocular, sangue e unhas dos felinos. Os animais foram previamente anestesiados com ketamina e xilazina e com auxílio de *punch* e *swabs* estéreis foram colhidas amostras, as quais foram encaminhadas para análise micológica no Laboratório de Doenças Infecciosas (FV-UFPEL). As amostras foram processadas através de cultivo, em duplicata, em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida (Mycosel®), incubadas a 25°C e 37°C por até 15 dias com observação diária dos cultivos. Após o período de incubação foram realizadas as análises macro e micromorfológicas das colônias e verificação do dimorfismo do agente, sendo dessa forma, confirmado o diagnóstico de esporotricose.

Para o tratamento dos animais foi recomendada a utilização de terapia antifúngica com itraconazol na dose de 10mg/kg, via oral, uma vez ao dia durante um período mínimo de três meses, sendo realizadas avaliações mensais da evolução do tratamento. Os proprietários foram alertados quanto ao risco de transmissão, formas de controle e prevenção da doença através do manuseio correto do animal com a utilização de luvas, isolamento e tratamento dos felinos e cirurgia de orquiectomia, objetivando minimizar as saídas à rua e brigas por território.

RESULTADOS

Foram diagnosticados três casos de esporotricose em felinos através do isolamento e identificação do fungo *Sporothrix schenckii* nas amostras de tecido e exsudato das lesões. No entanto, estes felinos estavam em contato com outros seis gatos e dois cães, dos quais três felinos e um cão apresentavam lesões ulceradas e exsudativas, sugestivas de esporotricose. O diagnóstico definitivo não pôde ser realizado nestes animais por não possuírem donos e/ou não serem domesticados, impossibilitando a colheita de material para exame micológico.

A partir das amostras da cavidade oral e ocular, sangue e unhas dos felinos obteve-se o isolamento do fungo em apenas uma amostra da cavidade oral de um felino. Dois gatos foram orquiectomizados e os testículos foram encaminhados para análise micológica resultando em cultura negativa. O isolamento do agente etiológico a partir de amostra da cavidade oral de felino demonstra a importância desta espécie na possibilidade de inocular o fungo através da mordedura na pele de outros animais e humanos, e até mesmo, se auto-inocular, provocando desta forma, múltiplas lesões cutâneas. Neste caso, o atendente da clínica veterinária adquiriu a micose através da inoculação do fungo pela arranhadura de um felino durante sua contenção para realização do exame clínico e, dois proprietários relataram presença de lesões semelhantes as do veterinário,

porém não souberam explicar como ocorreu a transmissão.

Dos três animais confirmados pelo exame micológico, dois eram machos e uma fêmea, com idade entre três e 13 anos, todos sem raça definida e de livre acesso à rua. Os animais apresentavam lesões ulceradas e exsudativas, únicas ou múltiplas, em região cefálica e/ou membros (Figura 1). Entretanto, em um felino foram observadas pequenas úlceras somente na região dorsal do corpo. O envolvimento zoonótico foi observado nos três casos, ocorrendo a forma clínica de linfangite ascendente no médico veterinário e em um proprietário, e cutânea disseminada no outro proprietário.



Figura 1. Felino macho apresentando extensa úlcera cutânea na região esquerda da face e pescoço.

A terapia antifúngica foi realizada nos três animais com diagnóstico definitivo de esporotricose e em dois com diagnóstico clínico. Destes, dois tiveram cura clínica ao final do segundo mês de tratamento, dois não retornaram para avaliação e um apresentou redução das úlceras com processo inicial de cicatrização aos 20 dias de tratamento. Porém, o aparecimento de novas lesões durante o segundo mês de tratamento levou o proprietário a optar pela eutanásia deste animal.

DISCUSSÃO

Os casos de esporotricose felina têm crescido nos últimos anos, como demonstrado em estudos realizados no Rio de Janeiro, São Paulo e outras regiões do país^{9,10,11,12}. No Rio Grande do Sul, os primeiros casos em felinos foram descritos na cidade de Rio Grande e, posteriormente, ocorreu o primeiro relato da micose na cidade de Pelotas^{4,6}. Na literatura consultada, nenhum caso de esporotricose havia sido descrito na praia do Cassino (Rio Grande/RS), sendo estes os primeiros casos documentados. O diagnóstico de esporotricose na cidade de Rio Grande (RS) foi descrito em 2001 com a observação de vários animais com lesões semelhantes às da esporotricose que estavam em contato com aqueles acometidos pela doença. Os crescentes relatos alertam para a ocorrência da desta micose e possíveis erros diagnósticos que podem estar ocorrendo, o que muitas vezes leva ao agrava-



mento do quadro clínico devido ao tratamento inadequado do paciente felino. O diagnóstico definitivo de esporotricose é realizado apenas através do cultivo micológico já que os exames citológicos e histopatológicos revelam estruturas arredondadas a ovais que podem se assemelhar a outras leveduras comumente envolvidas em processos patológicos em felinos, podendo apenas ser sugerido infecção por *Sporothrix schenckii*. Neste trabalho, o diagnóstico foi confirmado pelo isolamento do fungo *S. schenckii* nas amostras de lesões dos felinos, com a visualização de colônias com aspectos macro e micromorfológicos característicos do fungo^{3,5}.

A ocorrência de lesões de pele nódulo-ulcerativas em felinos é comum em diversas enfermidades, o que torna imprevisível a realização de exames complementares para o diagnóstico definitivo^{3,8,14}. A esporotricose em felinos ocorre com mais frequência na forma cutânea disseminada com lesões na face e membros^{2,10}.

Os felinos são considerados a espécie de maior potencial zoonótico da micose, podendo ser portadores sintomáticos ou assintomáticos do fungo *Sporothrix schenckii*^{7,8}. Dessa forma, assim como no presente trabalho, outros autores já descreveram a ocorrência de diversos casos de esporotricose em humanos relacionados com transmissão por felinos^{10,13}. As formas clínicas da micose descritas neste trabalho são as mais relatadas, sendo a cutânea disseminada e linfangite ascendente de maior ocorrência em felinos e humanos, respectivamente^{1,6}.

Estudos utilizando cetoconazol demonstraram eficácia variável de cura em felinos com esporotricose, enquanto que o itraconazol apresenta resultados satisfatórios frente às formas cutâneas da micose, com um tempo de tratamento e efeitos colaterais reduzidos, permanecendo como o fármaco de eleição para o tratamento da esporotricose em animais^{6,13,15}. Porém, falhas terapêuticas são descritas, sendo muitos animais encaminhados para eutanásia ou que morrem no período inicial do tratamento^{2,9}.

Este trabalho documenta casos de esporotricose em felinos e humanos no litoral sul do Rio Grande do Sul e ressalta a importância da esporotricose em animais domésticos, alertando para este problema de saúde pública, já que a doença em humanos está normalmente relacionada à transmissão por felinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O.; DO VALLE, A.C.F.; GALHARDO, M.C.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T.P.; REIS, R.S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K.B.F.; CONCEIÇÃO, M.J. 2004. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases Society of America*, v.38, p.529-535.
- 2 MEINERZ, R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; FARIA, R.O.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.A.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. 2007. A Esporotricose Felina – relato de casos. *Ciência Animal Brasileira*, v.8, n.3, p.575-577.
- 3 FARIAS, M.R.; COSTA, P.R.S.; FRANCO, S.R.V.S.; FERREIRA, H. Esporotricose canina e felina. *Cães & Gatos*, v.66, p.30-38, 1997.
- 4 XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; SAMPAIO JR, D.P.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, P.S.; SÓRIA, F.B.A.; MEIRELES, M.C.A. 2004. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.34, n.6, p.1961-1963.
- 5 LARSSON, C.E.; GONÇALVES, M.A.; ARAÚJO, V.C.; DAGLI, M.L.Z.; CORREA, B.; FAVA NETO, C. Esporotricose felina: aspectos clínicos e zoonóticos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n.5, v.31, p.351-358, 1989.
- 6 NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; CAETANO, D.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.18, p.137-140, 2001.
- 7 SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; MEIRELES, M.C.A. 2006. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Brazilian Journal Microbiology*, v.37, p.303-305.
- 8 SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; REIS, R.S.; CUZZI-MAYA, T.; BLANCO, T.; MONTEIRO, T.F.; BARROS, M.B.L.; BRUSTEIN, R.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; MONTEIRO, P.C.F.; WANKE, B. 2002. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro. *Mycopathologia*, v.153, p.83-86.
- 9 SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.; FIGUEIREDO, F.B.; CUZZI, T.; FIALHO-MONTEIRO, P.C.; PEREZ, R.S.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, n.10, v.224, p.1623-1629, 2004.
- 10 FLEURY, R.N.; TABORDA, P.R.; GUPTA, A.K.; FUJITA, M.S.; ROSA, P.S.; WECKWERTH, A.C.; NEGRÃO, M.S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *International Journal of Dermatology*, v.40, p.318-322, 2001.
- 11 FERNANDES, C.G.N.; MOURA, S.T.; DANTAS, A.F.M.; BLATT, M.C.S. Esporotricose felina – Aspectos clínico-epidemiológicos: Relato de casos (Cuiabá, Mato Grosso, Brasil). *MEDVEP*, n.5, v.2, p.39-43, 2004.
- 12 JESUS, J.R.; MARQUES, S.M.T. Esporotricose cutânea em gato – relato de caso. *Clínica Veterinária*, n.65, p.72-74, 2007.
- 13 MARQUES, S.A.; FRANCO, S.R.; DE CAMARGO, R.M.; DIAS, L.D.; HADDAD JUNIOR, V.; FABRIS, V.E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.35, n.4, p.327-30, 1993.
- 14 GORGOZINHO, K.B.; SOUZA, H.M.; NEVES, A.; FUSCO, M.A.; BELCHIOR, C. Um caso atípico de esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, n.2, p.167-170, 2006.
- 15 MADRID, I.M.; SANTOS JR, R.; SAMPAIO JR, D.P.; MUELLER, E.N.; DUTRA, D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. 2007. Esporotricose canina: relato de três casos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.105-108.

Resumen

Esporotricosis en la región costera del sur de Rio Grande do Sul

I. M. Madrid *et al.*

La esporotricosis es causada por el hongo *Sporothrix schenckii* que afecta el tejido subcutáneo de animales y gente. En este estudio se describen casos del esporotricosis en felinos y humano, en la región costera de Rio Grande do Sul. Los animales fueron examinados y muestras de las lesiones, cavidad bucal y ojos, sangre y uñas de los gatos fueron tomadas para análisis micológica. Después de la confirmación de las micosis, los animales fueron tratados con itraconazol, y observó la cicatrización al cabo de 90 días. Los humanos presentaron lesiones en la piel y linfangitis. Este artículo documenta los casos de esporotricosis en la playa de Cassino y destaca la importancia de los gatos en la transmisión de la enfermedad.