

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE FILOGENÉTICA E  
SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS DE *Sporothrix brasiliensis*  
DE ORIGEM CANINA E RELATOS DE TRANSMISSÃO ZONÓTICA EM  
MINAS GERAIS**

Luiz Henrique Martins de Almeida

Belo Horizonte

2023

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, ANÁLISE FILOGENÉTICA E  
SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA DE ISOLADOS DE *Sporothrix brasiliensis*  
DE ORIGEM CANINA E RELATOS DE TRANSMISSÃO ZOONÓTICA EM  
MINAS GERAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal como requisito parcial para a obtenção de título de mestre em Ciência Animal.

**Curso:** Mestrado em Ciência Animal

**Área de Concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Linha de Pesquisa:** Diagnóstico, epidemiologia e controle das doenças dos animais.

**Orientador:** Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Isabel de Azevedo

**Coorientador:** Prof<sup>a</sup> Dra. Camila de Valgas e Bastos

Belo Horizonte

2023

A447c Almeida, Luiz Henrique Martins de ,1994 -  
Caracterização molecular, análise filogenética e suscetibilidade antifúngica de isolados de *Sporothrix brasiliensis* de origem canina e relatos de transmissão Zoonótica em Minas Gerais / Luiz Henrique Martins de Almeida. – 2023.  
92f: il

Orientadora: Maria Isabel de Azevedo  
Coorientadora: Camila de Valgas e Bastos  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva  
Bibliografias: f. 84 a 92.

1- Cão – Doenças - Teses – 2. Doenças transmissíveis em animais – Teses  
3. Ciência Animal – Teses - I. Azevedo, Maria Isabel de – II. Bastos, Camila de Valgas e – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patricia Gomes CRB 2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

**LUIZ HENRIQUE MARTINS DE ALMEIDA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 12 de junho de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Maria Isabel de Azevedo - Orientador(a)

Dr.(a). Carla Weiblen

Dr.(a). Daniela Isabel Brayer Pereira

Dr.(a). Danielle Ferreira de Magalhaes Soares



Documento assinado eletronicamente por **Maria Isabel de Azevedo, Membro**, em 12/06/2023, às 22:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Weiblen, Usuário Externo**, em 27/06/2023, às 08:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Isabel Brayer Pereira, Usuária Externa**, em 27/06/2023, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Danielle Ferreira de Magalhaes Soares, Professora do Magistério Superior**, em 16/07/2023, às 21:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2366866** e o código CRC **BD8A932A**.

Com todo o meu amor e gratidão, dedico este trabalho aos meus queridos pais, cujos ensinamentos moldaram a pessoa que sou hoje.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e por todas as maravilhas que Ele me permitiu viver. A conquista desse título só foi possível pela força e pela misericórdia Dele, que foram concedidas a mim, dia após dia. Provas infinitas de seu amor e cuidado em minha vida.

Às pessoas mais importantes da minha vida, meus pais, José Valtemir e Elza! Agradeço por todo carinho e apoio em todos os meus sonhos e projetos, por acreditarem tanto em mim! Vocês me educaram e fizeram dos meus sonhos os seus! Essa conquista é nossa! Tudo que sou, devo a educação e aos princípios que vocês me deram! Gratidão!

Agradeço aos meus irmãos Cleise e Paulo por sempre acreditarem em mim! Às minhas sobrinhas e cunhados por todas as palavras de incentivo e por me ajudarem em meio a tantos momentos difíceis vividos durante o mestrado, tornando minha caminhada mais leve.

À minha orientadora Maria Isabel de Azevedo, que foi a pessoa que acreditou em mim desde o primeiro contato que tivemos, sempre me acolheu, ajudou, orientou e me incentivou. Foi uma verdadeira mãe durante esses dois anos! Agradeço muito pela sua contribuição no meu crescimento como profissional e como pessoa. Levarei sempre comigo todos os seus conselhos e ensinamentos!

Quero agradecer também a minha coorientadora Camila Bastos, que também me acolheu ao longo do programa, sempre atenciosa, uma grande orientadora, conselheira, que se dedicava ao máximo para me ajudar no experimento e ficava sempre na torcida para que tudo desse certo, comemorando comigo cada PCR finalizado com sucesso!

Como não agradecer a minha família LABIOMIC? Agradeço muito a minha amiga Salene por toda paciência, ajuda e incentivo ao longo de todo programa, só ela entendia e vivenciava comigo os dilemas do pós-graduando! Um agradecimento em especial a todos os IC's que passaram pelo laboratório e contribuíram com a minha caminhada: Bruna, Ygor e Paula, obrigado por toda colaboração e incentivo!

À equipe de residentes da Epidemiologia, sempre prestativos! Que contribuíram muito com o meu trabalho! Aos professores do departamento, que sempre estavam disponíveis e compartilharam seu conhecimento.

Um agradecimento especial a professora Lizandra Robe que contribuiu de uma forma brilhante com as análises filogenéticas do estudo. Ao professor Daniel e a Vanessa do ICB, pela grande contribuição com os testes de suscetibilidade. A todos vocês meus agradecimentos todo conhecimento, colaboração e disponibilidade!

Agradeço minha prima e amiga de infância, Cilmara, que me ajudou muito com a parte gráfica desse trabalho! Obrigado por topar esse desafio em tão pouco tempo! E agradeço também aos meus amigos do peito que levarei comigo sempre: Karen, Stephanie, Fabio e Rafael. Obrigado por toda a paciência e apoio de vocês ao longo da minha caminhada, com vocês tudo fica mais leve e divertido! Obrigado por pela amizade de vocês e por me incentivarem sempre!

À Faculdade Faminas e a Secretaria Municipal de Saúde Lagoa Santa, por toda confiança em mim depositada para trabalharmos juntos em um grande projeto de Saúde Única. Agradeço por abrirem as portas para mim, por essa grande experiência profissional e por todos os ensinamentos compartilhados.

Agradeço à Escola de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFMG pela oportunidade de integrar o programa e concluir o mestrado. E agradeço a todas as agências de fomento à pesquisa pelos recursos disponibilizados para a execução desse trabalho. Meus agradecimentos a todos os colaboradores da UFMG que contribuíram com meu mestrado, cuidando das instalações, dos equipamentos, da recepção e também de todas as amostras que chegavam ao nosso laboratório. Obrigado também aos colegas do Hospital Veterinário da UFMG e pelos demais colegas Médicos Veterinários pela parceria com nosso laboratório e pela contribuição com amostras e casos clínicos que enriqueceram minha formação ao longo do programa.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus familiares e demais amigos, que ao longo desses dois anos de mestrado, fizeram parte dessa caminhada de alguma forma, seja com uma palavra de incentivo, perguntando como era meu trabalho, escutando meus desabafos e me desejando sucesso e muita calma! Obrigado a todos, de todo meu coração!

*“A grandeza das ações humanas é proporcional à inspiração que as produz. Feliz é aquele que traz dentro de si um Deus, um ideal de beleza a que obedece: ideal de arte, ideal de ciência, ideal de pátria, ideal de virtudes evangélicas. São essas as fontes vivas dos grandes pensamentos e das grandes ações. Todas elas refletem a luz do infinito.”*

*Louis Pasteur*



## RESUMO

A esporotricose é uma zoonose negligenciada de distribuição mundial, que afeta pele e mucosas e pode evoluir para forma sistêmica. A doença é causada por fungos sapróbios do gênero *Sporothrix*. A micose acomete espécies animais e humanos, sendo uma zoonose de grande importância para a saúde única. A esporotricose está difundida em todo o país, sendo a maior parte dos casos concentrados na região Sul e Sudeste do Brasil. Um aumento de casos de esporotricose animal foi descrito em Minas Gerais. Em Belo Horizonte, mais precisamente na região do Barreiro, iniciou-se um surto de casos em felinos e humanos em 2015. Desde então, um aumento de casos em caninos foi observado. Dessa forma, este estudo realizou a identificação molecular de 15 isolados caninos provenientes de Belo Horizonte e região metropolitana, a análise filogenética desses isolados, com alvo no gene da Calmodulina (CAL) e Fator de Alongamento de Tradução 1 Alfa (EF1 $\alpha$ ), bem como avaliou também o perfil de suscetibilidade antifúngica através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Itraconazol e Anfotericina B dos isolados caninos. Todos os isolados analisados são da espécie *Sporothrix brasiliensis*, sendo um deles resistente ao itraconazol e o outro à anfotericina B. As análises filogenéticas evidenciaram duas árvores filogenéticas, com a formação de um grande clado monofilético para *S. brasiliensis* para ambos os genes analisados. Ademais, as redes de haplótipos formadas trouxeram novos dados moleculares sobre a esporotricose canina, como a hipótese de que não há uma estruturação por hospedeiro, reforçando o aspecto da expansão clonal de *S. brasiliensis* e também o fato de que a mesma espécie do fungo circula entre cães e gatos. O estudo também descreve dois casos de esporotricose humana que comprovaram a transmissão zoonótica envolvendo cães, um deles a partir da mordedura e outro por contato com secreção de lesões. Dessa forma, os dados da dissertação demonstram que o cão, que antes era visto como um hospedeiro acidental, assume um novo papel no ciclo epidemiológico da esporotricose. Além disso, o estudo é pioneiro em apresentar novos dados sobre a doença, exclusivamente em cães de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Palavras-chave: *Sporothrix brasiliensis*; cão; filogenia; saúde pública; epidemiologia.

## ABSTRACT

Sporotrichosis is a neglected zoonosis with worldwide distribution, which affects the skin and mucous membranes and can evolve into a systemic form. The disease is caused by saprobic fungi of the genus *Sporothrix*. Mycosis affects animal and human species, being a zoonosis of great importance for unique health. Sporotrichosis is widespread throughout the country, with most cases concentrated in the South and Southeast regions of Brazil. An increase in cases of animal sporotrichosis has been described in Minas Gerais. In Belo Horizonte, more precisely in the Barreiro region, an outbreak of cases in felines and humans began in 2015. Since then, an increase in cases of canines has been observed. This study carried out the molecular identification of 15 isolated canines from Belo Horizonte and metropolitan region, the phylogenetic analysis of these isolates, targeting the Calmodulin gene (CAL) and Translation Elongation Factor 1 Alpha (EF1 $\alpha$ ), as well as evaluating the antifungal susceptibility profile through the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for Itraconazole and Amphotericin B of the canine isolates. All isolates analyzed are of the *Sporothrix brasiliensis* species, one of which is resistant to itraconazole and the other to amphotericin B. Phylogenetic analyses showed two phylogenetic trees, with the formation of a large monophyletic clade for *S. brasiliensis* for both analyzed genes. In addition, the haplotype networks formed brought new molecular data on canine sporotrichosis, such as the hypothesis that there is no structure per host, reinforcing the aspect of clonal expansion of *S. brasiliensis* and also the fact that the same species of fungus circulates between dogs and cats. The study also describes two cases of human sporotrichosis that prove zoonotic transmission involving dogs, one from the bite and the other from contact with lesions. Thus, the dissertation data demonstrated that the dog, which was previously seen as an accidental host, assumes a new role in the epidemiological cycle of sporotrichosis. Furthermore, the study is a pioneer in presenting new data on the disease, exclusively in dogs from Belo Horizonte, Minas Gerais.

Keywords: *Sporothrix brasiliensis*; dog; phylogeny; public health; epidemiology.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Características morfológicas de *Sporothrix brasiliensis*. A) Macroscopia da forma filamentosa (melanótica) em meio PDA a 28°C B) Microscopia da forma filamentosa (hifas e conídeos). Preparação com azul de algodão (Obj, 400X) C) Macroscopia de colônias leveduriformes em meio BHI a 37°C D) Microscopia da forma leveduriforme de *Sporothrix brasiliensis*. Preparação com lactofenol (Obj. 400X). .....22
- Figura 2: Árvore filogenética com divisão por clados e a frequência das espécies envolvidas nos casos clínicos, constituída a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene da Calmodulina. ....24
- Figura 3: Apresentações clínicas de esporotricose canina. A) Lesão cutânea fixa, ulcerada em região. B) Acometimento linfocutâneo em membro torácico. C e D) Formas disseminadas, com lesões ulceradas e crostosas. E) Forma disseminada com lesões ulceradas e destruição do plano nasal.....30
- Figura 4: : Lâmina feita por imprint de um felino e corada com panóptico rápido. As setas apontam leveduras presentes no interior de macrófagos e leveduras livres em uma lâmina feita por imprint de exsudato oriundo de um felino. (Obj. 100X).....32
- Figura 5: Árvore filogenética constituída pelos isolados estudados a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene da Calmodulina (CAL) .....47
- Figura 6: Árvore filogenética constituída pelos isolados estudados a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene do Fator de Elongação da Tradução-1 Alfa (EF1 $\alpha$ ). ....48
- Figura 7 – A) Rede de haplótipos com gene da CAL por localização geográfica. B) Rede de haplótipos com gene da CAL por hospedeiros. C) Rede de haplótipos com gene da EF1 $\alpha$  por localização geográfica. D) Rede de haplótipos com gene da EF1 $\alpha$  por hospedeiros. ....50

Figura 8: A) Lesão em região torácica, ulcerada, com aspecto granulomatoso, secreção sanguinolenta no momento do atendimento veterinário. B) Animal após a realização da biópsia para exame histopatológico.....68

Figura 9: A) Lesão em polegar do tutor no dia do atendimento médico. B) Lesão após procedimento de desbridamento realizado no Hospital que acompanha o caso.....69

Figura 10: A) Lesão em polegar direito de tutora no dia do seu relato e primeiro atendimento no hospital. Lesão com aspecto ulcerado, granulomatoso e com secreção serosanguinolenta. B) Lesão em polegar após 90 dias de tratamento com Itraconazol. .71

Figura 11: Modelo de fluxo operacional destinado ao sistema municipal de saúde, com alvo nas ações de vigilância que são executadas pelos Agentes de Combate a Endemias, Médicos Veterinários e demais profissionais da saúde que estão inseridos na rede de Atenção Básica do SUS.....75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação dos isolados caninos, espécie, origem e número de acesso das sequências no *GenBank*. .....44

Tabela 2 - Isolados caninos de *S. brasiliensis* com informações epidemiológicas e clínicas (ano do isolado, estação do ano em que o isolado foi obtido, sexo, hábito de vida do animal, contato com felino, local e tipo de lesão e classificação clínica da doença). .....46

Tabela 3 – Resultado dos testes de suscetibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Anfotericina B e Itraconazol dos isolados avaliados em Minas Gerais. ....52

Tabela Suplementar 1 - Isolados utilizados nas análises filogenéticas e seus dados complementares: códigos de isolado e CBS, espécie, códigos de depósitos no *GenBank*, referências e origem geográfica. ....61

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AB</b>	Anfotericina B
<b>BHI</b>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<b>CAL</b>	Calmodulina
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CSLI</b>	<i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>EF1<math>\alpha</math></b>	Fator de alongação de tradução 1 alfa
<b>ITZ</b>	Itraconazol
<b>kg</b>	Quilograma
<b>mg</b>	Miligrama
<b>ML</b>	Mililitro
<b>MOPS</b>	ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico
<b>PCR</b>	Reação da Cadeia em Polimerase
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SDA</b>	Ágar Sabouraud
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Objetivo Geral .....	18
2.2. Objetivos Específicos .....	18
<b>3. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
3.1. Histórico e classificação da doença.....	19
3.2. Diversidade do gênero <i>Sporothrix</i> e caracterização das espécies.....	21
3.3. Aspectos epidemiológicos.....	24
3.4. Esporotricose .....	26
3.5. Esporotricose canina .....	28
3.6. Diagnóstico laboratorial .....	30
3.7. Tratamento .....	34
3.8. Medidas de prevenção e controle .....	36
<b>4. CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO - ESPOROTRICOSE CANINA: ANÁLISE MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ISOLADOS DE <i>Sporothrix</i> spp. DE UMA REGIÃO ENDÊMICA EM MINAS GERAIS.</b> .....	39
Resumo.....	39
4.1. Introdução.....	40
4.2. Material e Métodos.....	41
4.3. Resultados .....	45
4.4. Discussão.....	52
Referências .....	56
Apêndice: Tabela Suplementar .....	61
<b>5. CAPITULO 3 – MANUSCRITO - O PAPEL DOS CÃES NA TRANSMISSÃO ZONÓTICA DA ESPOROTRICOSE À HUMANOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE - MINAS GERAIS: RELATOS DE CASOS.</b> .....	65
Resumo .....	65
5.1. Introdução .....	66
5.2. Relato de caso.....	67
5.2.1. Caso 1 .....	67
5.2.2. Caso 2.....	69

5.3. Discussão.....	71
5.4. Conclusão.....	76
Referências.....	76
<b>6. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>80</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea com distribuição mundial e endêmica na América Latina. É uma doença negligenciada que afeta pele e mucosas e em alguns casos, pode evoluir para forma sistêmica e afetar pulmões, ossos e sistema nervoso (BAZZI *et al.*, 2016; GREMIÃO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2020). O número de casos de esporotricose pelo mundo ainda é subestimado, principalmente pelo fato de muitos países não exigirem notificação da doença (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). A micose está difundida em todo o Brasil, sendo a maior parte dos casos concentrados na região Sul e Sudeste e, mesmo a doença sendo registrada em vários estados do país, ela ainda não é objeto de vigilância epidemiológica (PAIVA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020). Em Minas Gerais a doença é considerada endêmica com um grande número de casos em humanos e animais (LECCA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2018).

A transmissão ocorre pela inoculação de forma traumática do fungo presente no solo ou plantas, diretamente na pele do hospedeiro (via sapronótica) ou através de mordeduras e arranhaduras de felinos infectados (via zoonótica). A esporotricose em humanos tem se mostrado mais como uma doença zoonótica do que como uma doença laboral, devido à grande proximidade com os gatos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2022).

Apesar dos felinos serem a espécie doméstica mais acometida, tem se observado nos últimos anos um aumento no número de casos da doença em caninos (BOECHAT *et al.*, 2021). O diagnóstico em cães é complexo, principalmente pela similaridade das lesões com sinais clínicos de outras patologias. Casos de esporotricose canina foram relatados em alguns países como França, Itália, Canada, Estados Unidos e no Brasil, que apresenta o maior número de relatos (VIANA *et al.*, 2018). Entretanto acredita-se que o número de cães acometidos possa ser maior, principalmente onde ocorre surtos da doença em gatos que convivem no mesmo ambiente que cães (MADRID *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2018).

São descritas mais de 50 espécies do gênero *Sporothrix* spp. e cada espécie possui características genéticas diferentes que conseqüentemente, determinam manifestações clínicas diversas em seus hospedeiros (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; BOECHAT *et al.*, 2022). Diante disso, a identificação precisa das diferentes espécies causadoras da

esporotricose é essencial, uma vez que traz implicações diretas sobre a abordagem clínica e terapêutica da doença.

O tratamento da esporotricose em animais consiste no uso sistêmico de antifúngicos, sendo o itraconazol (ITZ) o mais utilizados para tratar cães e gatos (BOECHAT *et al.*, 2021). A terapia implica em um longo período de medicação e ainda envolve uma série de fatores que podem influenciar na cura do paciente. A resistência aos antifúngicos, relacionada com os fatores de virulência de espécies do gênero *Sporothrix*, a dificuldade do tutor em medicar o animal e o adoecimento de humanos no domicílio do animal, impactam diretamente no tratamento dos pacientes, além de favorecem o abandono do tratamento e até mesmo o abandono dos animais acometidos (GREMIÃO, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2021).

Ainda são escassos estudos e dados disponíveis na literatura que descrevam casos de esporotricose canina e que cheguem a um diagnóstico definitivo com identificação molecular da espécie fúngica envolvida, principalmente no município de Belo Horizonte. Neste sentido, é relevante realizar-se a identificação molecular, bem como determinar as relações filogenéticas e a suscetibilidade a antifúngicos de isolados de *Sporothrix* spp. que circulam em caninos na cidade de Belo Horizonte e região metropolitana, locais com elevado número de casos humanos e animais. Os dados moleculares contribuirão para buscar padrões de variações dentro das espécies estudadas, encontrando novos padrões genéticos do fungo, contribuindo para o estudo da esporotricose canina, bem como a avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados clínicos que contribuirão em protocolos terapêuticos clínicos mais eficientes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização molecular, filogenética e o perfil de suscetibilidade antifúngica de isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de caninos do município de Belo Horizonte e região metropolitana, bem como relatar casos de esporotricose canina e transmissão zoonótica do fungo pelos cães.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os dados epidemiológicos de caninos com esporotricose.
- Identificar molecularmente a espécie de *Sporothrix* envolvida nos casos de esporotricose canina.
- Realizar o sequenciamento de DNA dos isolados clínicos de *Sporothrix* spp. obtidos da espécie canina.
- Verificar as relações filogenéticas dos isolados de *Sporothrix* spp. oriundos de caninos do município de Belo Horizonte e região metropolitana com isolados de outras regiões do Brasil.
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* dos isolados clínicos de *Sporothrix* spp. de origem canina frente a Itraconazol e a Anfotericina B.
- Relatar dois casos de esporotricose zoonótica a partir do contato com cães infectados ou com doença clínica.
- Propor a elaboração de materiais para os clínicos veterinários e profissionais do serviço público (agentes de combate a endemias e veterinários do serviço público) sobre as principais características da esporotricose canina, diagnóstico, tratamento e coinfeção com a leishmaniose visceral.

### 3. CAPÍTULO 1 - REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 HISTÓRICO E CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial, com relatos que se iniciam no ano de 1898. A primeira descrição da infecção foi feita por Benjamin R. Schenck, nos Estados Unidos, em um paciente que apresentava lesões nos dedos. O fungo foi isolado por Schenck e enviado ao micologista Erwin Smith que o classificou como uma espécie pertencente ao gênero *Sporotrichum*. Somente com os avanços nos estudos e relatos subsequentes, o fungo foi denominado *Sporothrix schenckii* por Hektoen e Perkins, em homenagem ao autor do primeiro relato e descrição do patógeno (HEKTOEN; PERKINS, 1900; DE BEER *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Hektoen e Perkins (1900) seguiram com estudos para compreender melhor o microrganismo que causava lesões e apresentações clínicas que eram similares as que Benjamin R. Schenck descreveu em seus relatos. Dessa forma caracterizaram o fungo e propuseram o nome de *Sporothrix schenckii*. Entretanto, pesquisadores da época relutaram em utilizar a nomenclatura proposta por Hektoen e Perkins e durante algum tempo continuaram utilizando *Sporotrichum schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900; DE BEER *et al.*, 2016; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

Com o passar dos anos, casos da doença começaram a surgir em outros continentes, tornado a esporotricose uma doença de distribuição mundial (ARAM; O'DONNELL, 1986; DE LIMA BARROS *et al.*, 2011). Pjiper e Pullinger em 1927, relataram um surto esporotricose na África do Sul, onde 14 trabalhadores de uma mina foram acometidos com a doença. Os pacientes envolvidos no incidente na mina, apresentavam lesões nos ombros e braços, sendo que alguns apresentavam nódulos pelas cadeias linfáticas, principalmente em braços e pernas, alguns eram ulcerados e apresentavam descarga purulenta (DANGERFIELD; GEAR, 1941; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

A esporotricose ficou conhecida durante muito tempo como “micose das roseiras” ou “doença do jardineiro” devido a casos descritos da doença nos Estados Unidos, sempre relacionados a acidentes com lascas de madeiras, espinhos, galhos ou folhas que causavam lesões nos trabalhadores do campo, jardineiros, lenhadores, dentre outros (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). O que a maioria dos relatos da esporotricose possuíam

em comum, era a forma de contágio, que se dava por acidentes de trabalho envolvendo materiais ou objetos que estavam presentes no ambiente, como plantas, ferramentas, madeiras ou objetos metálicos, resultando na inoculação traumática do fungo na pele do hospedeiro, o que reforçava o caráter sapronótico e laboral da doença (HEKTOEN; PERKINS, 1900; ARAM; O'DONNELL, 1986; DE LIMA BARROS *et al.*, 2011).

Em animais a doença foi descrita pela primeira vez no ano de 1907. O relato pioneiro da esporotricose animal ocorreu no Brasil, acometendo ratos (*Mus decumanus*) que viviam no sistema de esgoto de São Paulo. Os pesquisadores Adolfo Lutz e Alfonso Splendore, foram os responsáveis por esse relato e acrescentaram ainda em sua descoberta, que a transmissão de animal para animal ocorria através de mordidas (DE LIMA BARROS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2020). Ao longo dos anos subsequentes, os casos da doença cresceram e em 1952, houve o primeiro relato de transmissão zoonótica da doença nos Estados Unidos causado por um felino. Mais adiante, em 1955 em São Paulo, foi descrito o primeiro caso de transmissão animal-humano, causado também por um gato (RODRIGUES *et al.*, 2020).

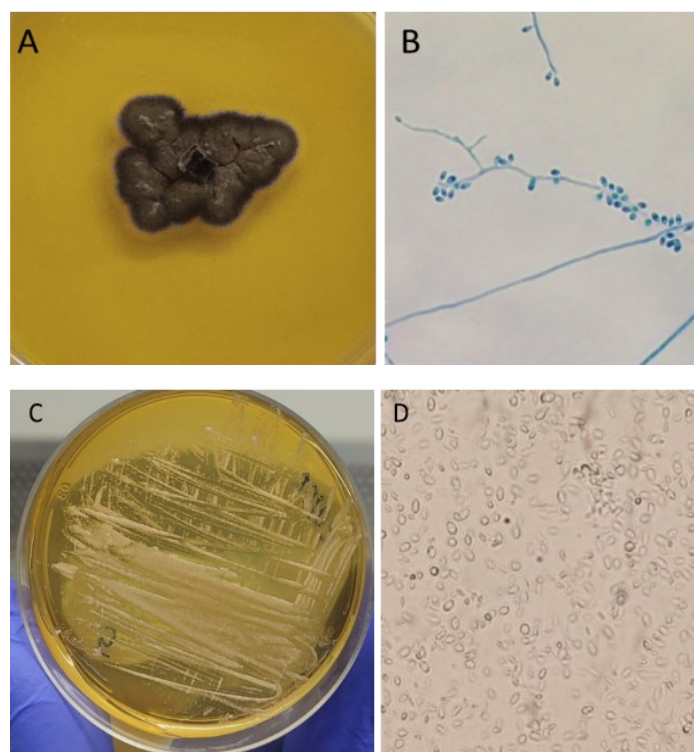
No Brasil, os primeiros relatos da doença em humanos foram em pacientes com atividades profissionais que exigiam a manipulação do solo e vegetais potencialmente contaminados com o fungo (BARROS *et al.*, 2010). O primeiro relato de esporotricose canina ocorreu no ano de 1957 em Santa Catarina (LONDERO *et al.*, 1964). Assim, a esporotricose seguiu com esse perfil de casos isolados ou surtos até que os casos zoonóticos aumentaram consideravelmente conferindo à doença um perfil predominante urbano, diferente dos antigos relatos. Em meados dos anos 90, a transmissão zoonótica assumiu destaque e levou regiões do país a quadros de epidemias, principalmente na região Sul e Sudeste do Brasil (BARROS *et al.*, 2010). O crescente número de casos de esporotricose felina e a transmissão zoonótica caracterizou a doença como uma zoonose emergente no país (POESTER *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). A enfermidade segue em expansão e é negligenciada, com um grande acometimento de humanos e felinos, que apresentam as formas mais severas da doença e contribuem para o aumento da prevalência, principalmente nas áreas urbanas da região Sul e Sudeste (MONTENEGRO *et al.*, 2014).

### 3.2 DIVERSIDADE DO GÊNERO *Sporothrix* E CARACTERIZAÇÃO DAS ESPÉCIES

Atualmente o gênero *Sporothrix* é composto por 53 espécies, sendo *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix globosa* as espécies de maior relevância clínica (BOECHAT *et al.*, 2022). As espécies do gênero estão inseridas no filo Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophistomatales e família Ophistomataceae (CHAKRABARTI *et al.*, 2015).

O fungo apresenta fatores de virulência que o auxilia a invadir os tecidos do hospedeiro, evadir da resposta imune além de influenciarem na apresentação clínica da doença (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015). O maior fator de virulência do gênero *Sporothrix* é a capacidade de produzir melaninas e depositá-las em sua parede celular. Elas podem ser de 3 tipos: DHN-melanina, eumalanina e piomelanina. Essas melaninas proporcionam ao fungo a capacidade de sobreviver a estresses ambientais e durante a infecção no hospedeiro, protegendo o patógeno da resposta imune do hospedeiro. Além disso a melanina confere ao fungo a resistência a alguns antifúngicos como os poliênicos e equinocadinas (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015; MARIO *et al.*, 2016; CRUZ *et al.*, 2018). Isolados que produzem melanina tendem a ser mais patogênicos e causarem a doença na forma disseminada, além de suprimir a resposta imune do hospedeiro para facilitar a infecção, reduzindo a fagocitose (MADRID *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2013; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). A termotolerância possui uma grande importância uma vez que permite o fungo suportar variações de temperatura e sobreviver durante o parasitismo. Espécies como o *S. brasiliensis* conseguem sobreviver a temperaturas mais elevadas, o que pode estar relacionado com a disseminação e formas mais graves da doença (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2015).

No ano de 1960 Dexter H. Howard demonstrou que o fungo apresentava uma forma ambiental filamentosa e uma forma parasitária leveduriforme, sendo que o fator determinante para essa mudança estava relacionado com a temperatura em que o fungo se encontrava (HOWARD, 1961). O termodimorfismo é uma característica do gênero, o que confere ao agente uma variação em sua morfologia conforme o meio e a temperatura em que vive, sendo a forma filamentosa encontrada a temperatura de 25°C-28°C e a forma de levedura a 36°C-37°C (Figura 1) (GREMIÃO *et al.*, 2014). A forma leveduriforme está relacionada com apresentações clínicas mais graves da doença (RODRIGUES *et al.*, 2013).



**Figura 1: Características morfológicas de *Sporothrix brasiliensis*.** A) Macroscopia da forma filamentosa (melanótica) em meio PDA a 28°C B) Microscopia da forma filamentosa (hifas e conídeos). Preparação com azul de algodão (Obj, 400X) C) Macroscopia de colônias leveduriformes em meio BHI a 37°C D) Microscopia da forma leveduriforme de *Sporothrix brasiliensis*. Preparação com lactofenol (Obj. 400X). Fonte: Acervo Pessoal.

*Sporothrix schenckii* era considerada a única espécie causadora da esporotricose até o ano de 2007, contudo, o avanço nos estudos genéticos levaram a descobertas de variações genéticas nos isolados do agente causador da esporotricose, o que caracterizou novas espécies do fungo (MARIMON *et al.*, 2007; BOECHAT *et al.*, 2022).

Os isolados de *Sporothrix* spp. durante um período foram classificados em um grupo, denominado “Complexo *Sporothrix schenckii*”, uma vez que se acreditava não haver diferença significativa entre os fungos relacionados com a doença. Com o desenvolvimento de novos estudos, chegou-se à conclusão que as espécies com poder patogênico apresentam inúmeras variações genéticas, epidemiológicas, morfológicas e fisiológicas (RODRIGUES *et al.*, 2020; MORGADO *et al.*, 2022). Os novos estudos moleculares apresentaram novas espécies do patógeno, com pelo menos oito espécies em destaque: *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix palida*, *Sporothrix chilensis*, *Sporothrix humicola* e

*Sporothrix mexicana* (CHAKRABARTI *et al.*, 2015; BAZZI *et al.*, 2016; BOECHAT *ET al.*, 2022).

Marcadores moleculares baseados em *loci* genômicos codificadores de proteínas, são o padrão ouro para caracterização de espécies de *Sporothrix* spp., como exemplo, há a Calmodulina (CAL), Beta-tubulina e o Fator Alongamento de Tradução 1 Alfa (EF1 $\alpha$ ) dentre outros.

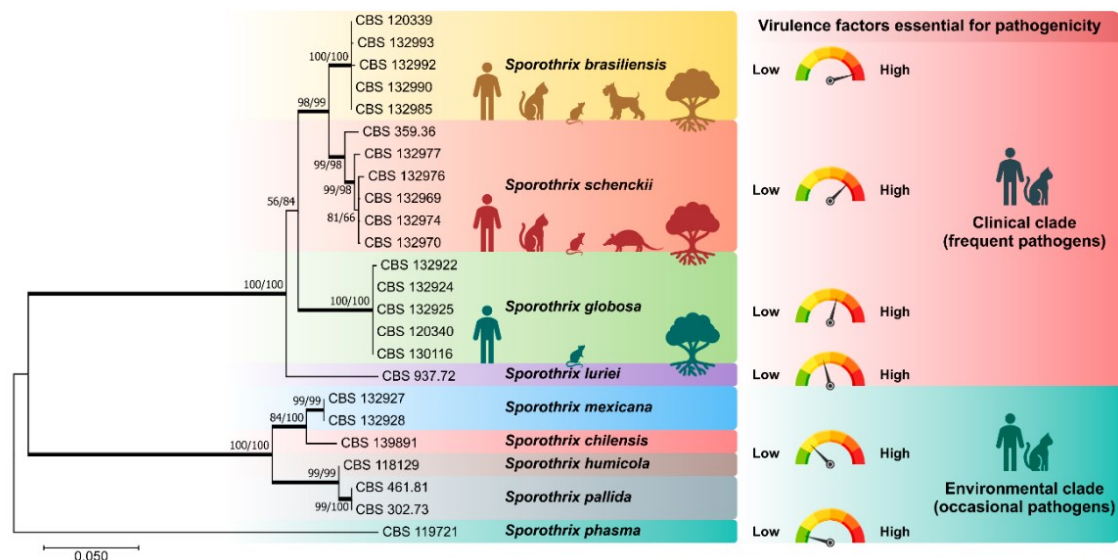
A CAL é amplamente utilizada em estudos filogenéticos de espécies de importância clínica. Este gene está presente no genoma de muitos microrganismos, incluindo o *Sporothrix* sp., o que proporciona muitos estudos onde a CAL é um alvo, gerando assim, um grande número de sequências depositadas em bancos de dados de acesso público. O gene da CAL apresenta ainda, grande variação em regiões não codificadoras e pouca variação em regiões codificadoras de proteínas, normalmente substituições sinônimas, preservando sua função original. Além disso, a CAL possui vários sítios parcimoniosos bem conservados intra-especificamente, permitindo uma melhor compreensão das variações que podem ocorrer dentro de isolados de uma mesma espécie do fungo (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013, 2015).

O EF1 $\alpha$  é um marcador que tem sido utilizado em conjunto com o gene da CAL em análises filogenéticas, para estudar a diversidade genética entre as espécies de *Sporothrix* spp. (RODRIGUES *et al.*, 2013). O estudo de Rodrigues *et al.* (2013) analisou isolados de *Sporothrix* spp. provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro. Ao comparar os resultados obtidos com o EF1 $\alpha$  e CAL, evidenciou-se que *Sporothrix brasiliensis* apresenta uma baixa diversidade genética quando comparado a *Sporothrix schenckii*. Este fato reforça o perfil clonal e a ausência de eventos de recombinação na espécie predominante no Brasil (*Sporothrix brasiliensis*), assim como previamente descrito por Marimon *et al.* (2007).

Estudos posteriores, propuseram uma nova forma de agrupamento por clado baseada em estudos moleculares recentes, dessa forma as espécies de maior importância clínica passam a integrar o Clado Clínico e as com baixa frequência de infecção o Clado Ambiental (DE BEER *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020). Dentre as espécies pertencentes ao Clado Clínico estão *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix schenckii*, *Sporothrix globosa* e *Sporothrix luriei* (DE BEER *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2016). No clado ambiental destacam-se *Sporothrix mexicana*, *Sporothrix palida*,



*Sporothrix chilensis* e *Sporothrix humicola* (MORGADO *et al.*, 2022) como pode ser observado na Figura 2.



**Figura 2:** Árvore filogenética com divisão por clados e a frequência das espécies envolvidas nos casos clínicos, constituída a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene da Calmodulina. Fonte: RODRIGUES *et al.* (2022).

*S. brasiliensis* é a espécie prevalente no Brasil e apresenta alta virulência e sua presença está diretamente ligada a transmissão zoonótica e quadros humanos atípicos e severos e inclusive com quadros de pacientes refratários aos fármacos de escolha (GREMIÃO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015; SANCHOTENE *et al.*, 2015; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Apesar da infecção ser mais comum em gatos, os casos em caninos começaram a ser relatados no final dos anos 90 (BOECHAT *et al.*, 2021). Nos relatos de esporotricose canina, há a predominância de *S. brasiliensis*, entretanto Boechat *et al.* (2021) reportaram um isolado canino de *S. schenckii*, oriundo de um animal da região metropolitana do Rio de Janeiro. Este relato é pioneiro em descrever a ocorrência dessa espécie em cães no Brasil. Contudo, há também um relato da espécie *S. luriei* em um cão do Rio Grande do Sul (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

### 3.3. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

O número de casos de esporotricose pelo mundo ainda é subestimado, principalmente pelo fato de muitos países não exigirem notificação da doença

(CHAKRABARTI *et al.*, 2015). A esporotricose apresenta-se de formas diferentes pelo mundo, em países asiáticos ela possui o caráter de sapronose e está relacionada a transmissão pela via clássica, diferente do que ocorre na América do Sul, onde a doença apresenta caráter zoonótico (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

Surtos de esporotricose, ligada a transmissão zoonótica, ocorrem no Brasil desde o ano de 1990 e a doença apresenta-se sempre com uma importante doença infecciosa de caráter emergente (SANCHOTENE *et al.*, 2015). Casos da micose estão presentes em todos os estados, sendo a maior concentração na região Sul e Sudeste. Mesmo a doença sendo registrada em vários estados do país, ela ainda não é objeto de vigilância epidemiológica (PAIVA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020). As regiões Sul e Sudeste do Brasil são consideradas endêmicas para a doença (MORGADO *et al.*, 2022) e a região metropolitana do Rio de Janeiro é a área de maior ocorrência de esporotricose em animais no mundo (BOECHAT *et al.*, 2021). Entre os anos de 1998 e 2016, o estado relatou 4000 casos de esporotricose humana e felina (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Diante disso, o município do Rio de Janeiro foi pioneiro em estabelecer a notificação compulsória de casos de esporotricose humana e animal (OLIVEIRA *et al.*, 2019b).

No estado de São Paulo, somente o município de Guarulhos adotou a notificação de casos humanos e animais (OLIVEIRA *et al.*, 2019b). No Rio Grande do Sul, o número de casos relatados tanto em humanos quanto em animais vem aumentando consideravelmente (SANCHOTENE *et al.*, 2015). Somente na última década estima-se que há mais 1000 casos de esporotricose humana e animal registrada nos municípios de Pelotas e Rio Grande (BAES PEREIRA *et al.*, 2022). A expansão da doença pelo nordeste do Brasil, levou os estados do Rio Grande do Norte e Pernambuco a adotar a notificação de casos humanos, assim como as cidades de Salvador (Bahia) e João Pessoa (Paraíba) (OLIVEIRA *et al.*, 2019b).

Nos últimos anos, vem sendo observado um aumento de casos de esporotricose felina em Minas Gerais (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Os primeiros relatos iniciaram em 2015 (SANTOS *et al.*, 2018). Embora existam casos e surtos da doença neste estado, ainda não há registros da atual situação epidemiológica da doença, o que é preocupante, devido ao potencial de expansão da enfermidade (LECCA *et al.*, 2020). No final do ano de 2018 foi estabelecido que casos humanos de esporotricose deveriam ser notificados no estado de Minas Gerais (SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2018). O município de Conselheiro Lafaiete estabeleceu

a notificação de casos da micose em humanos e animais (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Em Belo Horizonte, mais precisamente na região do Barreiro, houve um surto de casos felinos no ano 2016, o que levou a Prefeitura de Belo Horizonte a atentar-se para ascensão da doença. Mesmo assim, a esporotricose animal ainda não é de notificação compulsória no município, o que torna os dados ainda subestimados (SECRETARIA MUNICIPAL DE MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE, 2018).

Casos de esporotricose canina foram relatados em alguns países como França, Itália, Canada, Estados Unidos e no Brasil, que apresenta o maior número de relatos (VIANA *et al.*, 2018). Entretanto acredita-se que o número de cães acometidos possa ser maior, principalmente onde ocorre surtos da doença em gatos que convivem no mesmo ambiente que cães (MADRID *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Nos primeiros relatos envolvendo a transmissão zoonótica no Brasil, os cães já eram citados como uma fonte alternativa para a transmissão da doença (RODRIGUES *et al.*, 2020). Ademais, os surtos de casos que ocorrem no Brasil, sugerem que a esporotricose apresenta outros meios de contaminação e disseminação, de modo que os cães também possam estar envolvidos (MADRID *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Estudos recentes mostram que os cães podem sim transmitir a zoonose aos seres humanos seja através da mordida ou pelo contato direto com o animal infectado (RAMOS *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2023).

### **3.4. ESPOROTRICOSE HUMANA E FELINA**

A esporotricose afeta pele, mucosas e em alguns casos, pode evoluir para forma sistêmica e afetar pulmões, ossos e sistema nervoso (GREMIÃO *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2014; BAZZI *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020). A doença é causada por fungos do gênero *Sporothrix*, comumente encontrados no ambiente, em plantas, matéria orgânica em decomposição e no solo (SPICKLER, 2017). A infecção ocorre pela inoculação de forma traumática do fungo presente no solo ou plantas, diretamente na pele do hospedeiro (via sapronótica) ou através de mordeduras e arranhaduras de animais infectados (via zoonótica). Há também uma forma de transmissão menos comum, através da via respiratória, por meio da inalação de conídios (SANTOS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

A micose acomete espécies animais e humanos, trata-se de uma zoonose de grande importância, principalmente em centros urbanos (BARROS *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2018). Mulheres e estudantes que tem o costume de cuidar dos animais acometidos com a doença, são o perfil predominante na descrição dos casos de esporotricose na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro (BARROS *et al.*, 2010). Animais que vão a óbito também podem contaminar o ambiente, portanto, é necessário a incineração desses cadáveres e não o descarte dos animais no ambiente (SILVA *et al.*, 2012; SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE, 2018; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Áreas consideradas endêmicas, possuem fatores socioambientais que contribuem para a disseminação da doença, como a precariedade sanitária, déficits no sistema de saúde pública e a alta densidade populacional. Há uma relação entre indicadores socioeconômicos negativos e o avanço da doença pela população (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

Em humanos a doença apresenta manifestações clínicas graves e pode se apresentar na forma cutânea localizada, linfocutânea e cutânea disseminada, levando também a envolvimento sistêmico, principalmente em pacientes imunodeprimidos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). A doença em humanos tem se mostrado mais como uma doença zoonótica do que como uma doença ocupacional relacionada a atividades em campo e matéria orgânica contaminada. Porém o acometimento de profissionais não pode ser esquecido já que médicos veterinários e pessoas que mantêm contato com felinos doentes estão sob grande risco de se infectarem com o fungo (SILVA *et al.*, 2012; LLORET *et al.*, 2013).

Os felinos acometidos pela doença apresentam lesões nodulares que podem se tornar ulceradas. Com a ulceração da lesão, há uma grande liberação de exsudato sanguinolento. As lesões podem ser localizadas somente na pele ou mucosas, ou podem ser múltiplas e dispersas pelo corpo do animal, principalmente pela autoinoculação do fungo que o animal faz ao se coçar ou se lambar. É comum que as lesões dos felinos se concentrem na cabeça, orelhas, membros e cauda. A evolução de um quadro generalizado pode levar ao acometimento de múltiplos órgãos e sistemas, sendo os pulmões e o fígado os órgãos mais afetados, o que torna o prognóstico da doença desfavorável e aumenta o risco de óbito do animal (LLORET *et al.*, 2013; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

### 3.5. ESPOROTRICOSE CANINA

Os relatos de esporotricose canina ainda apresentam pequenos números quando comparado aos relatos em felinos e humanos (BOECHAT *et al.*, 2021). O primeiro caso de esporotricose canina no Brasil foi relatado no ano de 1957 em Santa Catarina, na forma linfocutânea da doença. Posteriormente, a doença foi descrita em dois cães, em São Paulo e Rio Grande do Sul (LONDERO *et al.*, 1964; MADRID *et al.*, 2007). Estudos recentes mostram que há um crescimento de casos de esporotricose em caninos no Brasil, com predominância da forma cutânea fixa (RAMOS *et al.*, 2017).

Os cães, por muito tempo, não foram considerados como fonte de infecção para humanos, dessa forma, sua participação na transmissão da doença era considerada rara (BOECHAT *et al.*, 2021; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Entretanto, novos estudos descreveram a transmissão zoonótica para humanos a partir de cães infectados com esporotricose, apontando um destaque para o novo papel do cão no ciclo da doença (RAMOS *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2023).

O estado do Rio de Janeiro concentra o maior número de casos de esporotricose reportados tanto em humanos quanto em animais, sendo diagnosticados 244 cães com a doença no período de 1998 a 2014 pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), o que reforça também a possibilidade de infecção dos cães devido à proximidade com os felinos doentes e a contaminação ambiental advinda dos animais infectados (MASCARENHAS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020). Apesar dos felinos serem a espécie doméstica mais acometida, tem se observado um aumento no número de casos da doença em caninos nos últimos anos (BOECHAT *et al.*, 2021).

Os cães podem se infectar por traumas causados por espinhos ou lascas de madeiras contaminadas presentes no ambiente. O hábito dos cães de farejar o solo e cavar buracos no ambiente pode favorecer a infecção dos mesmos. A maioria dos cães se infectam devido ao seu contato com gatos com esporotricose. Essa foi a forma de infecção mais frequente nos surtos de casos que ocorreram no Rio de Janeiro, estima-se que mais de 80% dos cães foram infectados devido a essa proximidade com os gatos doentes (VIANA *et al.*, 2018; BOECHAT *et al.*, 2021; ANDRADE *et al.*, 2022a). Além disso, os cães doentes podem promover a manutenção do fungo no ambiente, favorecendo a infecção de outros animais através da transmissão horizontal (BAES PEREIRA *et al.*, 2022).

Os cães acometidos podem apresentar três tipos de manifestações clínicas: forma localizada ou cutânea fixa, linfocutânea e a forma disseminada (MASCARENHAS *et al.*, 2018) (Figura 3). A forma mais comum nos cães é a forma cutânea fixa, com lesões nodulares que podem ou não ser ulceradas, concentradas na cabeça, região nasal, orelhas e tórax (Figura 3-A), além disso, nos testículos, cavidade oral e mucosa conjuntiva também são locais que podem apresentar lesões em decorrência da infecção (FIDELIS GONSALES *et al.*, 2015). É comum que haja presença de exsudato nos nódulos ulcerados, mas dificilmente as leveduras do fungo são identificadas na lesão, diferente do que acontece nos gatos (MADRID *et al.*, 2012).

A forma linfocutânea inicia-se com nódulos que ascendem pela via linfática e gera mais nódulos secundários e linfadenopatia. Raramente os cães desenvolvem a forma disseminada da doença, e quando isso ocorre, sinais clínicos como febre, letargia, anorexia e lesões de pele podem ser observados, entretanto, são inespecíficos e podem ser confundidos com outras causas infecciosas ou até mesmo com neoplasias. A forma disseminada da doença está associada principalmente a cães com comprometimento em seu sistema imunológico (WHITTEMORE; WEBB, 2007; MADRID *et al.*, 2012). A forma osteoarticular e disseminada no cão são incomuns, entretanto, há estudos que relatam tais formas da doença (MADRID *et al.*, 2007; DE FARIAS *et al.*, 2015; MAGNABOSCO *et al.*, 2022). Diferente do que ocorre nos felinos, a doença nos cães é mais branda e tem um prognóstico favorável (CAFARCHIA *et al.*, 2007).



**Figura 3: Apresentações clínicas da esporotricose canina.** **A)** Lesão cutânea fixa, ulcerada em região nasal (BOECHAT *et al.*, 2021) **B)** Acometimento linfocutâneo em membro torácico (MASCARENHAS *et al.*, 2018). **C e D)** Formas disseminadas, com lesões ulceradas e crostosas (MASCARENHAS *et al.*, 2018) **E)** Forma disseminada com lesões ulceradas e destruição do plano nasal (GUETERRES *et al.*, 2014).

### 3.6. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Para diagnosticar a esporotricose, o médico veterinário deve levar em consideração o histórico do animal, aspectos epidemiológicos e sinais clínicos e associá-los a técnicas laboratoriais para um diagnóstico preciso (LLORET *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2014). O diagnóstico definitivo da doença é feito através de exames complementares como o isolamento do patógeno, exame citológico, histopatológico e testes moleculares para identificação da espécie como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (GREMIÃO *et al.*, 2014; RODRIGUES; DE HOOG; DE CAMARGO, 2014).

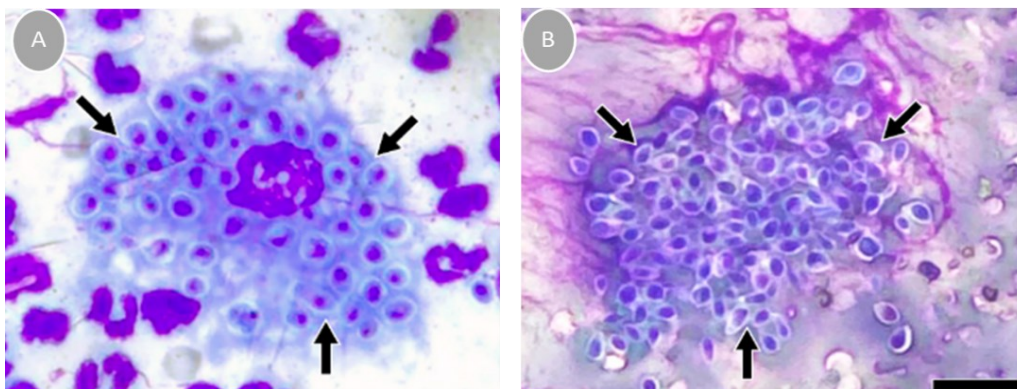
O isolamento fúngico, seguido de identificação macro e microscópica e termoconversão *in vitro* constituem o padrão ouro para o diagnóstico (SANCHOTENE *et al.*, 2015; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Entretanto é um processo longo, que pode

levar até trinta dias. O isolamento do fungo permite a visualização de colônias rugosas, aveludadas e de coloração inicial em um tom de marrom-creme e que vão se tornando marrom-escuro a pretas devido a produção de melanina do fungo, aspecto que pode ser observado nas colônias que crescem a 25°C. As colônias obtidas de isolados inicialmente tendem a ser marrom-creme e aspecto membranoso, mudando para um aspecto rugoso de cor marrom-escuro, somente com 15 a 20 dias de crescimento (MADRID *et al.*, 2012; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Microscopicamente o fungo apresenta conídios em formato de lágrimas e que permanecem agrupados (ZHOU *et al.*, 2014). Mesmo diante de resultados negativos o diagnóstico não pode ser descartado, uma vez que a possibilidade de isolamento do agente varia de 34% a 94% (LARSSON, 2011; RAMOS *et al.*, 2017).

Testes sorológicos de imunofluorescência são também uma opção para o diagnóstico, entretanto, seu resultado indica apenas exposição do organismo ao patógeno, não discernindo de uma infecção ativa (CAFARCHIA *et al.*, 2007). Testes imunoenzimáticos mais modernos, como o Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e *Western Blotting*, estão em andamento em estudos à partir de proteínas da parede celular dos fungos, para avaliar a resposta do hospedeiro, aumentando a sensibilidade e especificidade do teste (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Esses testes sorológicos futuramente poderão contribuir para o enfretamento da doença, pois podem proporcionar altos níveis de especificidade e sensibilidade, agilidade no diagnóstico e também otimizar o monitoramento dos pacientes em tratamento (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Em felinos a citologia é um teste muito utilizado devido a sua praticidade e rapidez de diagnóstico, a partir do *imprint* da lesão do paciente (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Esse método permite a visualização do fungo na sua forma leveduriforme, em formato oval ou achatadas, envoltas por um halo claro (Figura 4), a partir de secreções coletadas diretamente das lesões dos animais. As leveduras podem estar livres ou no interior de macrófagos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas. A lâmina pode ser corada com o corante panótico rápido, possibilitando um rápido e acessível diagnóstico, com sensibilidade que pode chegar aos 97,5% nos felinos atendidos durante os surtos e epidemias da doença (RODRIGUES *et al.*, 2022).





**Figura 4:** Lâmina feita por *imprint* de um felino e corada com panóptico rápido. As setas apontam leveduras presentes no interior de macrófagos e leveduras livres em uma lâmina feita por *imprint* de exsudato oriundo de um felino. (Obj. 100X). Fonte: Rodrigues *et al.*, 2022.

A histopatologia também pode ser uma alternativa para o diagnóstico através de fragmentos de lesões dos animais acometidos. É um exame com altas taxas de sensibilidade e com diferentes técnicas de coloração e análises para o diagnóstico (GREMIÃO *et al.*, 2014). A histopatologia para diagnóstico em cães constitui uma alternativa à cultura do fungo ou testes sorológicos, atingindo taxas entre 95% a 100% para o diagnóstico etiológico, o que reforça a eficácia dessa técnica para o diagnóstico em cães (LARSSON, 2011; RAMOS *et al.*, 2017). A dermatite piogranulomatosa ulcerativa é o achado mais frequente nos relatos de casos onde o exame histopatológico foi realizado (MAGNABOSCO *et al.*, 2022).

As técnicas moleculares constituem uma ferramenta importante para compreensão da epidemiologia e patogenia das espécies fúngicas isoladas em casos clínicos (SANCHOTENE *et al.*, 2015). A identificação das espécies envolvidas nos casos clínicos permitem ainda auxílio na escolha do fármaco, uma vez que algumas espécies já demonstram resistência a alguns antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose humana e animal (RODRIGUES *et al.*, 2015).

O diagnóstico molecular com sequenciamento do DNA e análise filogenética, constituem uma associação para identificar as mais de 50 espécies de fungos pertencentes ao gênero *Sporothrix*, sendo o gene da CAL a principal região utilizada para tal sequenciamento (RODRIGUES *et al.*, 2020). O gene da CAL permite uma diferenciação intraespecífica nos estudos filogenéticos. Além disso, é considerado o padrão ouro para análises filogenéticas e apresenta um vasto número de sequências já depositados em

bancos de dados (MARIMON *et al.*, 2007; BOECHAT *et al.*, 2021; MORGADO *et al.*, 2022). Estudos conduzidos na Europa, Ásia, América do Norte, Central e do Sul utilizam o gene da CAL para a identificação das espécies de *Sporothrix* (MORGADO *et al.*, 2022). Outro marcador genético que pode ser utilizado para estudos voltados a filogenia é o EF1 $\alpha$ , que permite estudos da diversidade genética entre as espécies *Sporothrix* spp., esse marcador permite ainda realizar outras análises que podem levar a uma separação intraespecífica dos isolados. Dessa forma, o EF1 $\alpha$  é uma opção para se comparar com os resultados das análises filogenéticas baseadas no gene da CAL e buscar novos dados genéticos sobre o fungo (RODRIGUES *et al.*, 2013).

O diagnóstico em cães é complexo, principalmente pela similaridade das lesões com sinais clínicos de outras patologias, levando muitos pacientes ao diagnóstico de neoplasias e Leishmaniose e não de esporotricose (CAFARCHIA *et al.*, 2007). A leishmaniose tegumentar americana é o principal diagnóstico diferencial para a esporotricose canina, por ambas apresentarem manifestações clínicas semelhantes, principalmente o processo inflamatório piogranulomatoso das lesões cutâneas, a sua distribuição geográfica sobreposta no país e a reação cruzada que podem apresentar em exames sorológicos (MIRANDA *et al.*, 2010).

Mesmo com as técnicas disponíveis, o diagnóstico da esporotricose canina continua sendo um desafio devido à baixa quantidade de leveduras presentes nas lesões dos cães, a ausência de sinais clínicos antes do desenvolvimento de uma forma mais avançada da doença e ao principal deles, que é a similaridade das lesões cutâneas com outras doenças de causas infecciosas, autoimunes ou até mesmo neoplásicas (MADRID *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Falhas na coleta de amostras resultam em diagnóstico inadequado, reduzindo o diagnóstico da doença e consequentemente, subestimando os número dessa endemia (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

O cultivo do fungo e o exame histopatológico são as melhores opções para o diagnóstico da esporotricose canina, principalmente diante das particularidades da doença nos cães. Entretanto, isolar o fungo ou encontrá-lo a partir de amostras de lesões de cães é difícil, o que torna o diagnóstico direto inviável em alguns casos ou leva a resultados falsos negativos. Diante disso, o uso de técnicas de diagnóstico com maiores taxas de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico definitivo, como o PCR mostra-se como uma das melhores ferramentas para o diagnóstico (MIRANDA *et al.*, 2010; BOECHAT

*et al.*, 2021). Ademais, a identificação de novas espécies do patógeno em cães contribuiu para elucidar a epidemiologia da doença nos cães (BOECHAT *et al.*, 2021).

### 3.7. TRATAMENTO

O tratamento da esporotricose consiste no uso sistêmico de antifúngicos, sendo o itraconazol (ITZ) e o iodeto de potássio os mais utilizados para tratar cães e gatos (BOECHAT *et al.*, 2021). Além desses, outros antifúngicos como a terbinafina e a anfotericina B são indicados em casos refratários ou mais severos da doença (RODRIGUES *et al.*, 2020). A terapia implica em um longo período de medicação e ainda envolve uma série de fatores que podem impactar na cura do paciente. A dificuldade do tutor em medicar o animal, mantê-lo restrito durante o tratamento e o adoecimento de humanos no domicílio do animal, impactam diretamente no tratamento dos pacientes, além de favorecerem o abandono do tratamento e até mesmo o abandono dos animais acometidos (GREMIÃO, 2010; GREMIÃO *et al.*, 2021).

O ITZ pertence a classe dos antifúngicos triazólicos, seu mecanismo de ação está relacionado com a interferência na biossíntese do Ergosterol, que é um dos componentes da membrana celular do fungo. Dessa forma, o fármaco se liga a enzima lanosterol 14-alfa-demetilase, impedindo seu funcionamento e consequentemente, a formação do Lanosterol, um precursor do Ergosterol. Resultando em a alteração da permeabilidade da célula fúngica e consequentemente morte da mesma (LEWIS, 2011). O ITZ é o fármaco de primeira escolha, tanto para casos humanos e animais, principalmente por apresentar menos efeitos colaterais (GREMIÃO, 2010). Em cães e gatos a dose clássica de 5 a 10mg/kg/BID pode ser utilizada para tratamento da esporotricose, entretanto, em felinos a dose de 100mg/dia para gatos com mais de 3kg, 50mg/dia para gatos entre 1 e 3kg e 25mg/kg/dia para gatos com menos de 1kg podem ser utilizados para o tratamento da micose (GREMIÃO *et al.*, 2021). A medicação pode ser administrada junto ao alimento do animal, melhorando assim sua absorção e biodisponibilidade. O tratamento deve ser mantido por mais 30 dias após a cura clínica em casos da forma cutânea fixa de esporotricose, já nos casos de doença na forma disseminada ou sistêmica, recomenda-se manter o tratamento por mais 60 dias após a cura clínica (GREMIÃO *et al.*, 2021).

O iodeto de potássio pode ser associado ao ITZ em pacientes refratários ao tratamento, com a dose de 2,5-20mg/dia em felinos (GREMIÃO *et al.*, 2014). O

mecanismo de ação do fármaco ainda não é bem definido mas tem efetividade quando associado ou não ao ITZ em casos refratários da doença além de ser um fármaco acessível devido a seu baixo custo (RODRIGUES *et al.*, 2020).

A terbinafina também pode ser uma alternativa para casos da forma cutânea (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). É um fármaco pertencente a classe das alilaminas, e atua também alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo. É muito utilizado em formulações tópicas para o tratamento de malasseziose e dermatofitoses, entretanto, em casos que o animal apresente restrições ao uso de ITZ, a terbinafina se mostra eficaz para tratar a esporotricose na dose de 20-30mg/kg/dia, com efeitos colaterais menores se comparados ao ITZ e ao iodeto de potássio (LEWIS, 2011; VIANA *et al.*, 2018).

A anfotericina B pertence a classe dos poliênicos, e seu mecanismo está relacionado com a alteração da permeabilidade da célula fúngica, resultando na morte do microrganismo. É também o fármaco mais utilizado para tratar a doença em sua forma disseminada. A terapia exige um longo período de tratamento para evitar as recidivas, principalmente em pacientes humanos imunocomprometidos (LEWIS, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2020). Em felinos, aplicações intralesionais (IL) de anfotericina B em lesões nodulares não ulceradas, apresentaram resultados satisfatórios quando administrada na dose de 1mg/kg, que pode ser aplicada duas vezes por semana durante cinco semanas, associadas ao tratamento oral com ITZ (GREMIÃO, *et al.*, 2014).

Outras opções para o tratamento da esporotricose podem ser consideradas, como termoterapia, terapia cirúrgica e a criocirurgia, entretanto, cabe o médico veterinário avaliar a necessidade e a efetividade do tratamento escolhido para o seu paciente. A eutanásia é recomendada em casos de animais com a apresentação clínica severa da doença ou quando não há resposta a terapia de escolha (GREMIÃO, *et al.*, 2021).

A resistência aos antifúngicos apresentados por *Sporothrix* spp. em conjunto com as falhas terapêuticas, reforçam a necessidade de realizar testes de suscetibilidade aos antifúngicos (BOECHAT *et al.*, 2021). Para conduzir tais testes as orientações descritas nos protocolos M38-A2 e M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) podem ser executadas. A determinação da concentração inibitória mínima (MIC) mostra-se muito importante para auxiliar nos tratamentos e também avaliar novos antifúngicos (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Ainda são escassos os trabalhos que realizam

testes de suscetibilidade aos antifúngicos em isolados provenientes de cães (BOECHAT *et al.*, 2021).

### **3.8. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE**

Para controlar e prevenir a esporotricose, há a necessidade de uma abordagem mais ampla, não abordando somente a doença, mas também os fatores que contribuem para sua instalação e propagação assim como a promoção da saúde no âmbito individual, coletivo e ambiental (GOMES *et al.*, 2016). Portanto, abordagens em saúde única leva a resultados efetivos para saúde através dos esforços conjuntos dos profissionais da saúde para o equilíbrio na esfera animal, ambiental e humana (DE CAROLIS *et al.*, 2022).

Os órgãos de saúde devem adotar medidas voltadas para prevenção e controle da doença (MONTENEGRO *et al.*, 2014). A ausência de políticas públicas, planos e atividades de vigilância adequada para as emergência da esporotricose contribui para o aumento dos casos (MORGADO *et al.*, 2022). A doença ainda não é alvo de vigilância epidemiológica em todo país, como já ocorre com a leishmaniose visceral, por exemplo (PAIVA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020). Portanto, cabe aos profissionais da saúde atentarem-se as diretrizes locais para o enfrentamento da doença (SPICKLER, 2017). Recentemente o Ofício Curricular 102/2023 – Nota Técnica 60/2023 do Ministério da Saúde trouxe novas perspectivas a respeito da vigilância epidemiológica da esporotricose no país. As ações da nota concentram-se em chegar ao diagnóstico e tratamento precoce. Além disso as medidas voltadas a educação em saúde para a população e a capacitação para os profissionais da rede de saúde, entretanto, não institui medidas como notificação da doença e mais suporte para o serviço público para diagnosticar, tratar e conter e expansão da doença. A nota técnica é um avanço no enfrentamento da esporotricose e um passo para melhorias e aprimoramento de um programa efetivo a nível nacional.

Algumas medidas podem ser adotadas pelos órgãos de saúde, para o enfrentamento da zoonose, tais como: incluir a esporotricose como uma doença de notificação compulsória, disponibilizar o diagnóstico e tratamento para os animais na rede pública de saúde, assim como fornecer o suporte para a incineração dos animais que foram eutanasiados ou morreram em decorrência da doença (BARROS *et al.*, 2010; LECCA *et al.*, 2020).

Os animais doentes são sentinelas para novos casos humanos. Atentar-se a essa condição e buscar o diagnóstico e tratamento desses animais é fundamental. Além disso, a busca ativa de casos animais a partir de casos humanos notificados, constitui uma ferramenta importante para conter o avanço da esporotricose (PAIVA *et al.*, 2020). Com o controle da epidemia nos animais espera-se o controle da esporotricose humana (SPICKLER, 2017).

O livre acesso dos animais à rua é um fator que está inteiramente ligado com o aumento de casos. Evitar que os animais tenham acesso à rua impede que animais doentes tenham contato com outros animais, se envolvam em brigas e conseqüentemente, propaguem a doença (LLORET *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 2014). Além de manter os animais isolados durante o tratamento, é importante melhorar a fiscalização rodoviária dos animais para impedir o trânsito de animais doentes pelo país, fato que pode contribuir para novos surtos e carrear espécies diferentes de *Sporothrix* spp. para outro ambiente (MORGADO *et al.*, 2022).

Mesmo após a morte dos animais em decorrência da doença, é possível isolar o fungo. O que reforça o potencial de contaminação do solo se as carcaças dos animais não forem incineradas (MONTENEGRO *et al.*, 2014). A cremação se mostra eficaz para destruir patógenos como o *Sporothrix* spp. presente nos cadáveres dos animais e reduzir a contaminação ambiental, além de ser preconizado por normas ambientais vigentes no Brasil (SANTOS *et al.*, 2018).

Embora existam estudos avançados com diferentes formulações e adjuvantes para uma possível vacina, ainda não temos uma formulação disponível que possa ser utilizada no controle e prevenção da esporotricose (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Há a necessidade de investir em estudos de vacinas com potencial para prevenir doenças fúngicas como a esporotricose no animais (BARROS *et al.*, 2010).

Educação e conscientização da população sobre a doença e sobre posse responsável devem ser intensificadas para reduzir o número de casos tanto em humanos quanto em animais (RODRIGUES *et al.*, 2020). Souza (2022) mostra em seu estudo que ações de educação em saúde direcionadas aos tutores promovem a redução do tempo de tratamento, custo e conseqüentemente a transmissão da doença. Além disso, a conscientização dos tutores sobre posse responsável ajuda a manter os animais isolados durante o tratamento e pode diminuir o abandono dos animais. O médico veterinário

desempenha um importante papel durante o atendimento de seus pacientes, que vai além do diagnóstico e tratamento, principalmente quando enfatiza com os tutores sobre a posse responsável e também quando explica sobre o diagnóstico do animal, portanto, sua fala deve enfatizar os cuidados e as restrições para o tratamento e controle da doença, além de enfatizar a possibilidade de cura, de modo a incentivar o tutor a cuidar do animal e não abandoná-lo (SANTOS *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2022a). Com uma formação fortemente embasada na saúde pública e medicina veterinária preventiva e com a habilidade de trabalhar de forma interdisciplinar, o médico veterinário é um profissional de grande importância no papel educacional em saúde (GOMES *et al.*, 2016).

#### 4. CAPÍTULO 2 – MANUSCRITO - ESPOROTRICOSE CANINA: ANÁLISE MOLECULAR E SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DE ISOLADOS DE *Sporothrix* spp. DE UMA REGIÃO ENDÊMICA EM MINAS GERAIS

##### RESUMO

A esporotricose é uma zoonose fúngica com distribuição mundial, sendo o Brasil considerado um país endêmico. Os fungos do gênero *Sporothrix* são os agentes causadores da micose, sendo *Sporothrix brasiliensis* a espécie mais prevalente e virulenta. As principais formas de transmissão do agente são as vias sapronótica e a zoonótica, sendo os felinos e os cães os principais transmissores para humanos. Embora os relatos de esporotricose canina sejam escassos, o número de casos nesta espécie em Minas Gerais vem aumentando consideravelmente, impactando na incidência de casos humanos no estado. Neste sentido, este estudo objetivou realizar a identificação molecular, a análise filogenética e o perfil de suscetibilidade antifúngica de isolados caninos de *Sporothrix* spp. obtidos em Belo Horizonte e região metropolitana. A amostragem foi composta por 15 isolados, sendo a maioria de cães machos (n=10; 66,66%), com lesões de forma cutânea fixa (n=8; 53,33%) e localizadas no plano nasal (n=9; 60%). Todos os isolados foram identificados molecularmente como pertencentes a espécie *Sporothrix brasiliensis*. A análise filogenética dos genes Calmodulina (CAL) e o Fator de Elongação da Tradução-1 Alfa (EF1 $\alpha$ ) evidenciou que há uma baixa diversidade intraespecífica no clado formado por *S. brasiliensis*, com a formação de um grande clado monofilético, quando comparado a *S. schenckii*. A análise da rede de haplótipos para ambos os genes não apresentou uma estruturação por hospedeiro. No teste de suscetibilidade antifúngica ao itraconazol e anfotericina B, um isolado apresentou resistência a cada uma das drogas. Apesar da esporotricose ainda ser considerada rara em cães, os casos nesta espécie vêm aumentando principalmente em áreas onde a doença é endêmica em felinos. As análises mostraram que a espécie que circula entre cães neste estudo é a mesma responsável pela esporotricose em humanos e felinos. E, portanto, cães definitivamente devem ser incluídos no cenário epidemiológico da esporotricose no Brasil.

Palavras-chave: *Sporothrix brasiliensis*, cão, identificação molecular, zoonose, itraconazol e anfotericina B.



#### 4.1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição mundial. *Sporothrix brasiliensis* é a espécie prevalente, mais virulenta e relacionada com a transmissão zoonótica e quadros humanos graves e refratários aos tratamentos de escolha no Brasil (GREMIÃO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015; SANCHOTENE *et al.*, 2015; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). O primeiro caso de esporotricose canina relatado no Brasil, ocorreu no ano de 1957, no estado de Santa Catarina. Embora a doença seja incomum nessa espécie, os relatos em cães apresentam um crescimento, principalmente nas regiões Sul e Sudeste do país (LONDERO *et al.*, 1964; BOECHAT *et al.*, 2021)

Os cães podem desenvolver a doença através da inoculação traumática do fungo ou em contato direto com o ambiente contaminado. Os últimos relatos nessa espécie vem ocorrendo principalmente por meio do contato com felinos infectados, nas regiões dos surtos da doença (RODRIGUES *et al.*, 2012; GREMIÃO *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2021). Duas espécies de *Sporothrix* já foram descritas em casos caninos no Brasil, *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* (BOECHAT *et al.*, 2021). Além disso, estudos alertam para a transmissão da esporotricose para humanos a partir do contato com cães, o que traz uma nova perspectiva sobre o papel dos caninos no ciclo da doença (SILVA-VERGARA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2023).

O diagnóstico da zoonose nos cães é complexo, considerando doenças como a leishmaniose tegumentar que causam quadros clínicos similares a esporotricose (CAFARCHIA *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 2011). O histórico do animal, os dados epidemiológicos, os sinais clínicos e os exames laboratoriais são essenciais para o correto diagnóstico dos pacientes caninos (BOECHAT *et al.*, 2021). O isolamento seguido da análise molecular também é considerado uma excelente ferramenta para a identificação do fungo, além de permitir o levantamento de dados valiosos para a epidemiologia da doença. Neste sentido, o sequenciamento genético utilizando alvos em genes já conhecidos como o da Calmodulina (CAL) e o Fator de Elongação da Tradução 1 Alfa (EF1a) permite estudar diferenciações intraespecíficas e interespecíficas (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2015; BOECHAT *et al.*, 2021; MORGADO *et al.*, 2022). Outro importante fator a considerar nessa espécie é a escolha do antifúngico, uma vez

que, algumas isolados de felinos e humanos apresentam resistência aos antifúngicos testados *in vitro* (ZHOU *et al.*, 2014; SANCHOTENE *et al.*, 2015).

Uma vez que, os dados sobre esporotricose canina são raros, este estudo tem como objetivo realizar a identificação molecular, a análise filogenética e a suscetibilidade antifúngica *in vitro* de isolados caninos de *Sporothrix* spp. provenientes de Belo Horizonte e região metropolitana.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1. Isolados Caninos**

Foram analisados 15 isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de cães diagnosticados com esporotricose entre 2018 e 2022 na cidade de Belo Horizonte e região metropolitana. As amostras fazem parte do banco de isolados do laboratório LABIOMIC (Laboratório de Biologia Molecular e Micologia) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG e estão registrados no SISGEN (AE45AC5).

## **4.3 ANÁLISE MOLECULAR**

### **4.3.1 Extração do DNA total**

O DNA total foi extraído a partir dos isolados cultivados em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol durante sete dias. A extração de DNA foi realizada utilizando o kit FastDNA protocol (MP Biomedicals, Vista, CA, USA), seguindo as especificações do fabricante. Após extração, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica (DO) em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000/c na razão DO260nm/DO280nm conforme descrito por Rodrigues (2013). O DNA obtido foi conservado congelado a -20°C.

### **4.3.2. PCR Espécie Específica**

A identificação molecular foi realizada através de uma reação de PCR com pares de *primers* específicos para espécie *S. brasiliensis* (Sbra-F 5' GCC CCG TTT GAC GCT TGG- 3' e Sbra-R 5' CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT- 3'), considerando que esta é a principal espécie causadora da esporotricose zoonótica circulante na região Sudeste do país (RODRIGUES *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2017, 2021). As condições de amplificação seguiram as condições de ciclagem *touchdown* (RODRIGUES *et al.*, 2015). Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Foi utilizado como controle positivo da reação, o DNA de um fungo (*Sporothrix brasiliensis*) previamente identificado molecularmente e apenas água como controle negativo da reação.

#### **4.3.3. PCR com alvo no gene da Calmodulina (CAL) e Fator de Elongação da Tradução-1 Alfa (EF1 $\alpha$ )**

O DNA total de cada isolado avaliado foi submetido à amplificação do gene parcial da Calmodulina (CAL) e Fator de Elongação (EF1 $\alpha$ ). Para a reação com o gene da CAL, os pares de *primers* degenerados CL1: 5'- GAR TWC AAG GAG GCC TTC TC-3' e CL2A: 5'-TTT TTG CAT CAT GAC TTG GAC-3' foram utilizados na ciclagem (O'DONNELL *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2013). Para amplificação da região do *locus* do fator de alongação da tradução-1 alfa (EF1 $\alpha$ ) os *primers* EF1-F (5'-CTG AGG CTC GTT ACC AGG AG-3') e EF1-R (5'-CGA CTT GAT GAC ACC GAC AG-3') foram utilizados (RODRIGUES *et al.*, 2013). Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, onde foram observados *amplicons* de 800 e 850 pares de base para a CAL e EF1 $\alpha$ , respectivamente. Para o sequenciamento, os *amplicons* da PCR da CAL e EF1 $\alpha$  passaram pelo processo de purificação, utilizando-se o kit PureLink® PCR Purification (Invitrogen) conforme orientações do fabricante. Finalizada a etapa de purificação, os *amplicons* seguiram para o sequenciamento no sequenciador AB 3500 Genetic Analyzed.

#### **4.3.4 Análise Filogenética**

As sequências dos isolados caninos obtidos durante esse trabalho e as sequências de outros isolados (animais e humanas) obtidas no banco de dados do GenBank, foram alinhadas pelo algoritmo Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994) no Mega 7 (KUMAR *et al.*, 2016). As relações filogenéticas foram inferidas para ambos os genes, individual e simultaneamente, por máxima verossimilhança (ML) e por inferência Bayesiana (IB), nos programas iqTree 2 (NGUYEN *et al.*, 2015) e MrBayes 3.2 (RONQUIST *et al.*, 2012), respectivamente. Na análise de ML, o modelo empregado foi selecionado através dos scores de BIC, conforme avaliado pelo ModelFinder implementado dentro do iqTree. Para avaliar a confiabilidade dos cladogramas, 1.000 réplicas de bootstrap ultra-rápido foram implementadas. Na IB, o modelo de substituição nucleotídica utilizado foi escolhido segundo os scores de AIC, usando o MrModeltest 2.4 (NYLANDER, 2004), e o PAUP 4.0a169 (SWOFFORD, 2002). Em cada análise, foram empregadas pelo menos 10.000.000 de gerações, salvando a cada 10.000 e queimando 25% dos resultados iniciais. A convergência dos resultados foi inicialmente avaliada pelo valor do desvio padrão entre corridas, que atingiu números menores do que 0,01, e depois confirmada pela análise dos valores de ESS (Effective Sample Size) no Tracer 1.7.1 (RAMBAUT *et al.*, 2018).

Índices de diversidade e neutralidade foram estimados independentemente para cada gene no DNAsp 6. Finalmente, a rede de interações entre alelos foi reconstruída com o uso do programa Network 10.2 (<https://www.fluxus-engineering.com/>), a fim de avaliar a distribuição dos alelos entre estados brasileiros e entre hospedeiros.

As sequências obtidas de isolados caninos neste trabalho foram depositadas no *GenBank* e seus respectivos códigos de acesso podem ser visualizados na Tabela 1. As demais sequências utilizadas para as análises foram retiradas de bancos públicos de dados e suas especificações podem ser constadas na Tabela Suplementar 1.

**Tabela 1** - Identificação dos isolados caninos de *Sporothrix brasiliensis*, com informações de origem e número de acesso das sequências no GenBank dos isolados.

Código Isolado	Espécie	Hospedeiro	Origem	GenBank	
				CAL <sup>1</sup>	EF1a <sup>2</sup>
Sbc 01	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR001911	OR001910
Sbc 02	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR001912	*
Sbc 03	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Contagem, MG, Brasil	OR001913	OR037322
Sbc 04	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Igarapé, MG, Brasil	OR037310	OR037323
Sbc 05	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037311	OR037324
Sbc 06	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037312	OR037325
Sbc 07	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Betim, MG, Brasil, MG Brasil	OR037313	OR037326
Sbc 08	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Ribeirão das Neves, MG Brasil	OR037314	OR037327
Sbc 09	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Contagem, MG, Brasil	OR037315	OR037328
Sbc 10	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037316	OR037329
Sbc 11	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Contagem, MG, Brasil	OR037317	*
Sbc 12	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037318	OR037330
Sbc 13	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037319	*
Sbc 14	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037320	OR037331
Sbc 15	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Cão	Belo Horizonte, MG, Brasil	OR037321	OR037332

\* Sequência em processo de submissão ao GenBank; <sup>1</sup>Calmodulina (CAL); <sup>2</sup>Fator de Elongação da Tradução-1 Alfa (EF1 $\alpha$ ).

#### 4.3.5. Teste de Suscetibilidade antifúngica *in vitro*

Para os testes de suscetibilidade, as colônias de *Sporothrix* spp. foram repicadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) durante sete dias a uma temperatura de 37°C, promovendo assim a termoconversão para a forma leveduriforme. Após esse período as colônias leveduriformes foram repicadas para placas com meio BHI e incubadas por mais sete dias a 37°C. A suscetibilidade dos isolados de *Sporothrix* spp. foi avaliada de acordo com o método de microdiluição em caldo de levedura recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) – documento M27 A3 (2008), com algumas modificações. Para isso, soluções estoques dos fármacos itraconazol (ITZ) e anfotericina B (AB) foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e armazenados a -20°C. Em seguida, as soluções de trabalho foram preparadas por diluição em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 tamponado com ácido 3-morfolinopropano-1-sulfônico (MOPS) 0,165M e quantidade suficiente para uma concentração final de glicose a 2%. Uma alíquota de 10 microlitros das diluições de cada

droga foi adicionada aos 96 poços da microplaca (Difco Laboratories, EUA), iniciando a diluição na concentração de 16mg/ml, sendo reduzida à metade nas diluições subsequentes, até que a última diluição seja atinja a concentração de 0,313mg/ml. Em seguida, foi adicionado aos poços 100 µL de uma suspensão fúngica em RPMI, que foi preparada a partir de uma diluição de solução fúngica constituída das leveduras de *S. brasiliensis* dos isolados avaliados, sendo a primeira diluição de 1:50 em salina e a segunda diluição de 1:20 em meio RPMI de modo que a concentração de  $1 - 5 \times 10^3$  UFC/mL seja obtida. O controle de crescimento consistiu em 100 µL de inóculo fúngico mais 100 µL de RPMI e o controle de esterilidade consistiu em apenas 200 µL do meio de cultura. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas e a leitura para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada visualmente pela observação da turbidez e confirmados por leituras espectrofotométricas a 492nm, utilizando leitor de microplacas de 96 poços (Multiskan spectrum, Thermo Scientific). A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a equação:  $100(Ax100/C)$ , onde A é o valor de absorbância dos poços contendo o composto de teste e C é a absorbância dos poços de controle (não tratados). Os resultados são representativos de dois experimentos independentes feitos em duplicata para cada amostra. Para a anfotericina B a CIM foi considerada como a inibição total do crescimento (100%) quando comparado ao crescimento do controle. Para a leitura do ITZ foi considerada a inibição de 50% do crescimento quando comparado ao crescimento do controle. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada para o controle de qualidade (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2008; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017).

### 4.3. RESULTADOS

A Tabela 2 apresenta os isolados clínicos de *S. brasiliensis* identificados nesse estudo, sendo que o isolamento foi realizado a partir 15 cães, sendo dez (66,66%) isolados obtidos a partir de cães machos, quatro (26,67%) de fêmeas e apenas um isolado (6,67%) não foi especificado o sexo do animal. Do total de cães diagnosticados com esporotricose, 13 (86,66%) eram domiciliados, um cão era semi-domiciliado (6,67%) e apenas um cão (6,67%) não foi especificado seu hábito de vida. Em relação ao convívio com felinos, oito (53,34%) cães possuíam contato, dois (13,33%) não possuíam e cinco (33,33%) cães não

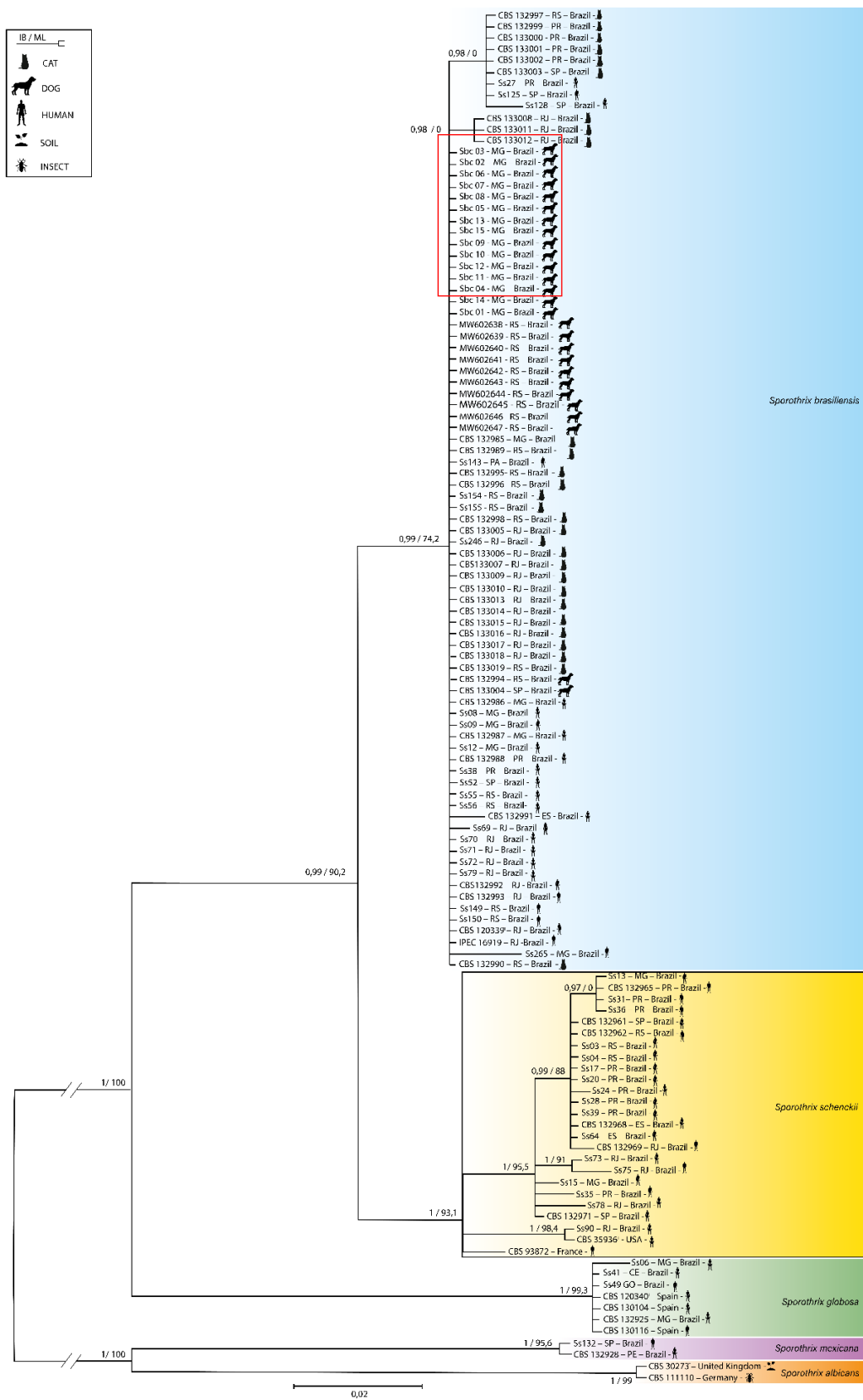
apresentavam essa informação. Em relação à localização das lesões, a maioria (60%) dos cães apresentaram lesão em plano nasal. Oito cães (53,33%) apresentaram a forma clínica cutânea fixa e dois cães (13,34%) apresentaram a forma cutânea disseminada. Os isolados foram obtidos em diversas épocas do ano, sendo sete (46,69%) do outono e quatro (26,64%) do inverno, um (6,67%) do verão e um da primavera (6,67%).

**Tabela 2** - Isolados caninos de *S. brasiliensis* com informações epidemiológicas e clínicas (ano do isolado, estação do ano em que o isolado foi obtido, sexo, hábito de vida do animal, contato com felino, local e tipo de lesão e classificação clínica da doença).

Código Isolado	Ano	Estação do ano	Sexo	Hábito de vida	Contato felino	Local da lesão	Tipo de lesão	Classificação
Sbc 01	2021	Outono	M	D	NE	NE	NE	NE
Sbc 02	2020	Outono	M	D	NE	NE	NE	NE
Sbc 03	2020	Outono	M	D	Sim	Plano nasal	Nodular	Cutânea Fixa
Sbc 04	2021	Verão	M	D	NE	NE	NE	NE
Sbc 05	2021	Inverno	M	D	Sim	Plano nasal	Ulcerada	Cutânea Fixa
Sbc 06	2018	NE	F	D	NE	NE	NE	NE
Sbc 07	2019	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
Sbc 08	2019	Primavera	M	D	Sim	Plano nasal	Ulcerada	Cutânea disseminada
Sbc 09	2022	Outono	M	D	Sim	Plano nasal	Ulcerada	Cutânea Fixa
Sbc 10	2022	Outono	F	D	Sim	Plano nasal	Nodular	Cutânea Fixa
Sbc 11	2022	Outono	M	D	Sim	Plano nasal	Nodular	Cutânea Fixa
Sbc 12	2022	Outono	F	D	Sim	Plano nasal e Membros	Ulcerada	Cutânea Disseminada
Sbc 13	2022	Inverno	M	D	Sim	Plano nasal	Ulcerada	Cutânea Fixa
Sbc 14	2022	Inverno	F	D	Não	Dorso, Tórax	Ulcerada	Cutânea Fixa
Sbc 15	2022	Inverno	M	D	Não	Plano nasal	Ulcerada	Cutânea Fixa

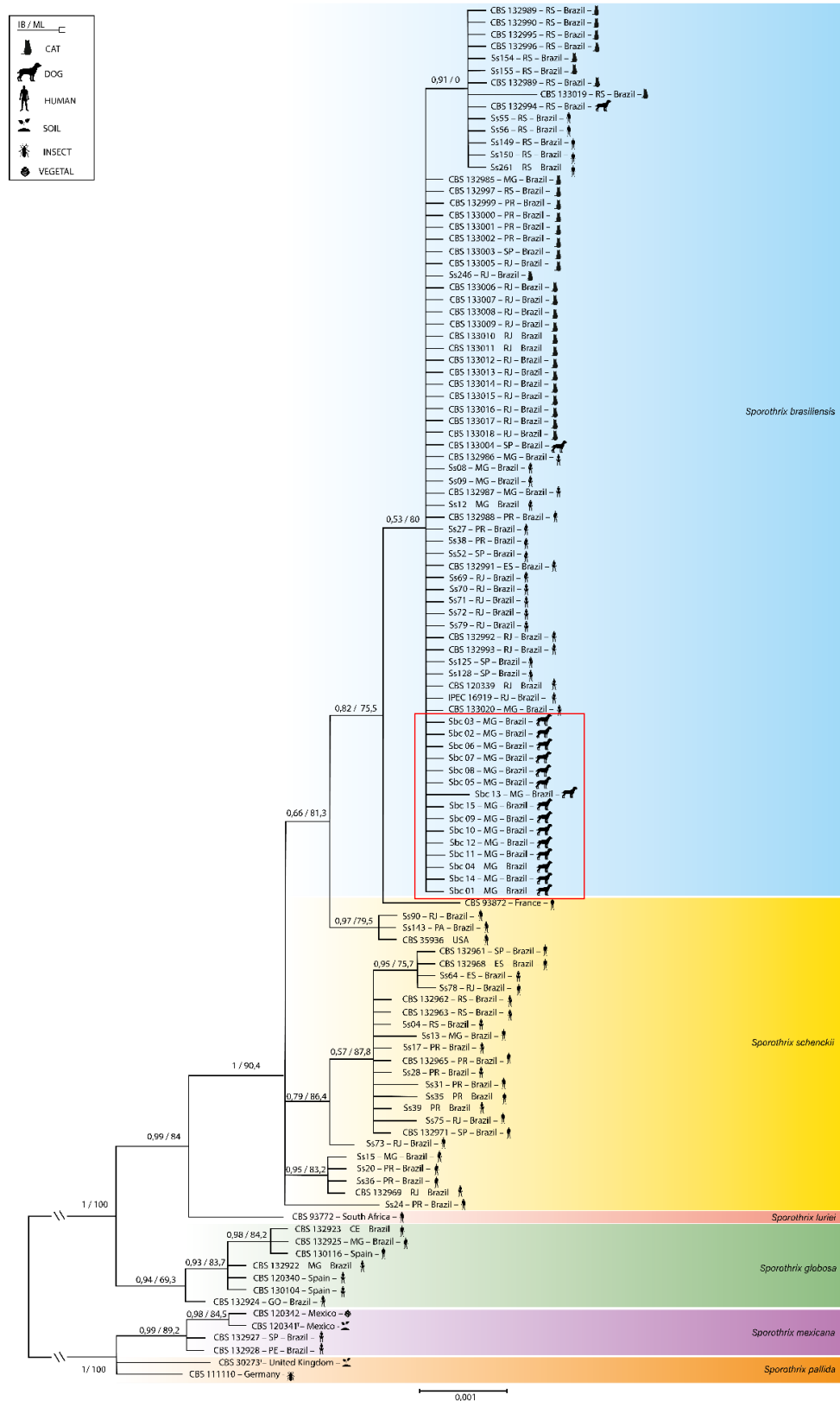
Abreviaturas: **M**, macho; **F**, fêmea; **NE**, não especificado; **D**, domiciliado; **SD**, semi-domiciliado.

A análise molecular realizada com os *primers* espécie-específica evidenciou que as 15 amostras caninas (100%) analisadas pertenciam a espécie *S. brasiliensis*. A árvore filogenética construída a partir das sequências com o gene da CAL (Figura 5) mostrou a formação de dois clados de relevância clínica, sendo um clado de *S. brasiliensis* e um de *S. schenckii*. Em relação ao gene EF1a (Figura 6), a árvore apresentou a formação de um clado monofilético para *S. brasiliensis* com a formação de um pequeno clado interno para a mesma espécie. Em relação a espécie *S. schenckii* observou-se a formação de diferentes clados para a espécie, inclusive com formação de pequenos clados internos.



**Figura 5:** Árvore filogenética constituída pelos isolados estudados a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene da Calmodulina (CAL).

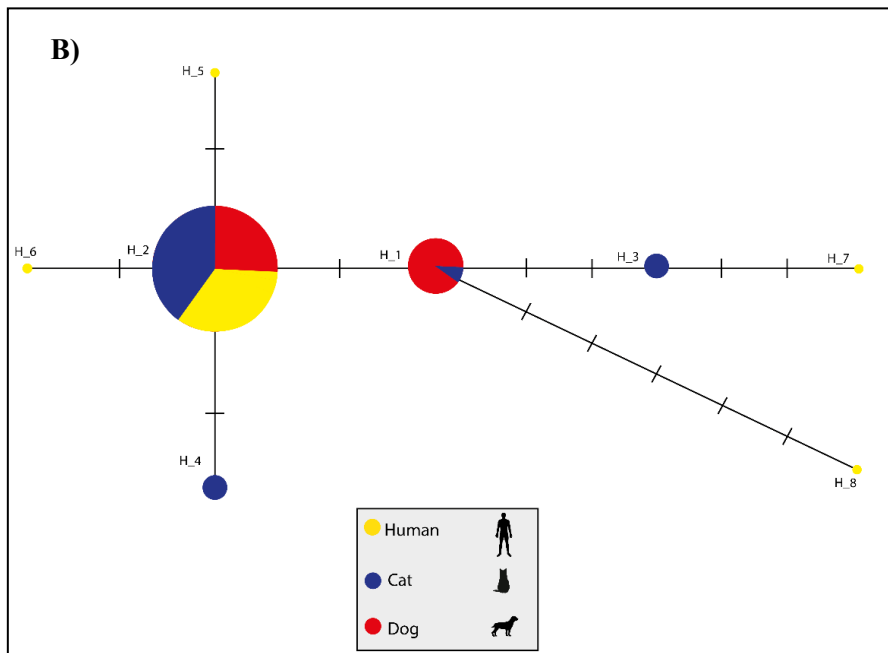
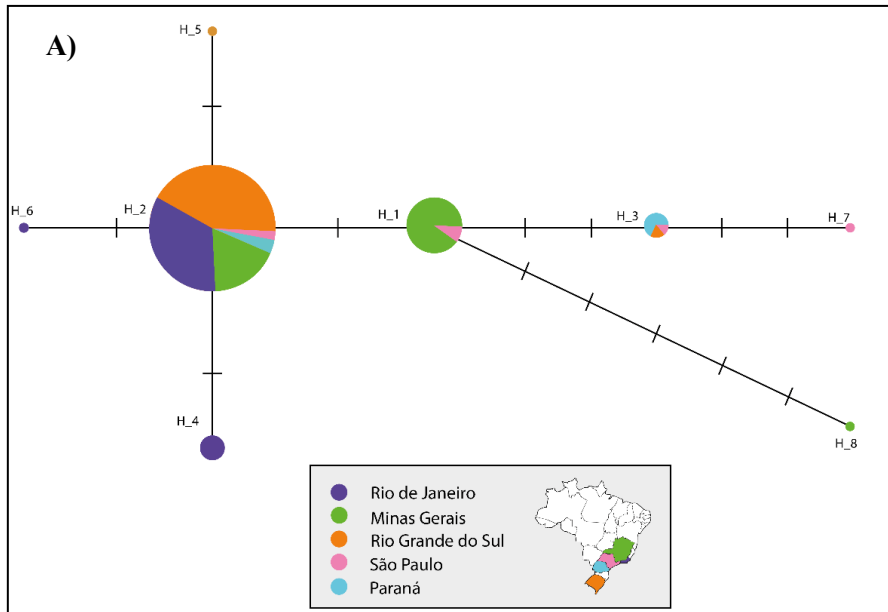


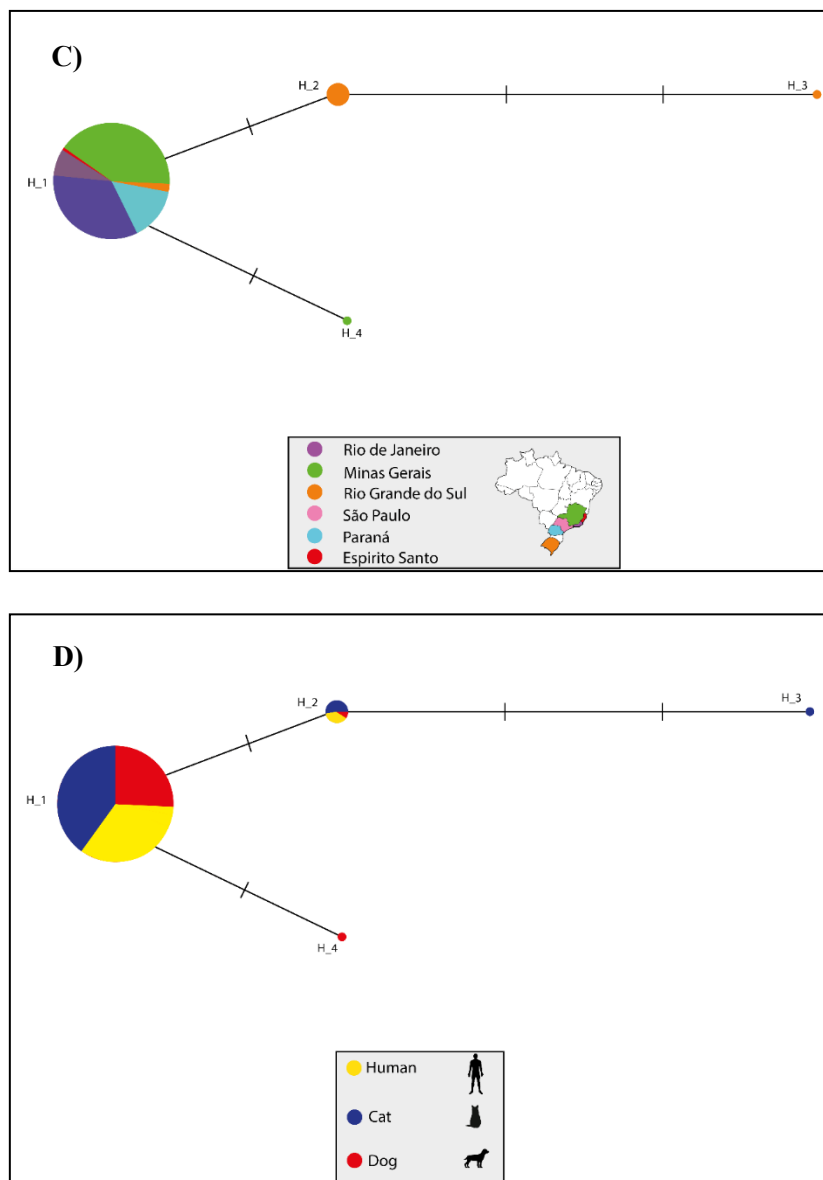


**Figura 6:** Árvore filogenética constituída pelos isolados estudados a partir do sequenciamento genético de isolados com alvo no gene do Fator de Elongação da Tradução-1 Alfa (EF1 $\alpha$ ).

A rede haplótipos construída, foi dividida em duas análises para cada gene, sendo uma com base nos estados de origem dos isolados e a outra baseada nos hospedeiros de cada isolado (Figura 7). Para o gene da CAL foram formados oito haplótipos distintos que englobam isolados de cinco estados diferentes (Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), São Paulo (SP), Rio Grande do Sul (RS) e Paraná (PR)). A rede formada com base no hospedeiro com o gene da CAL também evidenciou a formação de oito haplótipos, sendo o H2 constituídos por isolados de humanos, caninos e felinos, o H1 por isolados de caninos e felinos, H3 e H4 exclusivamente por isolados de felinos e H5, H6, H7 e H8 somente com isolados de humanos. Tanto na análise por localização geográfica quanto por hospedeiros, o H2 é o haplótipo predominante, com um grupo de grande diversidade genética, onde estão incluídos quatro dos 15 isolados desse estudo. E na rede de haplótipos com base nos hospedeiros, pode ser observado a predominância dos isolados caninos no H1 (11 isolados).

Na análise de haplótipos com o gene do EF1 $\alpha$  destaca-se a presença de quatro haplótipos, sendo compostos por isolados de seis estados (MG, RJ, SP, ES, RS e PR). Quando analisado a mesma rede em relação aos hospedeiros, observa-se que dois dos quatro haplótipos (H1 e H2) são compostos por isolados de cães, felinos e humanos, diferente do que ocorre no H3 e no H4, que apresentam somente isolados de cão e de gato, respectivamente. Cabe destacar a grande variação genética presente no H1, com isolados provenientes de 5 estados e contendo 14 das 15 isolados de canino avaliados nesse estudo. Além disso, houve nessa análise, a formação do H4 composto somente por um isoladocanino incluído no presente estudo. As análises de ambos os genes não apresentaram estruturação do fungo por hospedeiro.





**Figura 7** – **A)** Rede de haplótipos com gene da CAL por localização geográfica. **B)** Rede de haplótipos com gene da CAL por hospedeiros. **C)** Rede de haplótipos com gene da EF1 $\alpha$  por localização geográfica. **D)** Rede de haplótipos com gene da EF1 $\alpha$  por hospedeiros.

Para determinar o perfil de suscetibilidade antifúngica, o ponto de corte epidemiológico proposto por ESPINEL-INGROFF *et al.* (2017) foi utilizado, de modo que, amostras com valores de CIM de ITZ  $<2\mu\text{g/ml}$  são sensíveis e as com CIM  $\geq 2\mu\text{g/ml}$  são consideradas resistentes e no mesmo modelo, as amostras com valores de CIM para AB  $<4\mu\text{g/ml}$  e  $\geq 4\mu\text{g/ml}$  são as sensíveis e as resistentes, respectivamente. Os resultados do CIM analisados estão expressos na Tabela 3 e divididos de acordo com o ano de

isolamento do fungo. Para Anfotericina B os isolados variaram de 1-4 $\mu$ g/ml. Para Itraconazol os isolados variaram de 0,125-2 $\mu$ g/ml. Dessa forma, um dos nossos isolados (Sbc 07) foi resistente para Itraconazol e outro (Sbc 10) para Anfotericina B.

**Tabela 3** – Resultado dos testes de suscetibilidade para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para Anfotericina B e Itraconazol dos isolados avaliados em Minas Gerais.

Isolado	Ano	CIM Anfotericina B $\mu$ g/ml	CIM Itraconazol $\mu$ g/ml
Sbc 01	2021	2	0,125
Sbc 02	2020	2	1
Sbc 03	2020	1	0,5
Sbc 04	2021	2	1
Sbc 05	2021	2	1
Sbc 06	2018	1	0,25
Sbc 07	2019	2	2*
Sbc 08	2019	2	1
Sbc 09	2022	2	1
Sbc 10	2022	4*	0,5
Sbc 11	2022	1	1
Sbc 12	2022	2	0,5
Sbc 13	2022	1	1
Sbc 14	2022	1	1
Sbc 15	2022	0,25	0,25

\*Isolados resistentes foram definidos quando valores de CIM eram maiores ou igual 2 $\mu$ g/ml para ITZ e 4 $\mu$ g/ml para AMB segundo Espinel- Ingroff *et al.* (2017).

#### 4.4. DISCUSSÃO

A esporotricose vem se destacando pelo seu caráter emergente e pelos surtos em diversas regiões do país (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021; RODRIGUES *et al.*, 2022). Embora no Brasil essa zoonose tenha se tornado um problema sanitário principalmente no Rio de Janeiro, observa-se um aumento na frequência de casos humanos e animais no estado de Minas Gerais, o que preocupa as autoridades e pesquisadores da área da saúde. A esporotricose na capital do estado, Belo Horizonte, apresenta caráter zoonótico e está ocorrendo no momento em que se observa um grande crescimento da população felina no município (SANTOS *et al.*, 2018).

A esporotricose canina ainda apresenta poucos casos e estudos se comparado ao número registrado em felinos e humanos (BOECHAT *et al.*, 2021). Entretanto a doença

em cães demonstra um crescimento nos últimos anos, principalmente nos locais onde a esporotricose é endêmica para felinos. Além disso, relatos vem alertando profissionais da saúde para o papel do cão no ciclo da doença não só como um hospedeiro, mas também como um transmissor, inclusive para humanos (MADRID *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2017; POESTER *et al.*, 2018; NETO *et al.*, 2023). Isso reforça a necessidade de mais estudos para uma melhor compreensão da doença em cães e geração de conhecimento para a desenvolvimento de estratégias de controle da esporotricose sob a perspectiva da saúde única.

Analisando o perfil epidemiológico dos cães cujos isolados foram utilizados nesse estudo, observa-se uma predominância em machos, assim como já descrito por outros autores (SCHUBACH *et al.*, 2006; GUTERRES *et al.*, 2014; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Os cães machos em fase de reprodução, podem se deslocar por longas distancias, em busca de fêmeas, o que favorece o contato e brigas com animais que podem estar infectados com a doença, favorecendo assim a infecção desses cães (BAES PEREIRA *et al.*, 2022). O contato com felinos ainda é a principal forma de transmissão do fungo para outros hospedeiros e no nosso estudo esse dado também foi comprovado, reforçando que a forma de transmissão horizontal do gato ao cão é uma importante fonte de infecção seja pelo contato direto com lesões ou através de brigas (SCHUBACH *et al.*, 2006).

A forma clínica de lesões mais comum em caninos é a cutânea fixa, com apresentação ulcerada ou nodular (FIDELIS GONSALES *et al.*, 2015). A forma linfocutânea é menos comum nos cães e a cutânea disseminada mais rara, estando relacionada a um comprometimento imunológico do cão para que se instale a doença dessa forma (WHITTEMORE & WEBB, 2007; MADRID *et al.*, 2012). Também é comum que as lesões sejam encontradas no plano nasal (BOECHAT *et al.*, 2021) assim como foi observado na maioria dos cães que tiveram seus isolados incluídos nesse estudo.

Outro dado observado entre os isolados desse estudo, é que os cães acometidos com esporotricose tiveram seu diagnóstico em sua maioria no outono (46,66%) e inverno (26,66%). Tal fato foi o relatado também por Baes Pereira (2022), que sugere que a infecção provavelmente ocorra nas épocas mais quentes do ano e o diagnóstico posteriormente, nas estações mais frias. Entretanto, ainda são escassos os dados sobre a

sazonalidade da doença no país, mas acredita-se que a esporotricose ocorro com maior frequência no verão (SILVA *et al.*, 2019; BAES PEREIRA *et al.*, 2022).

O cultivo dos isolados caninos apresentaram o aspecto característico para os fungos do gênero *Sporothrix*, com destaque para a pigmentação que foi observada nas colônias com o decorrer dos dias (MADRID *et al.*, 2012; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). Entretanto, apenas a observação macromorfológica do cultivo não é suficiente para a determinação da espécie fúngica, sendo necessário a utilização de outras técnicas para tal identificação, assim como já descrito na literatura (RODRIGUES *et al.*, 2020).

A identificação molecular que teve início com o PCR espécie-específico evidenciou que todos os isolados são *S. brasiliensis*, não havendo nenhuma outra espécie de *Sporothrix* spp. circulando entre os animais. Isso reforça a predominância dessa espécie acometendo cães da região Sudeste (RODRIGUES *et al.*, 2014; BOECHAT *et al.*, 2021). Além disso, estudos apontam o *S. brasiliensis* como a espécie responsável pela expansão da doença e surtos epizooticos que ocorrem no país (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2022).

A análise filogenética para o gene da CAL apresentou a formação de um grande clado composto por *S. brasiliensis*, onde todos os isolados caninos obtidos nesse trabalho, concentram-se exclusivamente nesse clado monofilético. Enquanto no clado de *S. schenckii* observa-se a formação de pequenos cladros dentro do mesmo grupo, o que mostra uma variação interespecífica entre os isolados e a capacidade do gene da CAL em esclarecer tais aspectos. Entretanto, os valores obtidos nas análises não permitem fazer maiores inferências a respeito de tais variações. Na árvore construída pelo sequenciamento do gene do EF1 $\alpha$  é possível observar a formação de pequenos cladros internos ao grande clado de *S. schenckii*, o que sugere uma variação intraespecífica entre os isolados de *S. schenckii* analisados. Além disso, em ambas as árvores, *S. brasiliensis* apresenta uma baixa diversidade se comparada ao *S. schenckii* o que pode estar relacionado a ausência de recombinação na espécie (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013).

As duas árvores filogenéticas geradas demonstram a grande relevância de *S. brasiliensis* para a epidemiologia da doença em cães, por ser a principal espécie relacionada aos casos de esporotricose canina e a principal espécie circulante em outros

hospedeiros no país, principalmente em regiões onde a doença é endêmica (BOECHAT *et al.*, 2021; BAES PEREIRA *et al.*, 2022). Esses resultados corroboram com estudos que descreveram *S. brasiliensis* como uma espécie clonal (RODRIGUES *et al.*, 2013; MONTENEGRO *et al.*, 2014).

Os resultados da análise da rede de haplótipos para o gene CAL sugerem que não há uma estruturação de haplótipos por hospedeiros, nem diferenciação das linhagens pelo hospedeiro, o que indica que *S. brasiliensis* pode infectar vários hospedeiros e que ainda não houve uma adaptação específica para diferentes espécies. Além disso, cabe destacar a grande diversidade genética contida no H2, onde há a predominância de isolados do Rio Grande do Sul. Os haplótipos H7 e H8 que são observados nas extremidades são sugestivos de expansão recente. Na análise com alvo no gene EF1 $\alpha$  o haplótipo H1 é o de maior diversidade genética em relação a origem dos isolados e onde observa-se a predominância de cepas do estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais. De forma similar ao gene da CAL, os resultados também são sugestivos de que não há uma estruturação de haplótipos nem diferenciação por hospedeiros e que os haplótipos H3 e H4 podem estar relacionados a expansão recente do fungo. Cabe destacar ainda que o H4 é composto somente por uma amostra canina proveniente de Minas Gerais.

Os valores obtidos no CIM mostram que há dois isolados resistentes dentro das amostras que compõe o estudo, revelando o risco de cepas resistentes circulando entre caninos em Minas Gerais. Esse dado é de extrema importância, uma vez que, há poucos estudos sobre a resistência à antifúngicos em isolados caninos. Baes Pereira *et al.* (2022) demonstraram que 70% dos isolados caninos que foram submetidos ao teste de suscetibilidade *in vitro* apresentaram resistência ao ITZ em seu estudo conduzido no estado do Rio Grande do Sul. Além disso, Boechat *et al.* (2021) descreveram em seu estudo a resistência a Anfotericina B em isolados caninos provenientes do estado do Rio de Janeiro, o que reforça a importância dos testes de suscetibilidade para auxiliar na escolha de um tratamento assertivo para a zoonose.

Ainda são escassos os dados disponíveis na literatura sobre as diferentes técnicas moleculares, associados a dados clínicos e testes como MIC para isolados exclusivamente caninos. Esse estudo abordou uma associação de técnicas que se mostraram eficientes para exibir novos dados sobre a epidemiologia molecular da esporotricose canina,



destacando a eficiência do gene da CAL e do EF1 $\alpha$  para proporcionar dados sobre diferenciações interespecíficas e intraespecíficas nos isolados de *S. brasiliensis* de Minas Gerais. Uma atenção maior ao tratamento é requerida pela observação da circulação de isolados resistentes a Itraconazol e Anfotericina B. Considerando o contexto da doença e os dados gerados pelo estudo, entende-se que o cão necessita um local de destaque na epidemiologia desta enfermidade, uma vez que, o número de casos de esporotricose nesta espécie vem aumentando.

## REFERÊNCIAS

1. ANDRADE, E. H. P. *et al.* Characterization of animal sporotrichosis in a highly urbanized area. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 76, n. January, p. 1–6, 2021.
2. BAES PEREIRA, S. *et al.* Sporotrichosis in dogs: epidemiological and clinical-therapeutic profile and the emergence of itraconazole-resistant isolates. *Medical Mycology*, v. 60, n. 12, p. 1–5, 6 nov. 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/doi/10.1093/mmy/myac089/6862100>>.
3. BOECHAT, J. S. *et al.* Canine sporotrichosis: polyphasic taxonomy and antifungal susceptibility profiles of *Sporothrix* species in an endemic area in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 135–143, 2021.
4. CAFARCHIA, C. *et al.* Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from southern Italy: Case report. *Mycopathologia*, v. 163, n. 2, p. 75–79, 2007.
5. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3th ed.*, v. 28, n. 14, p. 0–13, 2008. Disponível em: <[https://clsi.org/media/1461/m27a3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf)>.
6. ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 10, p. 1–8, out. 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01057-17>>.

7. ETCHECOPAZ, A. *et al.* Sporothrix brasiliensis: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 3, p. 1–33, 2021.
8. FIDELIS GONSALES, F. *et al.* Esporotricose em cão Yorkshire Terrier na cidade de São Paulo, SP – Brasil: relato de caso. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 74, n. 4, p. 453–457, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33500>>.
9. GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2014.
10. GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 107–124, 29 mar. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s42770-020-00365-3>>.
11. GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. 2–8, 2017.
12. GUTERRES, K. A. *et al.* The Use of (1–3)  $\beta$ -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. *Mycopathologia*, v. 177, n. 3–4, p. 217–221, 2014.
13. KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
14. LONDERO, A. T.; DE CASTRO, R. M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. *Medical Mycology*, v. 3, n. 4, p. 273–274, 1964.
15. MADRID, I. M. *et al.* Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*, v. 173, n. 4, p. 265–273, 2012.
16. MADRID, I. M. *et al.* Esporotricose óssea e cutânea em canino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 6, p. 441, 2007.
17. MARIMON, R. *et al.* Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana, three new Sporothrix species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 10, p. 3198–3206, 2007.
18. MASCARENHAS, M. B. *et al.* Canine sporotrichosis: Report of 15 advanced

- cases. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 38, n. 3, p. 477–481, 2018.
19. MIRANDA, L. H. M. *et al.* Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis of sporotrichosis in dogs. *Veterinary Journal*, v. 190, n. 3, p. 408–411, 2011.
  20. MONTENEGRO, H. *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, 2014.
  21. MORGADO, D. S. *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 3, n. March, p. 100140, 2022.
  22. NETO, F. B. DA S. *et al.* Dog-transmitted ocular sporotrichosis. *Journal of Medical Mycology*, v. 33, n. 1, p. 5–6, 2023.
  23. NGUYEN, L. T. *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.
  24. NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre Uppsala University*, v. 2, n. January 2004, p. 1–2, 2004. Disponível em: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:MrModeltest#0>.
  25. O'DONNELL, K. *et al.* A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, v. 41, n. 1, p. 61–78, jan. 2000. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354000708333>.
  26. POESTER, V. R. *et al.* Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*, v. 65, n. 7, p. 815–821, 2018.
  27. QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Sporotrichosis in Children: Case series and Narrative Review. *Current Fungal Infection Reports*, v. 16, n. 2, p. 33–46, 2022.
  28. RAMBAUT, A. *et al.* Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.
  29. RAMOS, A. C. M. O. *et al.* Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.
  30. RODRIGUES, A. M. *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and

- Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 8, 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35893145>>.
31. RODRIGUES, A. M. *et al.* Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 6, 2013.
  32. RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.
  33. RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 78, n. 4, p. 383–387, abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004>>.
  34. RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2015.
  35. RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Medical Mycology*, v. 51, n. 4, p. 405–412, 2012.
  36. RONQUIST, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.
  37. SANCHOTENE, K. O. *et al.* *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.
  38. 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 Mycology*, v. 44, n. 1, p. 87–92, 2006.
  39. SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Case report: Disseminated sporothrix brasiliensis infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 3, p. 477–480, 2012.
  40. SILVA, F. B. *et al.* Climate drivers of hospitalizations for mycoses in Brazil. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

41. SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology*. [S.l.]: Wiley, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471650129.dob0522>>.
42. THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.
43. VIANA, P. G. *et al.* Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. *Mycopathologia*, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018.
44. WHITTEMORE, J. C.; WEBB, C. B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, v. 48, n. 4, p. 411–414, 2007.
45. ZHOU, X. *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*, v. 66, n. 1, p. 153–165, 2014.

## APENDICE: TABELA SUPLEMENTAR

**Tabela Suplementar 1** - Isolados utilizados nas análises filogenéticas e seus dados complementares: códigos de isolado e CBS, espécie, códigos de depósitos no GenBank, referências e origem geográfica.

Isolate code	CBS code	Species	Source	GenBank		Reference	Geographic origin
				CAL	EFla		
Ss05	CBS 132985	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693830	KC576544	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
Ss53	CBS 132989	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693846	KC576568	[31]	Rio Grande, RS, Brazil
Ss54	CBS 132990	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	K2041903	KC576569	[31]	Rio Grande, RS, Brazil
Ss152	CBS 132995	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693865	KC576596	[31]	Pelotas, RS, Brazil
Ss153	CBS 132996	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693866	KC576597	[31]	Pelotas, RS, Brazil
Ss154	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693867	KC576598	[31]	Pelotas, RS, Brazil
Ss155	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693868	KC576599	[31]	Pelotas, RS, Brazil
Ss156	CBS 132997	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693869	KC576600	[31]	Pelotas, RS, Brazil
51157	CBS 132998	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693870	KC576601	[31]	Pelotas, RS, Brazil
51171	CBS 132999	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693871	KC576602	[31]	Londrina, PR, Brazil
Ss172	CBS 133000	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693872	KC576603	[31]	Londrina, PR, Brazil
Ss173	CBS 133001	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693873	KC576604	[31]	Londrina, PR, Brazil
Ss174	CBS 133002	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693874	KC576605	[31]	Londrina, PR, Brazil
Ss226	CBS 133003	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693875	KC576616	[31]	São Paulo, SP, Brazil
Ss245	CBS 133005	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693878	KC576619	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss246	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693879	KC576620	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss247	CBS 133006	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693880	KC576621	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss248	CBS 133007	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693881	KC576622	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss249	CBS 133008	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693882	KC576623	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss250	CBS 133009	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693883	KC576624	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss251	CBS 133010	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693884	KC576625	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss252	CBS 133011	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693885	KC576626	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss253	CBS 133012	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693886	KC576627	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss254	CBS 133013	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693887	KC576628	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss255	CBS 133014	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693888	KC576629	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss256	CBS 133015	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693889	KC576630	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
Ss257	CBS 133016	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693890	KC576631	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<b>Ss258</b>	CBS 133017	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693891	KC576632	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss259</b>	CBS 133018	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693892	KC576633	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss260</b>	CBS 133019	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Feline sporotrichosis	KC693893	KC576634	[31]	Pelotas, RS, Brazil
<b>Ss151</b>	CBS 132994	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	KC693864	KC576595	[31]	Pelotas, RS, Brazil
<b>Ss227</b>	CBS 133004	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	KC693876	KC576617	[31]	São Paulo, SP, Brazil
<b>Ss07</b>	CBS 132986	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693831	KC576546	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss08</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693832	KC576547	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss09</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693833	KC576548	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss10</b>	CBS 132987	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693834	KC576549	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss12</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693835	KC576550	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss25</b>	CBS 132988	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693840	KC576556	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss27</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	JX077111	KC576558	[35]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss38</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693844	KC576563	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss52</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693845	KC576567	[31]	São Paulo, SP, Brazil
<b>Ss55</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693847	KC576570	[31]	Rio Grande, RS, Brazil
<b>Ss56</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693848	KC576571	[31]	Rio Grande, RS, Brazil
<b>Ss62</b>	CBS 132991	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	JX077113	KC576572	[35]	Vila Velha, ES, Brazil
<b>Ss69</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693849	KC576575	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss70</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693850	KC576576	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss71</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693851	KC576577	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss72</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693852	KC576578	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss79</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693856	KC576582	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss82</b>	CBS 132992	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693857	KC576584	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss87</b>	CBS 132993	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693858	KC576585	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss125</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	JX077116	KC576588	[35]	Campinas, SP, Brazil
<b>Ss128</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693861	KC576589	[31]	Campinas, SP, Brazil
<b>Ss149</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693862	KC576593	[31]	Pelotas, RS, Brazil
<b>5s150</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693863	KC576594	[31]	Pelotas, RS, Brazil
<b>CBS 120339<sup>T</sup></b>	CBS 120339 <sup>T</sup>	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	AM116899	KC576606	[17]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>IPEC 16919</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	AM116898	KC576607	[17]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss261</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	KC693894	KC576635	[31]	Pelotas, RS, Brazil
<b>Ss265</b>	CBS 133020	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Human sporotrichosis	JN204360	KC576636	[39]	Uberaba, MG, Brazil
<b>Ss01</b>	CBS 132961	<i>Sporothrix schenckii</i>	Felina sporotrichosis	KC693828	KC576540	[31]	São Paulo, SP, Brazil

<b>Ss02</b>	CBS 132962	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693829	KC576541	[31]	Porto Alegre, RS, Brazil
<b>Ss03</b>	CBS 132963	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	10077117	KC576542	[31]	Porto Alegre, RS, Brazil
<b>Ss04</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	JX077118	KC576543	[31]	Porto Alegre, RS, Brazil
<b>Ss13</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693836	KC576551	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss15</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693837	KC576552	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss17</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693838	KC576553	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss20</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	JX077119	KC576554	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss24</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693839	KC576555	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss26</b>	CBS 132965	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693841	KC576557	[30]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss28</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	JX077121	KC576559	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss31</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	JX077122	KC576560	[31]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss35</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693842	KC576561	[30]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss36</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693843	KC576562	[30]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss39</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	K2041899	KC576564	[30]	Curitiba, PR, Brazil
<b>Ss63</b>	CBS 132968	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	J0077123	KC576573	[31]	Vila Velha, ES, Brazil
<b>Ss64</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	10077124	KC576574	[31]	Vila Velha, ES, 8011/
<b>Ss73</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693853	KC576579	[30]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss75</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693854	KC576580	[30]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss78</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693855	KC576581	[30]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss80</b>	CBS 132969	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	JX077125	KC576583	[31]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss90</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693859	KC576586	[30]	Rio de Janeiro, RJ, Brazil
<b>Ss111</b>	CBS 132971	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	KC693860	KC576587	[30]	São Paulo, SP, Brazil
<b>Ss143</b>	-	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	10041903	KC576592	[31]	Belém, PA, Brazil
<b>CBS 35936<sup>T</sup></b>	CBS 359.361	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	AM117437	KC576614	[17]	Estados Unidos
<b>CBS93872</b>	CBS 93872	<i>Sporothrix schenckii</i>	Human sporotrichosis	AM490340	KC576637	[17]	França
<b>Ss06</b>	CBS 132922	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	JF811336	KC576545	[31]	Belo Horizonte, MG, Brazil
<b>Ss41</b>	CBS 132923	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	JF811337	KC576565	[31]	Fortaleza, CE, Brazil
<b>Ss49</b>	CBS 132924	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	1F811338	KC576566	[31]	Goiânia, GO, Brazil
<b>CBS 120340<sup>T</sup></b>	CBS 120340 <sup>T</sup>	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	AM116908	KC576608	[17]	Espanha
<b>CBS 130104</b>	CBS 130104	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	AM116905	KC576609	[17]	Espanha
<b>Ss236</b>	CBS 132925	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	KC693877	KC576618	[30]	Minas Gerais, MG, Brazil
<b>FMR 8598</b>	C85130116	<i>Sporothrix globosa</i>	Human sporotrichosis	AM116903	KC576638	[17]	Espanha
<b>CBS 937.72<sup>T</sup></b>	CBS 937.72 <sup>T</sup>	<i>Sporothrix luriei</i>	Human sporotrichosis	AM747302	KC576615	[17]	África do Sul
<b>Ss132</b>	CBS 132927	<i>Sporothrix mexicana</i>	Human sporotrichosis	JF811340	KC576590	[31]	São Paulo, SP, Brazil



<b>Ss133</b>	CBS 132928	<i>Sporothrix mexicana</i>	Human sporotrichosis	/9811341	KC576591	[31]	Recife, PE, Brazil
<b>CBS 120342</b>	CBS 120342	<i>Sporothrix mexicana</i>	Vegetal	AM398392	KC576610	[17]	Mexico
<b>CBS 120341<sup>T</sup></b>	CBS 120341 <sup>T</sup>	<i>Sporothrix mexicana</i>	Soil	AM398393	KC576611	[17]	Mexico
<b>CBS 302.73<sup>T</sup></b>	CBS 302.731	<i>Sporothrix pallida</i>	Soil	AM398396	KC576612	[17]	Reino Unido
<b>CBS 111110</b>	CBS 111110	<i>Sporothrix pallida</i>	Insect	AM398382	KC576613	[17]	Alemanha
<b>MW602638</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602638	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602639</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602639	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602640</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602640	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602641</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602641	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602642</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602642	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602644</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602644	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602643</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602643	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602645</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602645	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602647</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602647	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil
<b>MW602646</b>	-	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Canine sporotrichosis	MW602646	-	[2]	Rio Grande do Sul – Brazil

Abreviaturas: **Ss**, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP); **IPEC**, Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Fiocruz, Brasil; **FMR**, Faculdade de Medicina e Ciências da Saúde, Reus, Espanha; **CBS**, *Centraalbureau voor Schimmel Cultures*, Utrecht, Holanda; **T**, *tension type*. Representação dos estados brasileiros: **MG**, Minas Gerais; **RS**, Rio Grande do Sul; **PR**, Paraná; **SP**, São Paulo; **RJ**, Rio de Janeiro; **ES**, Espírito Santo; **PA**, Pará; **CE**, Ceará; **GO**, Goiás e **PE**, Pernambuco.

## 5. CAPÍTULO 3 – MANUSCRITO - O PAPEL DOS CÃES NA TRANSMISSÃO ZOONÓTICA DA ESPOROTRICOSE NA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS: RELATO DE CASOS

### RESUMO

A esporotricose é uma micose cosmopolita e negligenciada que afeta os animais e os seres humanos. Atualmente o Brasil é o país que mais apresenta casos tanto em humanos quanto em animais. Os felinos são os mais acometidos e também a espécie envolvida com maior frequência na transmissão zoonótica da doença. A doença nos cães apresenta um número menor quando comparada aos felinos, entretanto, observa-se um número crescente de esporotricose canina no Brasil, principalmente nas regiões onde os surtos são registrados, como é o caso dos municípios do Rio de Janeiro e Belo Horizonte. A expansão da esporotricose, causada principalmente pela transmissão zoonótica da espécie *Sporothrix brasiliensis* está relacionada a quadros clínicos atípicos e com tratamento complexo em humanos e animais. Os relatos em humanos a partir de casos animais são de extrema importância para compreensão da epidemiologia da doença e contribuição científica, através de novos dados gerados para divulgação. Diante disso, este trabalho tem como objetivo relatar dois casos de esporotricose canina com transmissão zoonótica para humanos. No primeiro caso relatado o animal apresentava a doença na forma cutânea fixa e seu tutor se infectou a partir do contato direto com a lesão durante o manejo do animal, o que resultou em um quadro de esporotricose com lesões graves. No segundo caso o cão também apresentava a forma cutânea fixa e transmitiu o agente para seu tutor a partir de mordedura, levando o mesmo a desenvolver a enfermidade. Em ambos os casos, os tutores e seus animais tiveram o diagnóstico e tratamento adequados, entretanto, o cão do primeiro caso foi a óbito enquanto o cão do segundo caso permanece vivo e em tratamento. Os tutores acometidos com a esporotricose ainda se encontram em acompanhamento médico e seguem em tratamento para a zoonose. Esse é o primeiro relato de transmissão zoonótica da esporotricose de cão para humano em Belo Horizonte.

Palavras-chaves: esporotricose, cão, zoonose, *Sporothrix* spp., saúde pública.

## 5.1. INTRODUÇÃO

De caráter subagudo e com distribuição mundial, a esporotricose é uma importante zoonose causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*. É uma infecção considerada endêmica em países tropicais e subtropicais como o Brasil, sendo *Sporothrix brasiliensis* a principal espécie circulante no país, a mais disseminada pela transmissão zoonótica e a causadora de quadros atípicos e com tratamentos complexos devido à resistência fúngica aos fármacos disponíveis (DE BEER *et al.*, 2016; GREMIÃO *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). A esporotricose tem representado uma grande preocupação para a saúde pública, principalmente pelos milhares de casos já registrados por todos países e sua expansão aos países vizinhos, como a Argentina e Paraguai (POESTER *ET AL.*, 2022; RODRIGUES *et al.*, 2022). *Sporothrix brasiliensis* é o responsável pelo surto epizootico em curso no Brasil (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2022). As regiões Sudeste e a Sul são as que mais apresentam relatos de casos, tanto em humanos quanto em animais, sendo o Rio de Janeiro considerado como o epicentro da esporotricose no país (GREMIÃO *et al.*, 2017; PAIVA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2020).

A infecção pode ocorrer através de duas vias. A via sapronótica ocorre a partir da inoculação traumática do fungo presente em plantas e solos contaminados diretamente na pele do hospedeiro. Na via zoonótica, a transmissão se dá pela mordedura ou arranhão de animais infectados, mas também pode ocorrer pelo contato dos tutores com as lesões e secreções dos animais doentes (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2019).

Os felinos são os principais responsáveis pela transmissão zoonótica da doença no país (GREMIÃO *et al.*, 2021). A esporotricose em cães ainda é considerada incomum, entretanto, há um aumento no número de casos de cães acometidos, principalmente os que convivem com os felinos infectados nas áreas de surto da doença (MADRID *et al.*, 2007; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Ademais, estudos recentes mostram que o cão participa do ciclo de transmissão zoonótica, ocasionando casos de esporotricose em humanos (RAMOS *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2023). A doença em humanos pode apresentar a forma cutânea fixa, linfocutânea, cutânea disseminada e a apresentação clínica mais grave, com acometimento sistêmico, representando grande risco aos

pacientes com comorbidades e imunossuprimidos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020).

Diante disso, relata-se dois casos de esporotricose canina com transmissão zoonótica para humanos, ocorridos na região metropolitana de Belo Horizonte, contribuindo com novos dados sobre o potencial de transmissão dessa doença de cães para humanos.

## **5.2. RELATO DE CASO**

### **5.2.1. Caso 1**

No dia 13 de julho de 2022, um cão da raça labrador, macho, de dez anos foi atendido em uma clínica particular no município de Vespasiano, em Minas Gerais com queixa de uma lesão ulcerada não recente localizada na região dorsal do animal. O cão já havia passado por outras consultas, sem sucesso no diagnóstico e tratamento. O animal também estava em tratamento para hepatopatia crônica com quadro estável. O cão era domiciliado em quintal com gramado e plantas, sem acesso a rua e sem convívio com felinos. Durante a avaliação clínica, o paciente foi examinado e seus parâmetros fisiológicos apresentavam-se dentro da normalidade, entretanto foi observada a presença uma lesão na região torácica dorsal com cerca de 5cm de diâmetro e aspecto granulomatoso com secreção sanguinolenta (Figura 8A). Diante da suspeita de piodermatite, foi prescrito o tratamento com antibiótico sistêmico. No mesmo dia, também foi coletada amostra para teste sorológico de leishmaniose e agendado um retorno ao fim do tratamento prescrito.

O animal realizou o tratamento com antibiótico e em nova avaliação, o tutor relatou que não houve melhora do quadro. O resultado de sorologia para leishmaniose foi negativo. E diante da suspeita de outros diagnósticos diferenciais como neoplasias e outras dermatopatias, foi realizado uma biópsia cutânea da lesão avaliada (Figura 8B). O exame histopatológico evidenciou que o material analisado se tratava de um fragmento de pele com paniculite piogranulomatosa multifocal a coalescente acentuada, crônica, associada a estruturas fúngicas arredondadas e ovaladas intralesionais, sugestivo de esporotricose. Diante dos resultados dos exames complementares, foi prescrito itraconazol 450mg/SID por 30 dias, Omeprazol 20mg/SID por 30 dias e Silimarina

100mg/SID também por 30 dias. Os tutores foram informados a respeito da micose, sobre os cuidados com o animal e a higiene ambiental para evitar a contaminação do ambiente e a possibilidade de transmissão para as pessoas que conviviam com o cão.



**Figura 8:** A) Lesão em região torácica, ulcerada, com aspecto granulomatoso, secreção sanguinolenta no momento do atendimento veterinário. B) Animal após a realização da biópsia para exame histopatológico.

O tutor do cão, um homem, idoso de 63 anos, antes mesmo do diagnóstico de esporotricose, realizava diariamente a medicação oral do paciente canino, assim como a limpeza da ferida, sem utilizar nenhum equipamento de proteção individual. Cerca de 30 dias após o diagnóstico do cão, o idoso apresentou uma lesão no polegar direito, de aspecto ulcerado, tecido granulomatoso, edemaciado e presença de secreção sanguinolenta, com cerca de seis centímetros de diâmetro, acometendo a falange média e distal (Figura 9A). O tutor buscou por atendimento médico e relatou que seu animal foi diagnosticado com esporotricose e que ele medicava e cuidava da lesão do animal diariamente sem uso de luvas. Diante do histórico e da avaliação clínica, o diagnóstico de esporotricose foi confirmado com a hospitalização do paciente para início do tratamento.

O paciente canino, após o diagnóstico de esporotricose retornou para o seu domicílio, porém, apresentou um quadro descompensatório de hepatopatia crônica, resultando em óbito por encefalopatia hepática impedindo o início do tratamento para esporotricose. O tutor do animal seguiu hospitalizado para o desbridamento do tecido

necrosado (Figura 9B) e seguiu em tratamento para a zoonose utilizando itraconazol na dose de 200mg/SID.



**Figura 9:** A) Lesão em polegar do tutor no dia do atendimento médico. B) Lesão após procedimento de desbridamento realizado no Hospital que acompanha o caso.

### 5.2.2. Caso 2

Um canino da raça Shih Tzu, macho, não castrado, três anos foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais no mês de agosto de 2022, após o animal apresentar uma lesão em plano nasal. Segundo os tutores, o cão já havia passado por outros atendimentos e realizado outros tratamentos, entretanto, em nenhum deles houve melhora do quadro clínico. A lesão em questão havia surgido após o animal brigar com gatos de vida livre que entraram no domicílio, segundo relato dos tutores. A lesão apresentada inicialmente era nodular, com rápido crescimento, com presença de secreção esverdeada. Além disso, o animal apresentava alteração do quadro respiratório, com muita dificuldade para respirar e ruído atípico. Com o passar dos dias a lesão nodular ulcerou apresentado sangramento e o acúmulo de crostas, dificultando mais ainda a respiração do paciente. O cão apresentou sorologia negativa para Leishmaniose. Ao examinar o paciente, foi observado que a deformação do plano nasal e o intenso edema da região havia obstruído as narinas do cão. Diante do histórico e da alteração observada, suspeitou-se de esporotricose. Foi prescrito para o animal por via oral itraconazol 50mg/BID até novas recomendações no retorno em 30 dias.

No retorno, o animal veio para nova avaliação clínica apresentando involução parcial nos sinais, de forma que, foi mantido o tratamento por mais um mês para completa resolução do quadro. Porém, após observar uma considerável melhor no aspecto da lesão, a tutora suspendeu a medicação do cão sem orientação veterinária e não retornou para acompanhamento do quadro. Algumas semanas depois, o cão apresentou recidiva no quadro e necessitou passar por novo atendimento.

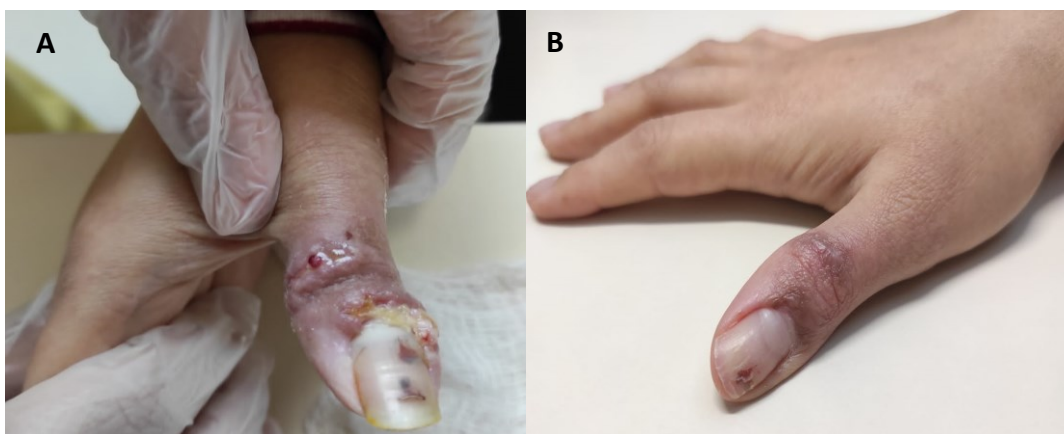
Durante a nova avaliação clínica, o animal apresentava-se prostrado com intenso ruído respiratório e recidiva na lesão do plano nasal, com quadro de esporotricose na forma cutânea fixa, lesão ulcerada e grande volume de secreção sanguinolenta. Diante disso, o tratamento com itraconazol foi retomado em associação ao iodeto de potássio e solicitação de retorno em 30 dias para nova avaliação.

A tutora é uma mulher, jovem, 26 anos, doente renal crônica e que realiza hemodiálise periodicamente. Durante o acompanhamento nefrológico a tutora relatou ao seu médico que seu cão com esporotricose mordeu seu polegar direito, surgindo no local, após um mês do acidente, uma lesão cutânea (Figura 10A), dores nas articulações do membro do dedo acometido e dor ao respirar. Diante disso, a paciente foi hospitalizada para realização do seu procedimento de hemodiálise e foi solicitada ao setor de dermatologia do Hospital da Baleia em Belo Horizonte, Minas Gerais, uma avaliação da lesão da paciente. Durante o atendimento pela dermatologista, foi coletado material para exames complementares, através de raspado profundo, para realização de cultura fúngica. Em dez dias o resultado da cultura foi positivo para crescimento de fungos do gênero *Sporothrix*. Sendo assim, foi prescrito para a paciente com itraconazol via oral, na dose de 200mg a cada 12 horas por 90 dias e retornos periódicos foram agendados para acompanhamento, assim como, uma consulta com o médico infectologista para melhor acompanhamento do quadro de esporotricose humana.

A mulher seguiu o tratamento em casa e não retornou para o acompanhamento, suspendendo a medicação após os 90 dias prescritos quando viu melhora da lesão (Figura 10B). Entretanto, após dois meses, a lesão no dedo recidivou e a paciente optou por voltar a tomar a medicação por conta própria, sem orientação médica. Nesse período ela retornou ao hospital e relatou os acontecimentos à dermatologista que a diagnosticou

inicialmente. A médica recomendou que passasse pela avaliação de um médico infectologista uma vez que a paciente tem comorbidades e apresentou recidiva no quadro.

Até o presente momento a mulher ainda não havia consultado um infectologista para acompanhamento do seu tratamento. O cão está em tratamento e sob cuidados da sua família, mas ainda não houve completa cura clínica de seu quadro.



**Figura 10:** **A)** Lesão em polegar direito de tutora no dia do seu relato e primeiro atendimento no hospital. Lesão com aspecto ulcerado, granulomatoso e com secreção serosanguinolenta. **B)** Lesão em polegar após 90 dias de tratamento com Itraconazol 200mg/BID.

### 5.3. DISCUSSÃO

A esporotricose é uma micose endêmica de grande relevância na saúde pública. Atualmente o Brasil é o país onde há mais registros de esporotricose canina em todo mundo (MADRID *et al.*, 2012; VIANA *et al.*, 2018). A doença tem se expandido rapidamente por todos os estados do Brasil, provocando surtos principalmente pela via zoonótica, destacando o papel dos felinos na transmissão para humanos. Os casos de esporotricose felina em Minas Gerais são relatados desde 2015 e apresentam constante crescimento, porém, observa-se um aumento do número de casos caninos, principalmente nos locais de surtos em que os cães estão em contato direto com os felinos doentes (MACÊDO-SALES *et al.*, 2018; MASCARENHAS *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2018; LECCA *et al.*, 2020).



Cães se infectam comumente pelo contato com gatos doentes através de mordidas e arranhões durante as brigas. Há ainda a possibilidade de infecção devido ao contato com o solo contaminado, principalmente durante atividades de caça, onde os cães farejam e cavam o solo, além dos traumas que podem ser ocasionados por plantas contaminadas no ambiente (BOECHAT *et al.*, 2021; ANDRADE *et al.*, 2022b). Os relatos de ambos os casos do presente estudo mostram as duas formas de infecção pelos pacientes caninos, sendo o paciente do caso dois, infectado após ter sido arranhado por gatos de vida livre que provavelmente estavam infectados com a esporotricose. Já o paciente do primeiro relato, não tem histórico de contato com gatos, o que reforça a possibilidade do animal ter se infectado pela via sapronótica, após lesão traumática não observada inicialmente pelos seus tutores. A literatura descreve abundantemente as duas formas de infecção apresentadas pelos caninos nos nossos relatos, contato com felino infectado e ambiente contaminado (BAES PEREIRA *et al.*, 2022; MASCARENHAS *et al.*, 2018; NETO *et al.*, 2023; RODRIGUES *et al.*, 2022).

Entretanto, raros estudos demonstram o cão infectado como possível transmissor para humanos e o seu completo papel na epidemiologia da doença. É importante uma atenção ao crescente número de casos caninos e sua contribuição na expansão da esporotricose humana (RAMOS *et al.*, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020; NETO *et al.*, 2023). Em ambos os casos relatados nesse estudo, os tutores realizavam o manejo diário dos seus animais infectados apresentando contato direto com lesões e secreções sem proteção. Há divergências entre os dois relatos quanto a inoculação do fungo, sendo o primeiro relato o tutor infectado apenas pelo contato com secreções e o segundo infectado pela mordedura do cão. As duas formas corroboram com o potencial canino na transmissão zoonótica da esporotricose (RAMOS *et al.*, 2017; NETO *et al.*, 2023).

A esporotricose em humanos pode apresentar a forma clínica cutânea localizada, cutânea fixa, linfocutânea e cutânea disseminada e em pacientes imunossuprimidos a doença pode levar a quadros sistêmicos graves (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018). A forma cutânea fixa foi observada nos pacientes humanos dos dois casos relatados, iniciando nos dedos dos membros superiores. As lesões apresentavam-se ulceradas, com tecido granulomatoso e com presença de secreção. Esta descrição e apresentação clínica são comuns em estudos envolvendo humanos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021). No caso 2, a ferida

apresentava áreas de necrose, dificultando seu tratamento. Artrites reativas, poliartrite e sinais respiratórios também são descritos em pacientes em que a doença apresenta disseminação por via hematológica, principalmente nos imunossuprimidos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). No segundo relato foi descrito, em que além da lesão no dedo, a paciente queixava-se de dores articulares e dificuldade respiratória.

De forma similar aos humanos, os cães podem apresentar as mesmas formas clínicas da doença: cutânea fixa, linfocutânea e a forma disseminada. Entretanto observa-se que a forma predominante nos casos caninos é a cutânea fixa (RAMOS *et al.*, 2017; MASCARENHAS *et al.*, 2018) que foi descrita nos dois caninos deste relato. As lesões se mostravam com tecido granulomatoso, secreção sanguinolenta, crostas, com início não ulcerado e evoluindo para ulceração. A lesão do primeiro caso estava localizada no dorso, local de apresentação incomum. Entretanto, a lesão do segundo caso é comumente descrita na literatura juntamente com o acometimento das orelhas (DE FARIAS *et al.*, 2015).

Para o diagnóstico definitivo a cultura fúngica é considerado o padrão ouro. Entretanto, é uma técnica que pode levar até 30 dias para um resultado final e está sujeita a variações na sensibilidade devido a qualidade da coleta e da amostra (LARSSON, 2011; SANCHOTENE *et al.*, 2015; MACÊDO-SALES *et al.*, 2018). Outras técnicas como a citologia, histopatologia, biologia molecular e testes sorológicos podem ser empregados no diagnóstico, cada um com sua aplicabilidade e limitação, de modo que o mais adequado ao caso clínico em questão seja empregado (LARSSON, 2011; PEREIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015; MAGNABOSCO *et al.*, 2022; POESTER *et al.*, 2022). Para humanos o Ministério da Saúde recomenda o diagnóstico clínico a partir dos sinais sugestivos de esporotricose, principalmente quando o tutor relata que teve ou tem contato com animal diagnosticado com a doença. Essa associação contribui para o diagnóstico precoce em humanos, direcionando para a execução dos exames complementares disponíveis (QUEIROZ-TELLES *et al.*, 2022).

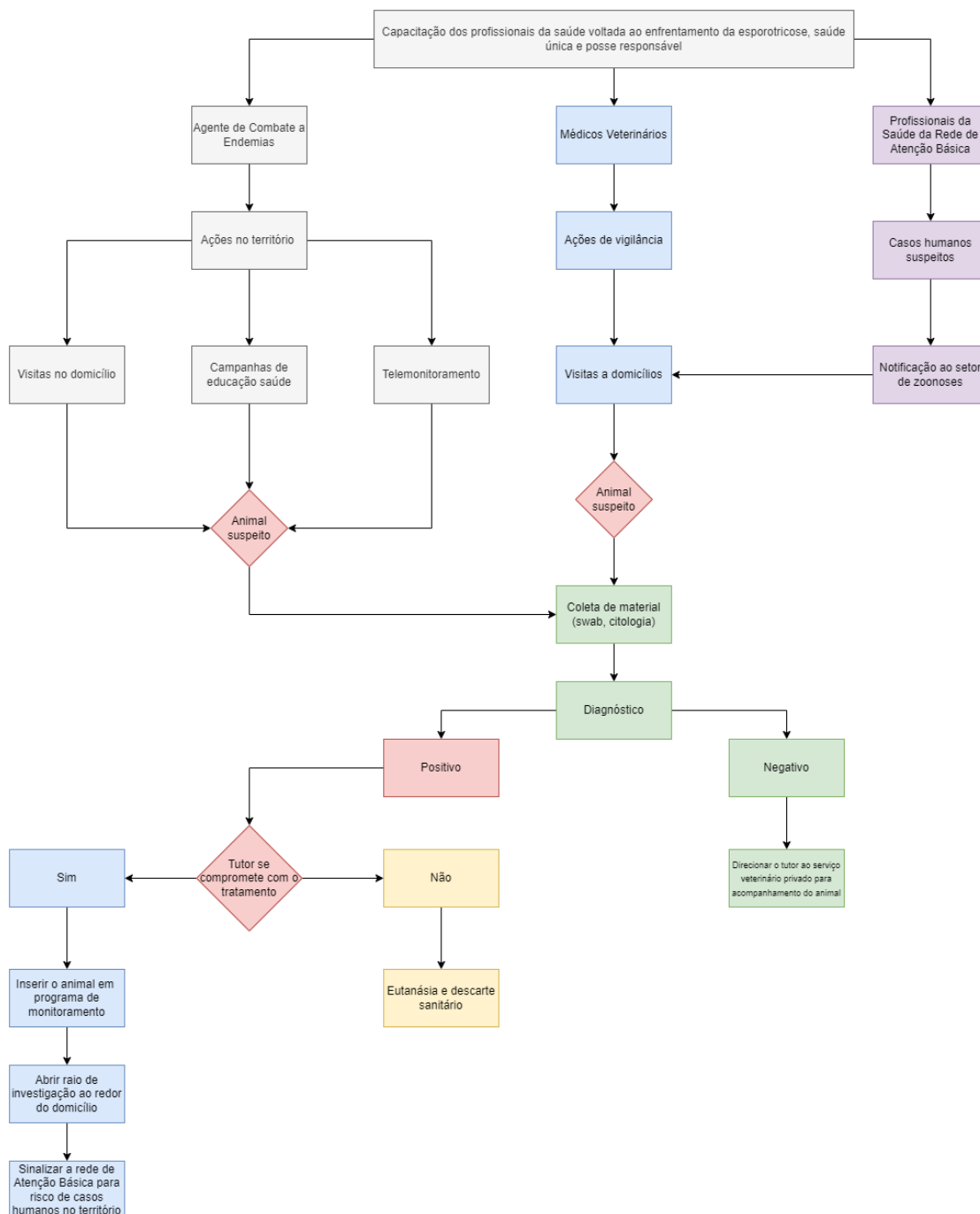
Considerando o diagnóstico em cães lesões do tipo granulomatosa, quando avaliadas clinicamente, passam ser investigados primeiramente para leishmaniose e neoplasias. Somente após a negativa dessas suspeitas, a investigação é direcionada à

esporotricose. Tal fato pode levar ao subdiagnóstico de esporotricose em cães (CAFARCHIA *et al.*, 2007; MIRANDA *et al.*, 2009).

Tratar essa micose subcutânea é um grande desafio, devido ao longo tempo de tratamento e altos custos. Os fármacos de escolha são empregados em doses que podem variar conforme as manifestações clínicas e resposta ao tratamento (BOECHAT *et al.*, 2021; GREMIÃO *et al.*, 2021). O ITZ é fármaco de escolha tanto para animais quanto para os humanos, como observado em ambos os casos descritos. A medicação é mais segura e seus efeitos colaterais são menores se comparados a outros antifúngicos (GREMIÃO, 2010). Em humanos, o ITZ pode ser utilizado na dose de 100-400mg/dia (POESTER *et al.*, 2022). Em cães a dose de ITZ pode ser de 5-10mg/kg/BID. Os felinos utilizam doses maiores devido a maior carga fúngica das suas lesões e quadros mais graves da doença, podendo utilizar a dose de 25-100mg/dia. O iodeto de potássio é uma escolha para os animais refratários ao tratamento com ITZ, podendo ser utilizado na dose de 2,5-20mg/dia (GREMIÃO *et al.*, 2021). É importante salientar que o tratamento deve ser seguido até a completa liberação pelo médico e pelo veterinário, evitando assim recidivas da doença (RODRIGUES *et al.*, 2022).

Controlar e prevenir a esporotricose requer medidas que vão além de tratar o paciente, há necessidade de um esforço coletivo entre os profissionais da saúde, o poder público e os tutores (MONTENEGRO *et al.*, 2014; GREMIÃO *et al.*, 2021; DE CAROLIS *et al.*, 2022). Os animais doentes devem permanecer confinados até o fim do tratamento para evitar que tenham contato com o ambiente e outros animais (LLORET *et al.*, 2013; MORGADO *et al.*, 2022). O descarte adequado e a incineração de carcaças de animais que vão a óbito ou são eutanasiados é primordial para evitar a recontaminação ambiental (SANTOS *et al.*, 2018). A educação em saúde, posse responsável e práticas embasadas em saúde única podem contribuir significativamente para o controle da doença e a redução no número de casos em humanos e animais (GOMES *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020; ANDRADE *et al.*, 2022a). Como uma proposta para o enfrentamento da esporotricose no território a figura 11 traz um fluxo operacional que está alinhado com normas e legislações vigentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2023; SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS, 2018; SECRETARIA MUNICIPAL DE MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE, 2018), que iniciam com capacitação da rede e segue com ações práticas no território, com o objetivo

de ampliar as ações de vigilância no território que é monitorado pela equipe do núcleo de vigilância em saúde dos sistemas municipais de saúde, de modo que as ações sejam multidisciplinares e promova a integração das informações e ações complementares envolvendo toda a rede de saúde.



**Figura 11:** Modelo de fluxo operacional destinado ao sistema municipal de saúde, com alvo nas ações de vigilância que são executadas pelos Agentes de Combate a Endemias, Médicos Veterinários e demais profissionais da saúde que estão inseridos na rede de Atenção Básica do SUS. Fonte: Arquivo Pessoal.

#### 5.4. CONCLUSÃO

A transmissão zoonótica da esporotricose é hoje a grande responsável pela disseminação da doença com surtos em várias regiões do Brasil. O cão passou a ter destaque também no ciclo da doença, uma vez que, o número de casos de esporotricose nesta espécie vem aumentando. Os relatos deste estudo comprovam a capacidade do cão em transmitir a esporotricose aos humanos. O tratamento para ambos é complexo e exige acompanhamento por um longo período. Considerando este contexto, o cão precisa ser incluído no cenário epidemiológico da esporotricose como hospedeiro e importante transmissor.

#### REFERÊNCIAS

- ANDRADE, E. H. P.; BASTOS, C. V.; SILVA, A. V. DA; *et al.* Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, n. January, p. 1–4, 2022. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822022000100702&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822022000100702&tlng=en)>.
- ANDRADE, E. H. P.; BASTOS, C. V.; DA SILVA, A. V.; *et al.* Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, n. January, p. 1–4, 2022.
- BOECHAT, J. S. *et al.* Canine sporotrichosis: polyphasic taxonomy and antifungal susceptibility profiles of *Sporothrix* species in an endemic area in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 135–143, 2021.
- CAFARCHIA, C. *et al.* Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from southern Italy: Case report. *Mycopathologia*, v. 163, n. 2, p. 75–79, 2007.
- DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: Solution to a problematic relationship. *Studies in Mycology*, v. 83, n. 1907, p. 165–191, 2016.
- DE CAROLIS, E.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. *Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–

12, 2022.

DE FARIAS, M. R. *et al.* Canine bone sporotrichosis: A case report. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 36, n. 3, p. 1445–1450, 2015.

ETCHECOPAZ, A. *et al.* Sporothrix brasiliensis: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 3, p. 1–33, 2021.

GOMES, L. B. *et al.* Saúde única e atuação do médico veterinário do Núcleo de Apoio a Saúde da Família (NASF). *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 83, p. 70–77, 2016. Disponível em: <<https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/ct83.pdf>>.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by Sporothrix brasiliensis and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 107–124, 29 mar. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s42770-020-00365-3>>.

GREMIÃO, I. D. F. Tratamento da esporotricose felina com a associação de anfotericina B intralesional e itraconazol oral. p. viii,38-viii,38, 2010. Disponível em: <[157.86.8.8/reports/doutorado\\_bibcb/isabella\\_d\\_f\\_gremiao\\_ipecc\\_pcdi\\_dout\\_2010](157.86.8.8/reports/doutorado_bibcb/isabella_d_f_gremiao_ipecc_pcdi_dout_2010)>.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. 2–8, 2017.

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

LECCA, L. O. *et al.* Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 176, n. November 2019, p. 104939, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104939>>.

LI, J. *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of Sporothrix species in Jiangxi, central China. *Medical Mycology*, v. 57, n. 8, p. 954–961, 2019.

LLORET, A. *et al.* Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

- MACÊDO-SALES, P. A. DE *et al.* Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 9, n. 2, p. 13–19, 2018.
- MADRID, I. M. *et al.* Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*, v. 173, n. 4, p. 265–273, 2012.
- MADRID, I. M. *et al.* Esporotricose óssea e cutânea em canino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 6, p. 441, 2007.
- MAGNABOSCO, M. W. *et al.* Osteomielite por *Sporothrix* spp. em um cão. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. e32611427543, 2022.
- MASCARENHAS, M. B. *et al.* Canine sporotrichosis: Report of 15 advanced cases. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 38, n. 3, p. 477–481, 2018.
- MIRANDA, L. H. M. DE *et al.* Histopathology of canine sporotrichosis: A morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia*, v. 168, n. 2, p. 79–87, 2009.
- MONTENEGRO, H. *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, 2014.
- MORGADO, D. S. *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 3, n. March, p. 100140, 2022.
- NETO, F. B. DA S. *et al.* Dog-transmitted ocular sporotrichosis. *Journal of Medical Mycology*, v. 33, n. 1, p. 5–6, 2023.
- OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.
- PAIVA, M. T. *et al.* Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 183, n. May, 2020.

PEREIRA, S. A. *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014.

POESTER, V. R. *et al.* Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 1, 2022.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Sporotrichosis in Children: Case series and Narrative Review. *Current Fungal Infection Reports*, v. 16, n. 2, p. 33–46, 2022.

RAMOS, A. C. M. O. *et al.* Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 8, 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35893145>>.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2015.

SANCHOTENE, K. O. *et al.* *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.

SANTOS, A. F. *et al.* Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais Practical. *V&Z Em Minas*, n. 137, p. 16–27, 2018. Disponível em: <<http://www.crmvmg.gov.br/arquivos/ascom/espоро.pdf>>.

VIANA, P. G. *et al.* Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. *Mycopathologia*, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018.



## 6. DISCUSSÃO GERAL

O caráter emergente da esporotricose, com um número crescente de casos em vários locais do mundo, é um aspecto que ocorre desde os primeiros relatos até os dias atuais. Primeiramente, a doença estava relacionada a acidentes ocupacionais que ocasionavam a infecção via sapronótica, porém, com o avanço da disseminação, a via zoonótica passou a ter maior relevância. Assim, gatos se tornaram os principais responsáveis por manter a doença no ambiente e por transmiti-la aos seres humanos (DE LIMA BARROS *et al.*, 2011; BONIFAZ; TIRADO-SÁNCHEZ, 2017; RODRIGUES *et al.*, 2020).

No Brasil, com a transmissão zoonótica a doença continua em expansão, sendo prevalente em centros urbanos, principalmente nas regiões Sul e Sudeste, com ocorrência de surtos, em locais em que fatores socioambientais influenciam negativamente (MONTENEGRO *et al.*, 2014; ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

O cenário da esporotricose em Minas Gérias é preocupante, uma vez que a notificação compulsória ocorre apenas para casos humanos e cada município tem a autonomia de adotar ou não a notificação para casos animais. Dessa forma, os dados disponíveis sobre a esporotricose animal podem estar subestimados prejudicando a vigilância epidemiológica da doença. Em Belo Horizonte, a doença em felinos é registrada desde 2015 e com frequentes casos e surtos em diversas regiões da cidade (SANTOS *et al.*, 2018; SECRETARIA MUNICIPAL DE MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE, 2018; LECCA *et al.*, 2020).

Alguns autores afirmam que a doença é incomum nos cães, mas não descartam a hipótese da infecção nos caninos e conseqüentemente da possibilidade de transmissão zoonótica. Mesmo com números subestimados da esporotricose canina, há casos registrados em diversos países, sendo o Brasil o local com o maior número de relatos. Tal fato instiga a investigação dos casos de esporotricose nessa espécie animal e da sua contribuição para a transmissão zoonótica (RAMOS *et al.*, 2017; VIANA *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2020; NETO *et al.*, 2023).

Os surtos de esporotricose felina que vem ocorrendo no Brasil podem favorecer a infecção dos cães, principalmente pelo convívio próximo com os felinos doentes

(MADRID *et al.*, 2012; MASCARENHAS *et al.*, 2018). Minas Gerais por ser endêmica para a esporotricose, e com muitos casos felinos em Belo Horizonte, pode apresentar ainda números muito maiores de esporotricose canina, tudo isso devido a subnotificação e a falta de diagnóstico para a doença nos cães.

O presente estudo ao descrever dois cães com sinais clínicos e confirmação laboratorial de esporotricose, reforça os dados sobre a doença nessa espécie. É interessante discutir o frequente diagnóstico tardio da doença em cães, mesmo em locais endêmicos para esporotricose felina e humana. Cabe ao médico veterinário um olhar cuidadoso e considerar a esporotricose como um importante diagnóstico diferencial à leishmaniose e outras doenças que apresentam lesões de pele (MIRANDA *et al.*, 2010). Ainda mais importante, este estudo prova e reforça que o cão é capaz de transmitir a doença para humanos através da mordedura e do contato com a secreção de lesões. Nesse contexto, o cão veio para potencializar a transmissão zoonótica, que atualmente é responsável pelo grande número de casos de esporotricose humana no Brasil (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022).

Consolidado o papel dos cães na transmissão aos humanos, é importante reforçar a resistência antifúngica de isolados de *Sporothrix* sp. principalmente diante dos resultados apresentados, onde dois isolados caninos desse estudo foram considerados resistentes, o que também já foi observado em outros estudos já conduzidos no país (BOECHAT *et al.*, 2021; BAES PEREIRA *et al.*, 2022). Isto reforça a necessidade de mais estudos e da propagação de tais informações, para que os exames de cultura e antifungigrama se tornem parte da rotina clínica, reduzindo as chances de recidivas e animais refratários ao tratamento. Além disso, os testes de suscetibilidade são uma ferramenta para monitorar o perfil de resistência de isolados circulantes no país.

É de extrema importância que o clínico veterinário conheça as técnicas disponíveis e mais adequadas ao diagnóstico em cães, uma vez que, os métodos utilizados para felinos, podem não ter a mesma efetividade em pacientes caninos. Contudo, com os avanços nas técnicas moleculares, o PCR é uma opção aos tradicionais testes empregados na clínica, apresentando alta sensibilidade e especificidade associada a rapidez no diagnóstico. Além disso, os estudos filogenéticos gerados a partir de técnicas moleculares

contribuem com novos e importantes dados epidemiológicos sobre a esporotricose (RODRIGUES *et al.*, 2015; SANCHOTENE *et al.*, 2015).

Os resultados desse estudo mostraram, através da filogenia dos isolados caninos obtidos em Belo Horizonte e região metropolitana, que os cães se infectaram pela espécie *S. brasiliensis*, mais prevalente no Brasil e nos isolados felinos já descritos, corroborando assim com os dados disponíveis em diversos estudos da doença. A filogenia mostrou também que os isolados deste estudo estão inseridos no clado da espécie *S. brasiliensis* e que não houve uma diferenciação intraespecífica entre eles, o que condiz com estudo que classificam *S. brasiliensis* como uma espécie clonal de baixa diversidade genética (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2013). Em conjunto, a análise da rede de haplótipos confirma a ausência da estruturação do fungo por hospedeiro ou por localização geográfica, reforçando mais uma vez que, cães e gatos compartilham *S. brasiliensis*. Além disso, indícios de expansão recente foram observados nos haplótipos baseados no gene da CAL. Cabe destacar também com base nos resultados desse estudo, a capacidade dos genes da CAL e do EF1a em mostrar diferenciações interespecíficas e proporcionar dados significantes nas análises filogenéticas.

O tratamento da zoonose consiste não apenas em utilizar os fármacos de escolha, mas também uma visão sistêmica, que contempla o animal em todas as esferas que ele vive, na sua interação com o ambiente e seus tutores, de forma que o equilíbrio e o bem-estar mútuos possam ser propiciados. Portanto, o médico veterinário deve praticar medidas de saúde única, que engloba o tratamento do seu paciente, educação dos tutores e promoção da sanidade ambiental, reduzindo os riscos de recidivas, perpetuação da doença no ambiente e conseqüentemente expansão da mesma por todo o território (GOMES *et al.*, 2016; DE CAROLIS *et al.*, 2022). O médico veterinário é um profissional extremamente qualificado e que contribui para a saúde única e promove um papel educacional de grande impacto para a saúde coletiva, fazendo isso através do ensino da posse responsável, o que reflete em qualidade de vida para os animais e ajuda no controle e prevenção da esporotricose e demais zoonoses (SANTOS *et al.*, 2018; ANDRADE *et al.*, 2022b).

Diante dos importantes dados epidemiológicos obtidos, esse trabalho se destaca pelo pioneirismo em apresentar uma análise filogenética associada a testes de

suscetibilidade *in vitro* de isolados caninos provenientes de Belo Horizonte e região metropolitana. Os resultados e as discussões aqui apresentados, abrem possibilidades de novos estudos sobre a esporotricose canina, crescente em Minas Gerais, chamando atenção pelo novo papel do cão na transmissão da doença para os humanos. Além disso, esse estudo traz uma revisão sobre a doença com foco no cão, abordando pontos importantes a serem destacados, como a subnotificação da doença, a escassez de dados sobre cães, a complexidade de diagnóstico canino e o papel dos profissionais de saúde no enfrentamento dessa micose negligenciada em ascensão.

## 7. CONCLUSÃO

- Os dados clínicos obtidos dos cães, confirmam a predominância de lesões ulceradas, caracterizando a forma cutânea fixa, localizadas no plano nasal;
- Os cães oriundos deste estudo infectaram pela espécie *S. brasiliensis*, já descrita nos casos de esporotricose humana e felina;
- Os isolados de *S. brasiliensis* de diferentes hospedeiros e origens do Brasil formaram um clado monofilético em relação as outras espécies de *Sporothrix*;
- Não há estruturação do fungo por hospedeiro e por localização geográfica, reforçando que cães e gatos compartilham a infecção por *S. brasiliensis*;
- Dois isolados de *S. brasiliensis* oriundos de caninos de Minas Gerais mostraram-se resistentes aos principais antifúngicos (Itraconazol e Anfotericina B) utilizados para o tratamento da esporotricose;
- Os casos relatados de esporotricose canina e humana confirmam a transmissão zoonótica da esporotricose a partir da mordedura e contato com secreção de lesões de cães infectados;
- O cão assume um papel relevante na transmissão da doença, despertando para a importância de um diagnóstico assertivo e um acompanhamento responsável no processo terapêutico, ações fundamentais realizadas por médicos veterinários no controle da esporotricose.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, R. *et al.* Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. *BioMed Research International*, v. 2015, 2015.
- ANDRADE, E. H. P. *et al.* Characterization of animal sporotrichosis in a highly urbanized area. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, v. 76, n. January, p. 1–6, 2021.
- ANDRADE, E. H. P.; BASTOS, C. V.; DA SILVA, A. V.; *et al.* Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, n. January, p. 1–4, 2022.
- ANDRADE, E. H. P.; BASTOS, C. V.; SILVA, A. V. DA; *et al.* Household outbreak of sporotrichosis: towards the One Health approach. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 55, n. January, p. 1–4, 2022. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0037-86822022000100702&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822022000100702&tlng=en)>.
- ARAM, H.; O'DONNELL, K. Sporotrichosis: A Historical Approach. *International Journal of Dermatology*, v. 25, n. 3, p. 203–206, set. 1986.
- BAES PEREIRA, S. *et al.* Sporotrichosis in dogs: epidemiological and clinical-therapeutic profile and the emergence of itraconazole-resistant isolates. *Medical Mycology*, v. 60, n. 12, p. 1–5, 6 nov. 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article/doi/10.1093/mmy/myac089/6862100>>.
- BARROS, M. B. DE L. *et al.* Esporotricose: A evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, v. 27, n. 6, p. 455–460, 2010.
- BAZZI, T. *et al.* Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 36, n. 4, p. 303–311, 2016.
- BOECHAT, J. S. *et al.* Canine sporotrichosis: polyphasic taxonomy and antifungal susceptibility profiles of *Sporothrix* species in an endemic area in Brazil. *Brazilian*

*Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 135–143, 2021.

BOECHAT, J. S. *et al.* Sporothrix brasiliensis and Feline Sporotrichosis in the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, Brazil (1998-2018). *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 7, 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35887504>&http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC9325134>.

BONIFAZ, A.; TIRADO-SÁNCHEZ, A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. *Journal of Fungi*, v. 3, n. 1, 2017.

CAFARCHIA, C. *et al.* Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from southern Italy: Case report. *Mycopathologia*, v. 163, n. 2, p. 75–79, 2007.

CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mmy/article-lookup/doi/10.1093/mmy/myu062>>.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference method for broth dilution. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard, 3th ed.*, v. 28, n. 14, p. 0–13, 2008. Disponível em: <[https://clsi.org/media/1461/m27a3\\_sample.pdf](https://clsi.org/media/1461/m27a3_sample.pdf)>.

CRUZ, I. L. R. *et al.* Evaluation of melanin production by sporothrix luriei. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n. 1, p. 68–70, 2018.

DANGERFIELD, L.; GEAR, J. Sporotrichosis Among Miners on the Witwatersrand Gold Mines. *South African Medical Journal*, v. 1, p. 128–131, 1941.

DE BEER, Z. W.; DUONG, T. A.; WINGFIELD, M. J. The divorce of Sporothrix and Ophiostoma: Solution to a problematic relationship. *Studies in Mycology*, v. 83, n. 1907, p. 165–191, 2016.

DE CAROLIS, E.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Old and New Insights into Sporothrix schenckii Complex Biology and Identification. *Pathogens*, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2022.

DE FARIAS, M. R. *et al.* Canine bone sporotrichosis: A case report. *Semina:Ciencias*

*Agrarias*, v. 36, n. 3, p. 1445–1450, 2015.

DE LIMA BARROS, M. B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A. O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 354–633, 2011.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Multicenter, International Study of MIC/MEC Distributions for Definition of Epidemiological Cutoff Values for *Sporothrix* Species Identified by Molecular Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 10, p. 1–8, out. 2017. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.01057-17>>.

ETCHECOPAZ, A. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*: A review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 3, p. 1–33, 2021.

FIDELIS GONSALES, F. *et al.* Esporotricose em cão Yorkshire Terrier na cidade de São Paulo, SP – Brasil: relato de caso. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 74, n. 4, p. 453–457, 2015. Disponível em: <<https://periodicos.saude.sp.gov.br/index.php/RIAL/article/view/33500>>.

GOMES, L. B. *et al.* Saúde única e atuação do médico veterinário do Núcleo de Apoio a Saúde da Família (NASF). *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 83, p. 70–77, 2016. Disponível em: <<https://vet.ufmg.br/ARQUIVOS/FCK/file/ct83.pdf>>.

GREMIÃO, I. D.F. *et al.* Feline sporotrichosis: Epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycology*, v. 53, n. 1, p. 15–21, 2014.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 107–124, 29 mar. 2021. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1007/s42770-020-00365-3>>.

GREMIÃO, I. D. F. Tratamento da esporotricose felina com a associação de anfotericina B intralesional e itraconazol oral. p. viii,38-viii,38, 2010. Disponível em: <[157.86.8.8/reports/doutorado\\_bibcb/isabella\\_d\\_f\\_gremiao\\_ipecc\\_pcdi\\_dout\\_2010](157.86.8.8/reports/doutorado_bibcb/isabella_d_f_gremiao_ipecc_pcdi_dout_2010)>.

GREMIÃO, I. D. F. *et al.* Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human

Transmission. *PLoS Pathogens*, v. 13, n. 1, p. 2–8, 2017.

GUTERRES, K. A. *et al.* The Use of (1–3)  $\beta$ -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis. *Mycopathologia*, v. 177, n. 3–4, p. 217–221, 2014.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C. F. REFRACTORY SUBCUTANEOUS ABSCESSSES CAUSED BY SPOROTHRIX SCHENCKII. A NEW PATHOGENIC FUNGUS. *Journal of Experimental Medicine*, v. 5, n. 1, p. 77–89, 1 out. 1900. Disponível em: <<https://rupress.org/jem/article/5/1/77/19973/REFRACTORY-SUBCUTANEOUS-ABSCESSSES-CAUSED-BY>>.

HOWARD, D. H. DIMORPHISM OF SPOROTRICHUM SCHENCKII. *Journal of Bacteriology*, v. 81, n. 3, p. 464–469, mar. 1961. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.81.3.464-469.1961>>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.

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

LECCA, L. O. *et al.* Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 176, n. November 2019, p. 104939, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.104939>>.

LEWIS, R. E. Current concepts in antifungal pharmacology. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 86, n. 8, p. 805–817, 2011.

LI, J. *et al.* Prevalence and antifungal susceptibility of Sporothrix species in Jiangxi, central China. *Medical Mycology*, v. 57, n. 8, p. 954–961, 2019.

LLORET, A. *et al.* Sporotrichosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 15, n. 7, p. 619–623, 2013.

LONDERO, A. T.; DE CASTRO, R. M.; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dogs in Brazil. *Medical Mycology*, v. 3, n. 4, p. 273–274, 1964.



MACÊDO-SALES, P. A. DE *et al.* Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 9, n. 2, p. 13–19, 2018.

MADRID, I. M. *et al.* Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*, v. 173, n. 4, p. 265–273, 2012.

MADRID, I. M. *et al.* Esporotricose óssea e cutânea em canino. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, n. 6, p. 441, 2007.

MAGNABOSCO, M. W. *et al.* Osteomielite por *Sporothrix* spp. em um cão. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 4, p. e32611427543, 2022.

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

MARIO, D. A. N. *et al.* Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. *Revista Iberoamericana de Micologia*, v. 33, n. 1, p. 21–25, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.03.001>>.

MASCARENHAS, M. B. *et al.* Canine sporotrichosis: Report of 15 advanced cases. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 38, n. 3, p. 477–481, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Ofício Circular Nº 102/2023/SVSA/MS - Nota-Tecnica Nº 60/2023*. . [S.l: s.n.]. Disponível em: <<http://vigilancia.saude.mg.gov.br/wp-content/uploads/2023/03/Oficio-Circular-47-2023-SVSA-MS-1.pdf>>. , 2023

MIRANDA, L. H.M. DE *et al.* Histopathology of canine sporotrichosis: A morphological study of 86 cases from Rio de Janeiro (2001-2007). *Mycopathologia*, v. 168, n. 2, p. 79–87, 2009.

MIRANDA, L. H.M. *et al.* Comparative Histopathological Study of Sporotrichosis and American Tegumentary Leishmaniosis in Dogs from Rio de Janeiro. *Journal of Comparative Pathology*, v. 143, n. 1, p. 1–7, 2010.

MIRANDA, LUISA H.M. *et al.* Evaluation of immunohistochemistry for the diagnosis

of sporotrichosis in dogs. *Veterinary Journal*, v. 190, n. 3, p. 408–411, 2011.

MONTENEGRO, H. *et al.* Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*, v. 10, n. 1, 2014.

MORGADO, D. S. *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: A systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. *Current Research in Microbial Sciences*, v. 3, n. March, p. 100140, 2022.

NETO, F. B. DA S. *et al.* Dog-transmitted ocular sporotrichosis. *Journal of Medical Mycology*, v. 33, n. 1, p. 5–6, 2023.

NGUYEN, L. T. *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

NYLANDER, J. A. A. MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre Uppsala University*, v. 2, n. January 2004, p. 1–2, 2004. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:MrModeltest#0>>.

O'DONNELL, K. *et al.* A Multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, v. 41, n. 1, p. 61–78, jan. 2000. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1340354000708333>>.

OLIVEIRA, L. A. DE *et al.* *Conhecimento, conservação e uso de fungos*. [S.l.]: Editora INPA, 2019a.

OLIVEIRA, L. A. DE *et al.* *Conhecimento, conservação e uso de fungos*. Manaus: INPA, 2019b.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Human sporotrichosis: recommendations from the Brazilian Society of Dermatology for the clinical, diagnostic and therapeutic management. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 97, n. 6, p. 757–777, 2022.

OROFINO-COSTA, R. *et al.* Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de*

*Dermatologia*, v. 92, n. 5, p. 606–620, 2017.

PAIVA, M. T. *et al.* Spatial association between sporotrichosis in cats and in human during a Brazilian epidemics. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 183, n. May, 2020.

PEREIRA, S. A. *et al.* The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 47, n. 3, p. 392–393, 2014.

POESTER, V. R. *et al.* Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*, v. 65, n. 7, p. 815–821, 2018.

POESTER, V. R. *et al.* Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. *Journal of Fungi*, v. 8, n. 1, 2022.

QUEIROZ-TELLES, F. *et al.* Sporotrichosis in Children: Case series and Narrative Review. *Current Fungal Infection Reports*, v. 16, n. 2, p. 33–46, 2022.

RAMBAUT, A. *et al.* Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, v. 67, n. 5, p. 901–904, 2018.

RAMOS, A. C. M. O. *et al.* Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 11, n. 1, p. 79–84, 2017.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, v. 8, n. 8, 2022. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35893145>>.

RODRIGUES, A. M. *et al.* Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 6, 2013.

RODRIGUES, A. M. *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*, v. 185, n. 5, p. 813–842, 2020.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 78, n. 4, p. 383–387, abr. 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004>>.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Molecular Diagnosis of Pathogenic Sporothrix Species. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 12, p. 1–22, 2015.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, G. S.; DE CAMARGO, Z. P. Sporothrix Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 7, p. 1–7, 2016.

RODRIGUES, A. M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z. P. Emergence of pathogenicity in the Sporothrix schenckii complex. *Medical Mycology*, v. 51, n. 4, p. 405–412, 2012.

RONQUIST, F. *et al.* Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, v. 61, n. 3, p. 539–542, 2012.

SANCHOTENE, K. O. *et al.* Sporothrix brasiliensis outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*, v. 58, n. 11, p. 652–658, 2015.

SANTOS, A. F. *et al.* Guia Prático para enfrentamento da Esporotricose Felina em Minas Gerais Practical. *V&Z Em Minas*, n. 137, p. 16–27, 2018. Disponível em: <<http://www.crmvmg.gov.br/arquivos/ascom/esporo.pdf>>.

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 Mycology*, v. 44, n. 1, p. 87–92, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE DE MINAS GERAIS. RESOLUÇÃO SES/MG Nº 6.532, DE 05 DE DEZEMBRO DE 2018. *Governo do Estado de Minas Gerais*, p. 50, 2018.

SECRETARIA MUNICIPAL DE MUNICIPAL DE SAÚDE DE BELO HORIZONTE. Esporotricose: Protocolo de enfrentamento da doença em Belo Horizonte. *Belo Horizonte: Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte*, p. 18, 2018.

SILVA-VERGARA, M. L. *et al.* Case report: Disseminated sporothrix brasiliensis infection with endocardial and ocular involvement in an HIV-infected patient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 86, n. 3, p. 477–480, 2012.

SILVA, M. B. T. DA *et al.* Esporotricose urbana: Epidemia negligenciada no Rio de

Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saude Publica*, v. 28, n. 10, p. 1867–1880, 2012.

SILVA, F. B. *et al.* Climate drivers of hospitalizations for mycoses in Brazil. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

SPICKLER, A. R. Sporotrichosis. *The Center for Food Security & Public Health*, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<https://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/sporotrichosis.pdf>>.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). *Dictionary of Bioinformatics and Computational Biology*. [S.l.]: Wiley, 2002. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471650129.dob0522>>.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673–4680, 1994.

VIANA, P. G. *et al.* Successful Treatment of Canine Sporotrichosis with Terbinafine: Case Reports and Literature Review. *Mycopathologia*, v. 183, n. 2, p. 471–478, 2018.

WHITTEMORE, J. C.; WEBB, C. B. Successful treatment of nasal sporotrichosis in a dog. *Canadian Veterinary Journal*, v. 48, n. 4, p. 411–414, 2007.

ZHOU, X. *et al.* Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*, v. 66, n. 1, p. 153–165, 2014.