



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**



NAYARA DE FÁTIMA LAZAMETH DINIZ

**CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES CAUSADORES DE MICOSES PROFUNDAS
EM GATOS (*Felis catus*) ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA VETERINÁRIA NA
CIDADE DE MANAUS – AM: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E
SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

MANAUS – AM
2023

**CARACTERIZAÇÃO DOS AGENTES CAUSADORES DE MICOSES
PROFUNDAS EM GATOS (*Felis catus*) ATENDIDOS EM UMA CLÍNICA
VETERINÁRIA NA CIDADE DE MANAUS – AM: ISOLAMENTO,
IDENTIFICAÇÃO E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Dr. João Vicente Braga de Souza

MANAUS – AM

2023

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

D585c Diniz, Nayara de Fátima Lazameth
Caracterização dos agentes causadores de micoses profundas em gatos (*felis catus*) atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus - AM: Isolamento, identificação e sensibilidade antifúngica / Nayara de Fátima Lazameth Diniz. 2023

65 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: João Vicente Braga de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Cryptococcus. 2. Sporothrix. 3. Felinos. 4. Sequenciamento. 5. Amazonas. I. Souza, João Vicente Braga de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

"Caracterização dos agentes causadores de micoses profundas em gatos atendidos em uma clínica da cidade de Manaus: isolamento, identificação e sensibilidade antifúngica"

DISCENTE: NAYARA DE FATIMA LAZAMETH DINIZ

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 31/05/2023.

Patrícia Danielle Oliveira de Almeida

Profa. Dra. Patrícia Danielle Oliveira de Almeida
Coordenadora do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:

João Vicente Braga de Souza
Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza
Orientador e Presidente da Banca (INPA)

Kátia Cruz
Profa. Dra. Kátia Santana Cruz
Membro ((FMT-HVD)

Marcio Nogueira Rodrigues
Prof. Dr. Marcio Nogueira Rodrigues
Membro (FAMETRO)

À minha mãe, pai (*in memoriam*), irmãos e irmãs.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus que sempre será digno de honra e glória. Sem ele eu não teria chegado até aqui.

Aos meus pais Fátima e Jorge (*In memoriam*), meus exemplos de um bom caráter, força, trabalho e muito amor. Aos meus irmãos Yonara, Jorge, Matthew e Ranielle, todos eles sempre me inspiraram a ser uma pessoa melhor também. Os sobrinhos também não podem ficar de fora porque a tia ama muito eles, e todos ficavam muito admirados quando eu falava deste projeto de pesquisa e sempre me incentivaram.

Ao meu orientador professor João Vicente que sempre orientou com maestria seus alunos de mestrado e doutorado. Muito obrigada, professor por todos os ensinamentos e paciência com a sua aluna medrosa aqui. Tenho certeza de que levarei comigo todos os seus ensinamentos e os colocarei em prática.

À minha mãezona Ana Cortez por todo apoio, ensinamento e puxão de orelha. Te amo muito.

Ao pessoal da minha segunda casa, o laboratório de micologia do INPA, em especial Luciana, Juan, Naira e Flávia que me acompanharam durante esses dois anos. Vocês são incríveis e são um espelho de dedicação no que vocês fazem sem perder a humildade.

Às minhas amigas e médicas veterinárias Adriana e Alana que me ajudaram a se tornar este trabalho possível.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) pela oportunidade, a todos os professores pelos ensinamentos. E ao órgão de fomento FAPEAM pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa no Estado do Amazonas.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo principal isolar e identificar os agentes causadores de micoses profundas em gatos atendidos em uma clínica veterinária em Manaus-AM, além de realizar o teste de sensibilidade antifúngica. O projeto incluiu a identificação molecular dos agentes das micoses, a descrição das características clínicas e epidemiológicas dos gatos afetados por criptococose e esporotricose, bem como a investigação da sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Foram coletadas amostras de 38 gatos, no qual 78,9% apresentaram agentes fúngicos, sendo que 96,6% foram identificados como *Sporothrix* spp. e apenas 3,3% (n=1) como *Cryptococcus* spp. A maioria dos gatos afetados pela esporotricose eram do sexo masculino (82,7%) e tinham dois anos de idade (48,2%). Gatos semi-domiciliados ou de vida livre foram os mais afetados, vivendo na área urbana de Manaus. A identificação molecular dos agentes fúngicos foi realizada através do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4. Todos os três isolados de *Sporothrix* que foram analisados por sequenciamento apresentaram sequências 100% similares ao isolado tipo de *Sporothrix brasiliensis*. O isolado causador do caso de criptococose apresentou sequência 100% similar a *Cryptococcus neoformans*. O teste de susceptibilidade antifúngica mostrou que, dos 29 isolados de *Sporothrix* e o isolado *Cryptococcus neoformans*, todos apresentaram sensibilidade aos antifúngicos utilizados na rotina em veterinária.

Palavras – Chave: *Cryptococcus*, *Sporothrix*, Felinos, Sequenciamento, Amazonas

ABSTRACT

This study aimed to isolate and identify the causative agents of deep mycoses in cats treated at a veterinary clinic in Manaus-AM, as well as perform antifungal sensitivity testing. The project included molecular identification of the fungal agents causing mycoses, description of the clinical and epidemiological characteristics of cats affected by cryptococcosis and sporotrichosis, as well as investigation of the isolates' sensitivity to antifungal drugs, including amphotericin B, ketoconazole, fluconazole, and itraconazole. Samples were collected from 38 cats, 78.9% showed fungal agents, with 96.6% being identified as *Sporothrix* spp. and only 3.3% (n=1) as *Cryptococcus* spp. The majority of cats affected by sporotrichosis were male (82.7%) and two years old (48.2%). Semi-domiciled or free-roaming cats were the most affected, living in the urban area of Manaus. The molecular identification of the fungal agents was performed through sequencing of the ITS1 and ITS4 regions. All three *Sporothrix* isolates analyzed by sequencing showed 100% similarity to the type isolate of *Sporothrix brasiliensis*. The isolate causing the cryptococcosis case showed 100% sequence similarity to *Cryptococcus neoformans*. Antifungal susceptibility testing showed that all 29 *Sporothrix* isolates and the *Cryptococcus neoformans* isolate were sensitive to the antifungal drugs routinely used in veterinary practice.

Keywords: *Cryptococcus*, *Sporothrix*, Feline, Sequencing, Amazon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fluxograma classificação das espécies de <i>Cryptococcus</i> e subtipos	16
Figura 2 Fluxograma classificação das espécies de <i>Sporothrix</i> e subtipos divididos em clados patogênicos e Clado ambiental.....	19
Figura 3 Fluxograma dos procedimentos e metodologia do presente projeto.	25
Figura 4 Gato com aumento do volume nasal.....	28
Figura 5 Gato com aumento do volume nasal.....	38
Figura 6 Lesão em Felino, Cultura e Cultivo de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	41
Figura 7 Lesão cutânea, cultivo, macro e microscopia fúngica de <i>Cryptococcus neoformans</i>	41
Figura 8 Árvore filogenética Neighbour-Joining (NJ), construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS) no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características Clínicas e Epidemiológicas da Criptococose e da Esporotricose em Gatos de Manaus.	41
Tabela 2. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM), faixa e média geométrica dos isolados de <i>Sporothrix</i> e <i>Cryptococcus</i> em gatos da cidade de Manaus.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDAS

Mg - Micrograma μl – Microlitros μM – Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius

DAS - Sabouraud dextrosy ágar (ágar sabouraud dextrose)

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado)

AFST - Antifungal Susceptibility Testing (Teste de Sensibilidade Antifúngica)

ANF - Anfotericina B

PAF - Punção por Agulha Fina

CEUA - Comissão de Ética de Uso dos animais

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and Laboratory Standard Institute

CTZ f - Cetoconazol

DMSO - Dimetil sulfoxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Deoxinucleotídeos trifosfatados

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeu de Prevenção e Controled de Doenças)

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Ensaio imunossorvente ligado a enzimas)

ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infections (Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Infecções)

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Comitê Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana)

FLZ - Fluconazol

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IGS1 – Espaço intergênico do DNA ribossomal

IM - Intramuscular

INPA - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

ITR - Itraconazol

Min - Minuto

mL- Mililitros

NaCl - Cloreto de sódio

Ng - Nanograma

Nm - Nanômetro

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

pH - Potencial hidrogeniônico

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição)

RPMI - Meios Roswell Park Memorial Institute

SDS - Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil sulfato de sódio)

SNC - Sistema Nervoso Central

SRD - Sem Raça Definida Taq – *Thermus aquaticus*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

U - Unidade

V - Volt

var. - Variedade

VGI, VGII, VGIII, VGIV - Variedade *gattii* 1, 2, 3 e 4

VNB - Variedade *neoformans* de Botswana

VNI, VNII, VNIII, VNIV - Variedade *neoformans* 1, 2, 3 e 4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Micoses Profundas.....	14
2.2 Criptococose em Gatos Domésticos	14
2.2.1 Agentes	15
2.2.2 Transmissão e Formas Clínicas	17
2.2.3 Diagnóstico.....	17
2.2.4 Tratamento.....	18
2.3 Esporotricose em Gatos Domésticos	18
2.3.1 Agentes	19
2.3.2 Transmissão e Formas Clínicas	19
2.3.3 Diagnóstico.....	19
2.3.4 Tratamento.....	20
2.4 Outros Agentes	21
2.5 Sensibilidade a Antifúngicos	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Geral	23
3.2. Específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Modelo de Estudo.....	24
4.2.2 População de Estudo.....	25
4.2.3 Amostra Populacional Analisada no Estudo.....	25
4.2.4 Aspectos Éticos.....	26
4.2.5 Procedimentos	26
4.3 Avaliação da Sensibilidade Antifúngica	29
4.4 Análises Estatísticas.....	30
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS	31
6 DISCUSSÃO.....	43
7 CONCLUSÃO.....	46
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
9 ANEXOS.	56

1 INTRODUÇÃO

Micoses profundas são infecções fúngicas que afetam órgãos internos de animais e humanos, representando um desafio para a saúde pública (WALSH; DIXON, 1996). No Brasil, a criptococose e a esporotricose são as principais doenças em felinos (RODRIGUES et al., 2022; FERRARI et al., 2023). A criptococose felina é causada pelo fungo *C. neoformans* e é geralmente inalado por meio de esporos presentes em fezes de pássaros (TRIVEDI et al., 2011). A esporotricose, por sua vez, é transmitida pelo fungo *Sporothrix* spp. através de trauma (BARNACLE et al., 2023). É fundamental compreender os agentes causadores dessas micoses em gatos, assim como sua identificação e sensibilidade aos antifúngicos disponíveis.

A esporotricose é uma doença emergente em gatos na cidade de Manaus, apresentando um impacto significativo na saúde dos animais e no bem-estar da população. O fungo *Sporothrix brasiliensis* possui a capacidade de infectar diferentes tecidos do corpo, incluindo pele, pulmões, ossos e sistema nervoso central (FRANCESCHI et al., 2017; ALVES et al., 2020; AGUIAR et al., 2023). A principal porta de entrada para a infecção são as arranhaduras e mordeduras de gatos infectados, podendo, em casos raros, ser transmitida por inalação do fungo presente no ambiente (GREMIÃO et al., 2017; MASCHIO-LIMA et al., 2021). Compreender a frequência e os padrões de isolamento desse agente causador em gatos atendidos em uma clínica em Manaus é essencial para estabelecer medidas efetivas de controle e prevenção da doença.

Por outro lado, a criptococose é uma infecção fúngica sistêmica causada pelo *C. neoformans* (RODRIGUES et al., 2020). Esse fungo é amplamente encontrado em ambientes naturais, como solos contaminados com fezes de aves (ALVES et al., 2016; RIBEIRO et al., 2020). Embora seja uma doença comumente associada a seres humanos, a criptococose também afeta felinos, podendo levar a sintomas graves e até mesmo fatais se não for diagnosticada e tratada precocemente (RODRIGUES et al., 2020). Identificar a ocorrência e caracterizar o *C. neoformans* em gatos atendidos na clínica de Manaus é fundamental para entender a dinâmica da doença na região e proporcionar uma abordagem terapêutica adequada.

Diante dessas considerações, o presente estudo tem como objetivo principal investigar a ocorrência de micoses profundas em gatos atendidos em uma clínica na cidade de Manaus, além de isolar, identificar e avaliar a sensibilidade antifúngica dos agentes causadores. Com

base nesses resultados, espera-se fornecer subsídios para a implementação de estratégias de prevenção e controle mais eficientes, contribuindo para a saúde dos animais e a proteção da saúde pública na região amazônica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Micoses Profundas

As micoses profundas são infecções fúngicas que atingem as camadas mais profundas da pele, assim como outros tecidos e órgãos (LLORET et al., 2013). Essas micoses são caracterizadas por uma penetração mais profunda do agente fúngico, o que as torna mais graves e complexas de tratar (WALSH; DIXON, 1996). Elas podem afetar diferentes espécies, incluindo os gatos. Dependendo do tipo de fungo envolvido, as manifestações clínicas da infecção podem variar de lesões cutâneas até condições mais sistêmicas (PAVELSKI et al., 2018; ALVES et al., 2020).

As micoses profundas mais importantes em gatos incluem a criptococose, esporotricose, histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose e aspergilose (GREENE; TROY, 1995; GILOR et al., 2006; REINHART et al., 2012; LLORET et al., 2013; GREMIÃO et al., 2020). A transmissão pode ocorrer de várias maneiras, dependendo do fungo envolvido. Muitos desses fungos são encontrados no meio ambiente, no solo, em plantas e até mesmo em fezes de pássaros, onde os gatos podem entrar em contato durante suas atividades normais (LLORET et al., 2013). Além de áreas contaminadas pelos dejetos dos gatos, a forma de transmissão que tem se tornado mais comum é através de mordeduras e arranhaduras dos gatos contaminados com o agente causador da esporotricose (RODRIGUES et al., 2013).

É fundamental conhecer e monitorar as micoses profundas em gatos por vários motivos. Primeiramente, essas infecções podem causar doenças graves, que podem ser fatais se não forem tratadas adequadamente (ALVES SOARES et al., 2019; ALVES et al., 2020; INDOUNG et al., 2022). Além disso, algumas dessas micoses podem ser transmitidas para humanos, representando um risco à saúde pública (GREMIÃO et al., 2017). O monitoramento também permite a identificação precoce de surtos de infecções fúngicas, facilitando o controle e a prevenção de sua propagação. Por fim, o conhecimento dessas micoses permite aos proprietários de gatos e aos veterinários a implementação de medidas preventivas e terapêuticas adequadas para garantir a saúde e o bem-estar dos gatos.

2.2 Criptococose em Gatos Domésticos

A criptococose foi descrita pela primeira vez em gatos na década 50 por Holzworth

(1952). O complexo das espécies *C. neoformans* e *C. gattii* possui distribuição mundial, no qual o *Cryptococcus* em gatos já foi identificado em diversos países como Estados Unidos, Austrália, Canadá, China, Itália, Bélgica, Japão e Portugal, cujo *C. neoformans* é o agente que predomina nesses países (DANESI et al., 2014; KANO et al., 2015; LIVET et al., 2015; PIMENTA et al., 2015; SIAK et al., 2015; SCHAIBLE, 2019; ALMENDROS et al., 2020; NEWMAN), informações baseadas em relatos de caso.

São poucas as informações sobre a criptococose em gatos na América Latina. Relatos de casos de gatos com criptococose foram descritos em dois países, Chile e Costa Rica. As espécies isoladas nestes países foram *C. neoformans* var. *grubii* e *C. gattii* (VIEILLE et al., 2018; OLIVARES et al., 2021).

O Brasil também vem relatando casos de criptococose felina. O *Cryptococcus* já foi identificado nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (MARTINS et al., 2011; CARDOSO et al., 2013; PAULA et al., 2014; SILVA FILHO et al., 2017; CASTRO et al., 2017; BRITO-SANTOS et al., 2019; GUEDES et al., 2019; MARUYAMA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020;). Um estudo retrospectivo realizado no Sul do Brasil em um período de dez anos, mostrou que a infecção fúngica que mais acomete os felinos domésticos é a criptococose seguida da esporotricose (CASTRO et al., 2017). É possível perceber que o patógeno está presente em todo o território brasileiro, por isso é necessário realizar estudos para investigar a prevalência desse fungo em felinos no Brasil.

2.2.1 Agentes

O *Cryptococcus* é uma levedura encapsulada pertencente ao filo Basidiomycota, classe Tremellomycetes, ordem Tremalles, família Tremellaceae e gênero *Cryptococcus* (FINDLEY et al., 2009). O complexo das espécies *Cryptococcus neoformans/C. gattii* (LESTER et al., 2011; KWON-CHUNG et al., 2014), são as espécies fúngicas que mais acometem os animais domésticos, e a espécie felina é a mais acometida (SEYEDMOUSAVI et al., 2018).

Para identificação da variabilidade genética das espécies de *C. neoformans* e *C. gattii*, surgiram os métodos moleculares (PCR e o sequenciamento de DNA), as espécies foram classificadas em subtipo: VNI, VNII e VNB para *C. neoformans* var. *grubii*, VNIII para o híbrido, VNIV para *C. neoformans* var. *neoformans* e VGI, VGII (sorotipo B), VGIII e VGIV (sorotipo C) para *C. gattii* (IQBAL et al., 2010; KWON-CHUNG et al., 2014). Uma nova

nomenclatura sugerida por Hagen et al. (2015), incluiria sete espécies: no complexo de espécies *C. neoformans* (*C. neoformans* e *C. deneoformans*) e no complexo *C. gattii* (*C. gattii*, *C. deuterogattii*, *C. bacillisporus*, *C. tetragattii* e *C. decagattii*). Porém, a proposta apresenta muitas controvérsias, por isso as espécies do gênero *Cryptococcus* podem ser classificadas de acordo com Kwon-Chung et al. (2017) (Figura 1).

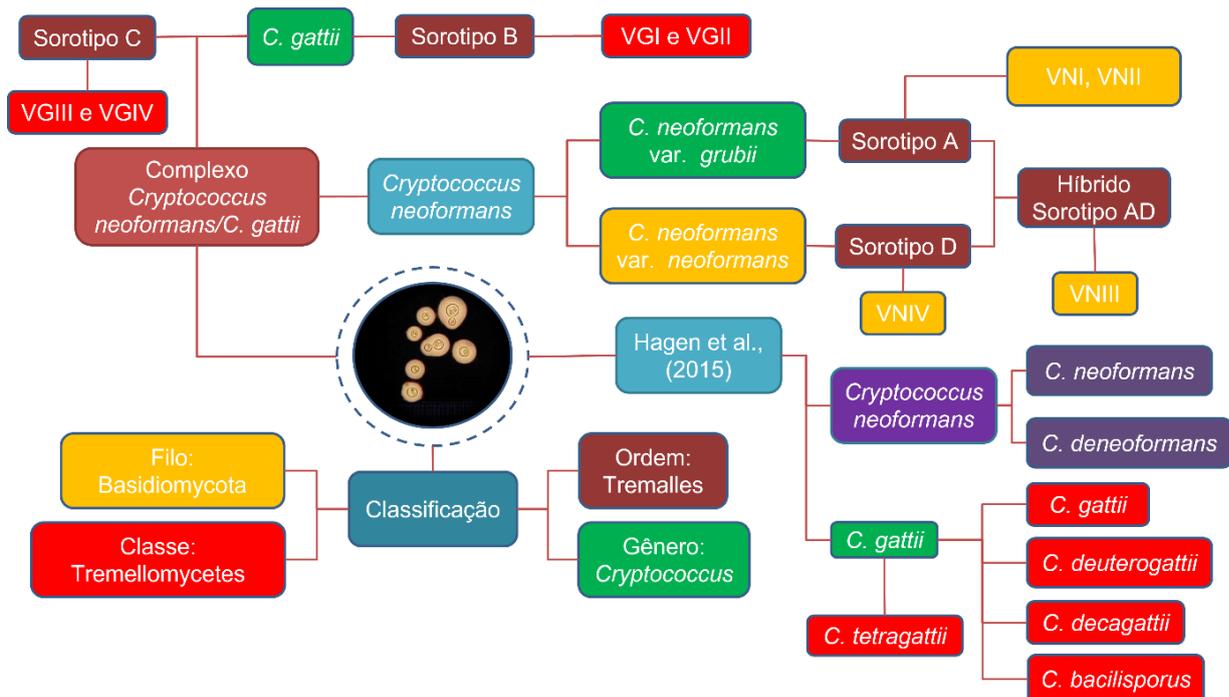


Figura 1 Fluxograma classificação das espécies de *Cryptococcus* e subtipos de acordo com Kwon-Chung et al. (2017), e nova nomenclatura sugerida por Hagen et al. (2015). Esta imagem foi criada no power point 10.

Para se proteger das agressões do meio externo, o *Cryptococcus* desenvolve alguns mecanismos e características que o tornam único. Essas espécies fúngicas possuem fatores de virulência que influenciam a resistência do *Cryptococcus* spp. e que conseguem despistar o sistema imunológico (FRANZOT; SALKIN; CASADEVALL, 1999; ZARAGOZA, 2019). Fatores de virulência são elementos de um patógeno que podem causar danos no hospedeiro (PIROFSKI; CASADEVALL, 2015). O *Cryptococcus* possui enzimas degradantes como proteases, lipases e urease, e são considerados fatores de virulência. Mas a cápsula e a melanina se destacam mais por atuarem como protetores a contra-ataques da resposta imune (ZARAGOZA, 2019).

2.2.2 Transmissão e Formas Clínicas

A principal forma dos gatos contraírem o agente fúngico é através da via aérea quando o microrganismo ressecado é inalado pela exposição ambiental, e afeta inicialmente a cavidade nasal (TRIVEDI et al., 2011; PIMENTA et al., 2015). O agente fúngico se aloja na mucosa nasal e inicia uma colonização desenvolvendo a doença local e/ou sistemicamente (PENNISI et al., 2013). Após a contaminação pela via aérea, o período de incubação do microrganismo pode levar meses a anos (MACDOUGALL; FYFE, 2006; CASTRODALE et al., 2013).

Os gatos podem apresentar sinais clínicos no trato respiratório superior como rinite, descarga nasal unilateral ou bilateral (CARDOSO et al., 2013), secreção com aspecto seroso, mucopurulento ou sanguinolento e espirros. Quando ocorre na forma cutânea, as lesões mais comuns são ulcerações, profundas causando deformação da pele com presença de granulomas (PENNISI et al., 2013), e formação de nódulos conhecido como nariz de palhaço (GUEDES et al., 2019). A infecção pode ocorrer ocasionalmente na cavidade oral, sistema linfático, otite média e interna, respiratório e SNC desencadeando alterações na função cognitiva e locomotora (BEATTY et al., 2000; MARTINS et al., 2011; TRIVEDI et al., 2011; PENNISI et al., 2013; PAULIN; MORSHED; ARMIÉN, 2013; LIVET et al., 2015; SIAK et al., 2015; NEWMAN; SCHAIBLE, 2019).

2.2.3 Diagnóstico

Inicialmente o diagnóstico em gatos com criptococose pode ser feito a partir da anamnese, exame físico e laboratoriais. Para a identificação das espécies do gênero *Cryptococcus*, vários métodos são empregados, desde a técnica de coleta e isolamento desses agentes até a tipagem molecular para diferenciar características genotípicas de cada agente fúngico. Os tipos de coletas podem ser realizados a partir de amostras da cavidade nasal (*swab*), por punção por agulha fina (PAF), líquido cefalorraquidiano, urina, fluidos abdominais e pleurais, linfonodos, pele, pulmão e medula óssea. A partir das amostras coletadas pode ser realizada através de exame citológico, isolamento e identificação em meios de cultura, exame histopatológico, detecção de antígenos pelo teste de ELISA, teste de antígeno criptococócico por aglutinação em látex, teste fluorescente de anticorpos (PENNISI et al., 2013; TRIVEDI et al., 2011) e biologia molecular (HNILICA, K. A., MEDLEAU, 2007).

2.2.4 Tratamento

Os antifúngicos mais utilizados no tratamento contra a criptococose em felinos são anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol (TRIVEDI et al., 2011; PENNISI et al., 2013; MYERS et al., 2017). O fluconazol e o itraconazol são os fármacos de eleição por causarem menos efeitos colaterais nos pacientes felinos (NUNES RODRIGUES; STROOBANTS; VANDENABEELE, 2020; VERCELLI et al., 2021). No entanto, estudos relatam que alguns agentes da criptococose apresentam resistência para fluconazol (SYKES et al., 2017; KANO; SUGITA; KAMATA, 2020).

2.3 Esporotricose em Gatos Domésticos

A esporotricose é uma doença infecciosa causada pelo fungo *Sporothrix* spp. Ela foi descrita por Benjamin R. Schenck (1898) quando isolou o agente a partir de lesões nos dedos de um paciente em um hospital nos Estados Unidos. No Brasil a doença foi descrita pela primeira vez em 1907 por Adolfo Lutz e Alfonso Splendore em ratos. A esporotricose é uma doença descrita mundialmente, assim como a criptococose, é encontrada em países de áreas tropicais e subtropicais (CHAKRABARTI et al., 2015). Os agentes etiológicos da esporotricose podem ser encontrados no solo, espinhos de roseira e madeiras em decomposição (CHAKRABARTI et al., 2015; LOPES-BEZERRA et al., 2018).

Mundialmente a esporotricose foi relatada nos Estados Unidos, Índia, Malásia, México, Panamá, Argentina, Brasil e Reino Unido (GREMIÃO et al., 2017; ETCHECOPAZ et al., 2021; BARNACLE et al., 2023). O *S. brasiliensis* é encontrado exclusivamente no Brasil e Argentina, e está principalmente associado a doenças zoonóticas, manifestando alterações graves em humanos devido sua alta virulência (CÓRDOBA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020; CRUZ et al., 2021; ETCHECOPAZ et al., 2021). Contudo o Estado do Rio de Janeiro é considerado hiperendêmico devido a um grande número de 4.703 casos de gatos infectados com esporotricose, que transmitiram a doença para humanos de forma acidental levando ao índice de 4.188 pessoas infectadas até 2015 (GREMIÃO et al., 2017).

2.3.1 Agentes

O *Sporothrix* é um fungo dimórfico, tem uma distribuição mundial, especialmente em países de zonas tropicais e subtropicais (DE LIMA BARROS et al., 2011; FICHMAN et al.,

2023). O complexo *Sporothrix schenckii* pertence ao filo Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomatales e família Ophiostomataceae (GUARRO; GENÉ; STCHIGEL, 1999). O complexo *Sporothrix neoformans* pertence ao “clado patogênico” que compreende quatro espécies como *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016). Existe outro complexo chamado “clado ambiental” que é composto pelo complexo *S. pallida* (*S. chilensis*, *S. mexicana*, *S. humicola* e *S. pallida ex-S. albicans*) e o complexo *S. stenoceras* (DE BEER; DUONG; WINGFIELD, 2016). Apesar do complexo *S. pallida* ser estritamente ambiental, é importante destacar que dentro dele incluem fungos que habitam o solo com potencial patogênico leve para humanos e animais (RODRIGUES et al., 2016), como por exemplo o *S. humicola* (MAKRI et al., 2020). (Figura 2)

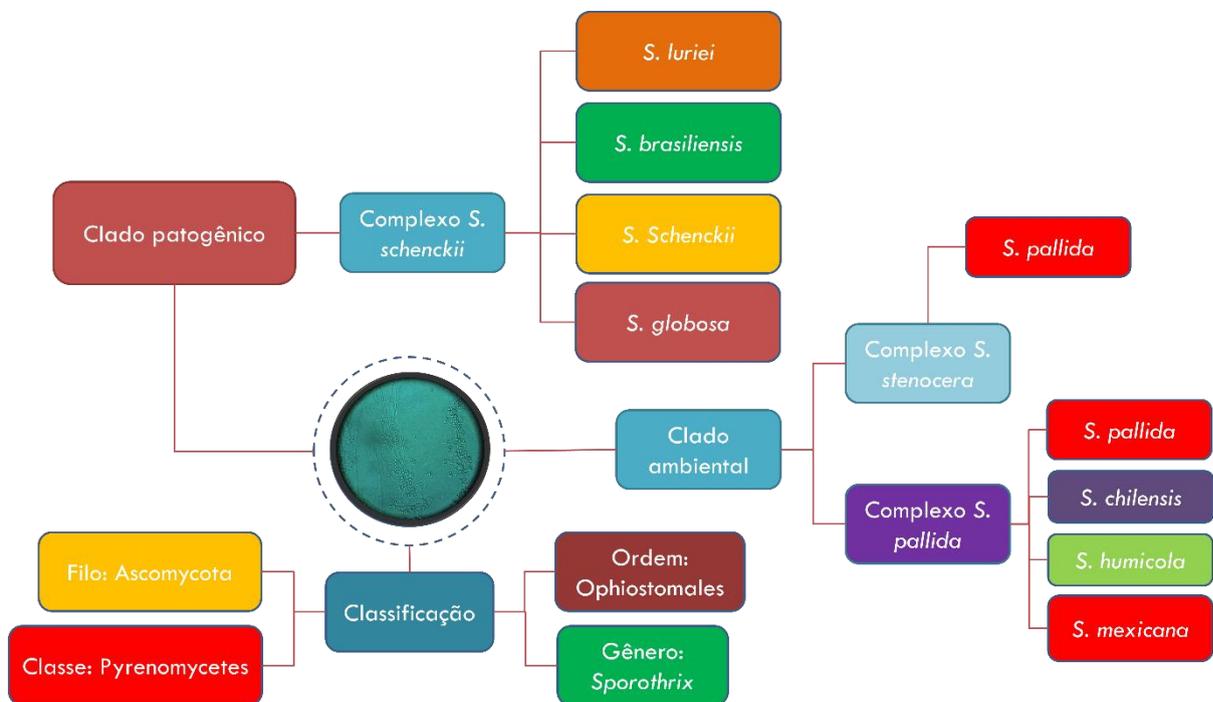


Figura 2 Fluxograma classificação das espécies de *Sporothrix* e subtipos divididos em clados patogênicos e Clado ambiental de acordo com De Beer; duong; wingfield (2016). Esta imagem foi criada no power point 10.

2.3.2 Transmissão e Formas Clínicas

A principal via de transmissão da esporotricose é por forma traumática através da inoculação do agente fúngico, uma vez que o *Sporothrix* está presente no solo, pode contaminar pessoas na área da agricultura e jardinagem (GREMIÃO et al., 2017). Porém a inoculação traumática mais comum está associada a arranhões e mordidas de gatos infectados (GREMIÃO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020). A forma sistêmica é menos comum de ocorrer, como por

exemplo, podendo migrar para os pulmões e desencadear uma esporotricose pulmonar primária (ALVES et al., 2020).

Após a inoculação do agente fúngico, pode manifestar vários sinais clínicos como lesões ulcerativas na região da cabeça, principalmente no focinho e na região das patas, devido ao comportamento de hábitos noturnos, vida livre, afiar as unhas, enterrar suas fezes e morder durante o cio e territorialidade (GREMIÃO et al., 2015). Manifestações clínicas consideradas atípicas, como forma sistêmica podem atingir osso, articulações, pulmões e o SNC (FRANCESCHI et al., 2017; OROFINO-COSTA et al., 2017; ARINELLI et al., 2019).

2.3.3 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da esporotricose felina é realizado através coleta de amostras de tecido de lesões cutâneas, aspirado de abscessos ou punção de nódulos é realizada para análise laboratorial. O material coletado é cultivado em meios de cultura específicos para crescimento do fungo (LLORET et al., 2013), como ágar Sabouraud, extrato de malte, ágar batata dextrose e meio BHI (Brain heart infusion agar. Para o isolamento dos agentes fúngicos da esporotricose, pode ser feito nas temperaturas de 25 °C para o crescimento na forma filamentosa e 35 a 37 °C para o crescimento leveduriforme em meio BHI (MORRIS-JONE, 2002). Além do cultivo, técnicas de coloração especial, como a coloração de Giemsa, podem ser utilizadas para observar a presença do fungo em amostras de tecido. Testes moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), também podem ser realizados para detectar o DNA do fungo de forma mais rápida e sensível (FERNANDES et al., 2011; GREMIÃO et al., 2015).

2.3.4 Tratamento

O tratamento eficaz para a esporotricose envolve o uso de antifúngicos orais, como iodetos, cetoconazol, itraconazol, anfotericina B e Terbinafina. Além disso, terapias de calor local e remoção cirúrgica de lesões podem ser utilizadas como alternativas para alcançar a cura da doença em gatos (PEREIRA et al., 2009; GREMIÃO et al., 2015). Os azóis e iodeto de potássio são as drogas mais utilizadas no tratamento da esporotricose felina (PEREIRA et al., 2010; REIS et al., 2012). Um método que tem oferecido um tratamento eficaz é a administração de ANF intranasal associada com ITZ via oral (GREMIÃO et al., 2011).

O itraconazol (ITZ) é atualmente considerada a droga de escolha para o tratamento da

esporotricose, a dose recomendada é de 8,3–27,7 mg/kg a cada 24 horas (GREMIÃO et al., 2015). Embora o ITZ seja o tratamento de eleição estudos *in vitro* relataram a emergência de *S. brasiliensis* com altos valores de MIC para este antifúngico no sul do Brasil (NAKASU et al., 2021; WALLER et al., 2021), caracterizando resistência antifúngica.

O CTZ pode ser usado para tratar a esporotricose felina, mas está associada a uma alta ocorrência de efeitos hepatotóxicos em gatos em comparação ao ITZ (PEREIRA et al., 2010). A dose recomendada para o tratamento da esporotricose felina é de 13,5–27,0 mg/kg a cada 12 ou 24 horas (GREMIÃO et al., 2015).

Pereira et al. (2010) compararam a eficácia e segurança do tratamento oral com cetoconazol ou itraconazol em 773 gatos com esporotricose. A taxa de cura foi de 30,8%, com 13,6% de óbitos por várias causas e 55,6% abandonaram ou continuaram o tratamento. O tempo médio de tratamento foi de 28 semanas, mais curto que um estudo anterior, devido ao maior tamanho da amostra e melhorias na estrutura do tratamento. Foram observados efeitos adversos em 39,6% dos gatos, sendo perda de apetite o mais comum (31,3%).

O tratamento de doenças fúngicas em gatos são consideradas um desafio devido as reações adversas que as drogas antifúngicas podem causar, o tempo de duração da terapia que pode levar em média 6 meses, e com isso leva o tutor abandonar o tratamento, como também alto custo da medicação (DA ROCHA et al., 2018).

2.4 Outros Agentes

Existem algumas micoses profundas que podem afetar os gatos além da Criptococose e Esporotricose. Essas doenças incluem:

A histoplasmose, blastomicose, coccidioidomicose e aspergilose são doenças fúngicas sistêmicas causada pelos principais agentes *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* ou *C. posadasii* e *Aspergillus fumigatus* (BARRS, 2018; JUNIANTITO et al., 2020; CAVALCANTE et al., 2022; SHAVER; FOY; CARTER, 2022). De uma forma geral, estas espécies são encontradas no solo contaminado, poeira e madeiras em decomposição (BRÖMEL; SYKES, 2005; REINHART et al., 2012; LLORET et al., 2013;). Entre estes quatro agentes fúngicos, o *Histoplasma* é encontrado em fezes de pássaros e morcegos (FIELDER et al., 2019; MELLO et al., 2019; GRINSTEAD et al., 2021; CAVALCANTE et al., 2022). A transmissão ocorre pela via aérea, quando os propágulos fúngicos, presentes no ar, são inalados. Os esporos podem se espalhar pelo corpo por via hematogênica e se alojar nos pulmões, causando

uma reação inflamatória (GRINSTEAD et al., 2021). Em casos mais graves, a infecção pode se disseminar para outros órgãos, como o fígado, baço e medula óssea (ALFARO-ALARCÓN et al., 2019; MELLO et al., 2019).

De uma forma geral, os sintomas causados por estes agentes fúngicos em gatos são semelhantes ao da criptococose, no qual podem desenvolver sintomas respiratórios, como tosse, espirros, dificuldade respiratória e falta de apetite (WOODS, 2003). No caso da blastomicose e a coccidioidomicose, podem afetar o SNC, alterações oculares (FOUREMAN et al., 2005; GILOR et al., 2006). A histoplasmose pode causar doenças intestinais e afetar o fígado (AULAKH; AULAKH; TROY, 2012). Para o diagnóstico da coccidioidomicose felina, pode ser feito a sorologia por meio do teste de imunodifusão em gel de ágar (GREENE; TROY, 1995).

Não existem estudos prospectivos sobre o tratamento de micoses sistêmicas felinas. Os dados disponíveis sobre o tratamento são baseados em estudos retrospectivos e relatos de casos (LLORET et al., 2013). O ITZ é o tratamento de escolha para a histoplasmose e a blastomicose (AULAKH; AULAKH; TROY, 2012). O cetoconazol ou fluconazol têm sido usados com mais frequência na coccidioidomicose felina (GREENE; TROY, 1995). As doses recomendadas são de 10 mg/kg via oral a cada 24 horas para o tratamento dessas enfermidades (LLORET et al., 2013).

2.5 Sensibilidade a Antifúngicos

Realizar o teste de sensibilidade antifúngica é de extrema importância na prática clínica e no controle de infecções fúngicas. Esse teste avalia a resposta dos fungos aos antifúngicos, determinando quais medicamentos são eficazes no tratamento de uma infecção específica nos gatos. Nem todos os antifúngicos são igualmente eficazes contra todos os tipos de fungos, e o teste de sensibilidade pode determinar qual medicamento será mais eficaz no combate à infecção (BAILLY et al., 2016). Ao conhecer a sensibilidade do fungo aos diferentes antifúngicos, o veterinário pode selecionar o tratamento mais adequado, evitando a administração de medicamentos ineficazes. Isso reduz o risco de efeitos colaterais e ajuda a prevenir o desenvolvimento de resistência aos antifúngicos (ODDS; BROWN; GOW, 2003).

No entanto, estudos vem demonstrando a resistência dos fungos ao ITZ e FLZ no tratamento da criptococose e esporotricose felina (KANO et al., 2015; BRITO-SANTOS et al., 2019; NAKASU et al., 2021; FICHMAN et al., 2022). Devido a esse problema, é importante realizar testes com novas drogas e investigar a concentração inibitória mínima (CIM) de outras drogas antifúngicas disponíveis no mercado. Por exemplo, o cetoconazol, quando administrado na dose recomendada, pode causar fortes efeitos colaterais nos felinos, o que inviabiliza seu uso no

tratamento dessas duas doenças (GREMIÃO et al., 2021; FICHMAN et al., 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Identificar os agentes causadores de micoses profundas em gatos (*Felis catus*) atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus–AM, bem como realizar o teste de sensibilidade antifúngica

3.2. Específicos

- Isolar e identificação molecular dos agentes das micoses profundas a partir de lesões sugestivas em gatos com suspeita clínica;
- Descrever as características clínica e epidemiológicas dos gatos acometidos com a criptococose e esporotricose;
- Investigar a sensibilidade dos isolados causadores de micoses profundas aos antifúngicos a anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Modelo de Estudo

O presente trabalho descritivo e prospectivo com a finalidade de isolar e identificar os agentes causadores de micoses profundas em gatos (*Felis catus*) atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus-AM. O fluxo das atividades do presente projeto está apresentado na Figura 3.

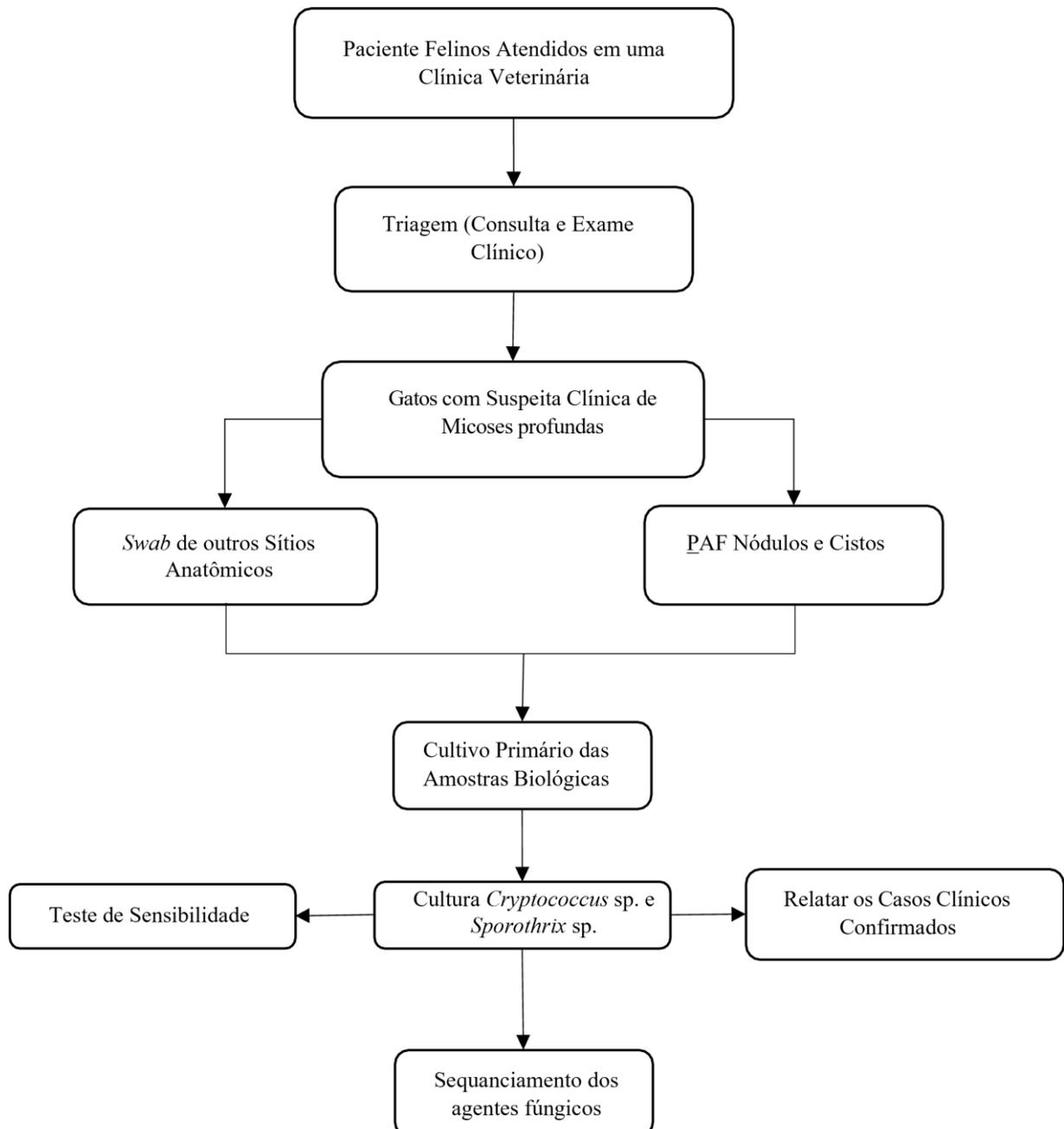


Figura 3 Fluxograma dos procedimentos e metodologia do presente projeto.

4.2 Universo do Estudo

4.2.1 Local de Estudo

O estudo foi realizado em uma clínica veterinária de atendimento exclusivo de felinos localizado no município de Manaus-AM e no Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Na clínica veterinária Gatum – Medicina Felina os gatos com sinais clínicos suspeitos de micoses profundas foram direcionados para um consultório no qual o tutor passou por uma entrevista, e os dados clínicos e epidemiológicos foram anotados em um prontuário.

Após a entrevista os pacientes felinos passaram por exames físicos quanto a aferição de temperatura, avaliação das mucosas, peso e escore corporal. Em seguida foram realizadas as coletas das amostras dos felinos, utilizando a técnica *Cat Friendly*, causando o mínimo de estresse possível nos pacientes felinos.

O médico veterinário fez o diagnóstico no seu atendimento clínico através do exame citológico. Após o diagnóstico foi enviada a amostra para o Laboratório de micologia do INPA para realizar o diagnóstico diferencial.

4.2.2 População de Estudo

A população de estudo foram gatos que apresentaram sinais clínicos compatíveis com suspeita de micose profunda (criptococose e esporotricose). Em resumo, os sinais clínicos foram: edema nasal, descarga nasal serosa, purulenta e/ou sanguinolenta, lesões ulceradas na cabeça, tronco, membros torácicos, pélvicos, calda, lesões oculares e otites.

4.2.3 Amostra Populacional Analisada no Estudo

Neste estudo foi feita uma amostragem de conveniência com gatos que foram atendidos em uma clínica veterinária privada chamada Gatum – Medicina Felina, localizada no bairro Dom Pedro I (Zona Centro-Oeste) no município de Manaus, Amazonas. O estudo foi realizado no período de outubro de 2022 a fevereiro de 2023. Nesse período foram investigados 38 animais.

Os pacientes felinos que foram incluídos no estudo apresentaram sinais clínicos de micoses profundas, da demanda espontânea da clínica veterinária e que receberam clientes-tutores de seu pet que, aceitaram participar da pesquisa mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 1).

Foram excluídas as amostras de animais que as culturas que apresentaram-se contaminadas e de animais que seus tutores decidiram abandonar o estudo.

4.2.4 Aspectos Éticos

Este estudo foi revisado pela Comissão de Ética e Uso dos animais do INPA (CEUA-INPA). O parecer substanciado sobre protocolos de pesquisas no uso de animais, relata que não é necessário a licença da CEUA, devido a pesquisadora responsável não participar diretamente da coleta das amostras, e sim, receber as amostras com os dados clínicos – epidemiológicos dos pacientes felinos no laboratório de Micologia do INPA para o isolamento e identificação dos agentes fúngicos. A data da liberação do parecer foi dia 13/03/2023 assinado pela presidente da CEUA – INPA Raimunda Liége Souza de Abreu.

4.2.5 Procedimentos

4.2.5.1 Diagnóstico Clínico e Epidemiológico dos gatos (questionário)

Para a compilação dos dados clínico-epidemiológicos dos felinos, um prontuário solicitando informações sobre os pacientes foi elaborado para os pacientes atendidos na clínica veterinária. Os tutores preencheram uma ficha de cadastro junto ao prontuário sobre seus dados pessoais e sobre os dados do paciente felino como raça, idade, sexo, cor da pelagem e peso.

No formulário elaborado no *google forms* continha questionamentos sobre o histórico clínico, local da residência (origem geográfica), estilo de vida se o gato é domiciliado, semidomiciliado, resgatado, convívio com outros gatos, sinais clínicos, local da lesão (se houver) e evolução da doença (<https://forms.gle/mQLfgPnvJQyfgbKg7>) (ANEXO 2).

4.2.5.2 Isolamento dos Agentes

4.2.5.2.1 Coleta das Amostras

- Gatos com Lesões Muconanais e Outras Alterações

Após a triagem foram realizadas as coletas dos gatos apresentando aumento no plano nasal. As amostras foram coletadas por punção por aspiração por agulha fina (PAF), no qual será inserida agulha hipodérmica 16G 1 ½ (1,60 x 40mm) e semeadas com a pressão do êmbolo de uma seringa de três mL no meio de cultura. A cavidade nasal que apresentou secreção como descarga nasal, ocular e auricular foi coletada com *swab* e cultivadas no meio de cultura (Figura 4).

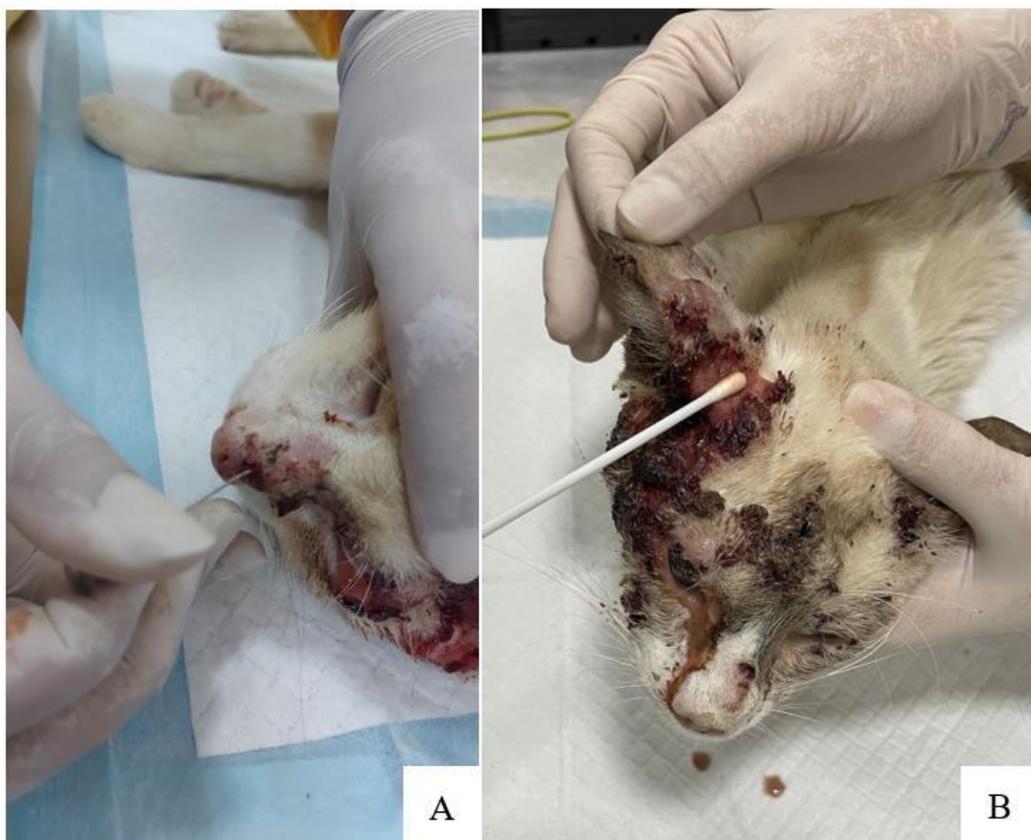


Figura 4 Gato com aumento do volume nasal, amostra sendo coletada por PAF (A); Gato com lesão cutânea ulcerada na região da cabeça, amostra sendo coletada com *swab* (B).

- Isolamento e Identificação dos Agentes de Micoses Profundas

As amostras de cada *swab* foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e placas de ágar níger, e incubado a 25 °C por 10 dias, as placas foram observadas a cada 24 horas. Colônias com características compatíveis para *Cryptococcus* e *Sporothrix* foram subcultivadas.

As colônias subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA) para identificação clássica pela técnica de macro e micromorfologia. A micromorfologia foi realizada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por 10 dias. A microscopia foi realizada com coloração com lactofenol azul de algodão após o microcultivo para observação das estruturas micromorfológicas dos fungos (LACAZ, 2002).

A identificação molecular dos fungos foi realizada através da extração do DNA usando o protocolo Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (FERRER et al., 2001)

As regiões ITS1-5.8S rRNA-ITS2 foram amplificadas por PCR usando os pares de *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (WHITE et al., 1990). As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose e em seguida purificados com Polietilenoglicol 8000 (PEG) 20% (PAITHANKAR; PRASAD, 1991). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada com produto de PCR purificado usando o kit BigDye Terminator v3.1, seguindo as recomendações do fabricante, e precipitado com Etanol/EDTA. As amostras foram eletroinjetadas no analisador automático ABI PRISM 3130xL (ThermoFisher) do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA - Brasil).

As sequências nucleotídicas de ITS geradas dos isolados foram conferidas, compiladas e editadas com o auxílio do programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e depositadas no NCBI GenBank com os números de acesso, respectivamente.

As sequências de DNA de espécies relacionadas recuperadas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) foram comparadas às obtidas considerando valores acima de 97% de similaridade. A árvore de distância genética foi gerada usando o método de agrupamento de vizinhos (NJ - *Neighbor Joining*) com o auxílio do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018). As porcentagens de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste *bootstrap* (1000 réplicas) também foram determinadas.

4.3 Avaliação da Sensibilidade Antifúngica

Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo M27 e M38-A3 recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017a, 2017b).

A solução estoque de antifúngicos ANF, ITZ e CTZ foram preparadas previamente diluídas em dimetilsulfóxido a 10% (DMSO) e a de fluconazol diretamente em meio RPMI 1640. Em seguida, as soluções foram diluídas em meio RPMI 1640 líquido (pH= 7,0) tamponado com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS). Todas as soluções foram armazenadas a uma temperatura de -20 °C até o momento do uso.

Para a preparação do inóculo fúngico, as cepas foram previamente reativadas e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas para *Cryptococcus* e cinco dias para *Sporothrix*. Em seguida foi feita a suspensão de células em 5 mL de solução salina estéril (0,85%) e a quantificação delas em câmara de Neubauer. De acordo com a quantidade de células presentes na solução foi calculada uma concentração final de 2×10^3 células/mL para *Cryptococcus* e 2×10^4 células/mL para *Sporothrix* e posteriormente o volume correspondente do inóculo inicial foi transferido para um novo tubo contendo 10 mL de meio RPMI 1640.

Para a microdiluição em caldo, primeiramente 100 µL de meio RPMI 1640 foi distribuído aos 96 poços da microplaca, em seguida 100 µL da solução da droga foram transferidos a partir da segunda coluna com o auxílio da pipeta multicanal, realizando adição seriada da droga até o poço número dez. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico nos poços da 1ª até a 11ª coluna da placa para o controle positivo. A 12ª coluna ficou com o controle negativo. A faixa de concentração testada para o FLZ era de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL e a da ANF, CTZ e ITZ de 0,062 µg/mL a 16 µg/mL.

As microplacas de *Cryptococcus* foram incubadas a 35 °C por 72 horas, enquanto para o *Sporothrix* 120 horas. Após este tempo foi realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o crescimento nos poços do controle positivo. A CIM da ANF foi determinada como a menor concentração capaz de inibir completamente (100%) o crescimento fúngico e para os azólicos (50%) a que gerar o uma redução parcial quando comparado ao crescimento nos poços do controle positivo.

4.4 Análise estatística

O isolamento dos agentes causadores de micoses profundas foi realizado em triplicata. A construção da árvore filogenética foi feita utilizando o modelo Neighbor-Joining (NJ) e o modelo p-distance, com bootstrap de 1.000 replicatas. Essa árvore filogenética foi construída usando o software Mega versão v.10.0.2, a partir do alinhamento dos sequenciamentos obtidos.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados e discussão do presente trabalho estão apresentados em formato de artigo, o qual será submetido a revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Artigo Original

Caracterização dos Agentes Causadores de Micoses Profundas em Gatos (*Felis catus*) Atendidos em uma Clínica Veterinária na Cidade de Manaus – AM: Isolamento, Identificação e sensibilidade antifúngica

Nayara de Fátima Lazameth Diniz^[1,2], Adriana Oliveira da Silva Queiroz^[6], Alana Attademo Curi Vital^[6], Luciana Aires de Oliveira^[2]; Naira Sulany Oliveira de Sousa^[2,5], Juana Diego Ribeiro de Almeida^[2,4] Ana Cláudia Alves Cortez^[2], Flávia da Silva Fernandes^[3], Jaqueline da Silva Batista^[3] e João Vicente Braga de Souza^[2]

[1] Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus – AM, Brasil.

[2] Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Manaus - AM, Brasil.

[3] Laboratório Temático de Biologia Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus - AM, Brasil.

[4] Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Manaus, - AM, Brasil.

[5] Pós-graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade do Estado Amazonas, Manaus - AM, Brasil.

[6] Clínica Veterinária Gatum – Medicina Felina, Manaus – AM, Brasil.

Resumo

Este estudo teve como objetivo principal isolar e identificar os agentes causadores de micoses profundas em gatos atendidos em uma clínica veterinária em Manaus-AM, além de realizar o teste de sensibilidade antifúngica. O projeto incluiu a identificação molecular dos agentes das micoses, a descrição das características clínicas e epidemiológicas dos gatos afetados por criptococose e esporotricose, bem como a investigação da sensibilidade dos isolados aos antifúngicos anfotericina B, cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Foram coletadas 38 amostras de gatos com suspeita de esporotricose. Destes 78,9% apresentaram agentes fúngicos, sendo que 96,6% foram identificados como *Sporothrix* spp. e apenas 3,3% (n=1) como *Cryptococcus* spp. A maioria dos gatos afetados pela esporotricose eram do sexo masculino (82,7%) e tinham dois anos de idade (48,2%). Gatos semi-domiciliados ou de vida livre foram os mais afetados, vivendo na área urbana de Manaus.

A identificação molecular dos agentes fúngicos foi realizada através do sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4. Todos os três isolados de *Sporothrix* que foram analisados por sequenciamento apresentaram sequências 100% similares ao isolado tipo de *Sporothrix brasiliensis*. O isolado causador do caso de criptococose apresentou sequência 100% similar a *Cryptococcus neoformans*. O teste de susceptibilidade antifúngica mostrou que, dos 29 isolados de *Sporothrix* e o isolado *Cryptococcus neoformans*, todos apresentaram sensibilidade aos antifúngicos utilizados na rotina em veterinária.

Palavras – Chave: *Cryptococcus*, *Sporothrix*, Felinos, Sequenciamento, Amazonas

INTRODUÇÃO

A esporotricose e a criptococose são doenças fúngicas graves que acometem humanos e animais (MARUYAMA et al., 2019; SIEW HAN; KANO, 2021). São micoses causadas pelos complexos *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* (FERREIRA et al., 2019; KWON-CHUNG et al., 2017). Ambos os fungos têm distribuição mundialmente (BRITO-SANTOS et al., 2019; SIEW HAN; KANO, 2021). Entre os animais, os gatos são mais suscetíveis a contraírem essas micoses. Os gatos são infectados através de traumas e inoculação do *Sporothrix* na pele (ZHOU et al., 2014) e por via aérea pelo *Cryptococcus* (COELHO; FARRER, 2020). São doenças fúngicas graves que causaram alta taxa de mortalidade em felinos para criptococose e esporotricose (DUNCAN et al., 2006; LECCA et al., 2020).

No Brasil, os casos de esporotricose concentravam-se no Estado do Rio de Janeiro, apresentando mais de 5.000 casos de contaminação animal (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2015). Outros estados como Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e mais recentemente no Nordeste também apresentaram relatos de gatos infectados (LECCA et al., 2020; VALERIANO et al., 2020; MASCHIO-LIMA et al. 2021; SPANAMBERG et al., 2021; BERNARDES-ENGEMANN et al., 2022; MARQUES et al., 2022).

Estudos sobre a identificação e de *Cryptococcus* em felinos são mais raros no Brasil. Desde a primeira descrição em 1971, foram relatados apenas 27 casos de criptococose felina (BRITO-SANTOS et al., 2019). Devido a sua variedade genética é importante investigar a prevalência do tipo molecular de maior virulência no país.

Na medicina veterinária, realizar o diagnóstico da esporotricose e a criptococose é um desafio na região norte do Brasil. Além da dificuldade de diferenciar os sinais clínicos entre as doenças, a realização de múltiplos métodos analíticos pode ser um fator limitante (DA SILVA, 2021). No Estado do Amazonas, há apenas dois relatos de casos de criptococose em gatos, identificada somente como *C. gattii* (SILVA FILHO et al., 2017). Sobre dados de relatos de casos de esporotricose felina no Amazonas, ainda é desconhecida. A identificação de ambas as espécies é importante por se tratar de doenças fatais para os felinos (SIEW HAN; KANO, 2021). Para a saúde pública a Esporotricose é uma doença zoonótica. A criptococose não, porém serve como um alerta, evitando que ocorra um surto na região (ALMENDROS et al., 2020).

O presente trabalho teve como objetivo isolar, identificar os agentes causadores de micoses profundas, bem como investigar a susceptibilidade do Cetoconazol, Fluconazol, Itraconazol e Anfotericina B em gatos na cidade Manaus -AM. Com o avanço da disseminação das doenças fúngicas em várias regiões do Brasil, espera-se identificar os microrganismos prevalentes nos gatos de atendimento clínico de rotina.

MATERIAL E MÉTODOS

Universo do Estudo

Modelo de Estudo

O presente trabalho descritivo e prospectivo que foi realizado com a finalidade de descrever os genótipos e sensibilidade a antifúngicos dos agentes etiológicos da criptococose e esporotricose em felinos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus/AM

Local de Estudo

O estudo foi realizado em uma clínica veterinária de atendimento exclusivo de felinos localizado no município de Manaus-AM e no laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

Na clínica veterinária Gatum – Medicina Felina os gatos com sinais clínicos suspeitos de criptococose e esporotricose foram direcionados para um consultório no qual o tutor passou por uma entrevista e os dados clínicos e epidemiológicos foram anotados em um prontuário. Após a entrevista os pacientes felinos passaram por exames físicos quanto a aferição de temperatura, avaliação das mucosas, peso e escore corporal. Em seguida, foram realizadas

as coletas das amostras dos felinos, utilizando a técnica *Cat Friendly*, causando o mínimo de estresse possível nos pacientes felinos.

No Laboratório de micologia do INPA as amostras coletadas dos felinos foram semeadas em meio de cultura para o isolamento, durante o período de crescimento as cepas fúngicas foram avaliadas quanto ao seu crescimento e separadas aquelas que apresentarem colônias características de leveduriforme para *Cryptococcus* e filamentosa para *Sporothrix*.

População de Estudo

A população de estudo foram os gatos que apresentaram sinais clínicos compatíveis com micoses profundas. Em resumo, os sinais clínicos são: edema nasal, descarga nasal serosa, purulenta e/ou sanguinolenta, lesões ulceradas na cabeça, tronco, membros torácicos, pélvicos, calda, lesões oculares e otites.

Amostra Populacional a ser Analisada no Estudo

Neste estudo foi feita uma amostragem de conveniência com gatos que são atendidos em uma clínica veterinária privada chamada Gatum – Medicina Felina, localizada no bairro Dom Pedro I (Zona Centro-Oeste) no município de Manaus, Amazonas. De acordo com as informações da clínica, são atendidos aproximadamente 16 gatos suspeitos entre criptococose e esporotricose por mês.

Foram incluídos no estudo os animais que apresentaram sinais clínicos de esporotricose e criptococose, da demanda espontânea da clínica veterinária e que receberem clientes-tutores de seu pet que, aceitem participar da pesquisa mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE).

Foram excluídas as amostras de animais que as culturas de *Sporothrix* e *Cryptococcus* contaminadas, de animais que seus tutores decidirem abandonar o estudo.

Aspectos Éticos

Este estudo foi revisado pela Comissão de Ética e Uso dos animais do INPA (CEUA-INPA). O parecer consubstanciado sobre protocolos de pesquisas no uso de animais, relata que não é necessário a licença da CEUA, devido a pesquisadora responsável não participar diretamente da

coleta das amostras, e sim, receber as amostras com os dados clínicos – epidemiológicos dos pacientes felinos no laboratório de Micologia do INPA para o isolamento e identificação dos agentes fúngicos. A data da liberação do parecer foi dia 13/03/2023 assinado pela presidente da CEUA – INPA Raimunda Liége Souza de Abreu.

Procedimentos

Diagnóstico Clínico e Epidemiológico dos Animais (questionário)

Para a compilação dos dados clínico-epidemiológicos dos felinos, um prontuário solicitando informações sobre os pacientes foi elaborado para os pacientes atendidos na clínica veterinária. Os tutores preencheram uma ficha de cadastro junto ao prontuário sobre seus dados pessoais e sobre os dados do paciente felino como raça, idade, sexo, cor da pelagem e peso.

No formulário elaborado no google forms contiveram questionamentos sobre o histórico clínico, local da residência (origem geográfica), estilo de vida se o gato é domiciliado, semidomiciliado, resgatado, convívio com outros gatos, sinais clínicos, local da lesão (se houver) e evolução da doença (<https://forms.gle/mQLfgPnvJQyfgbKg7>).

Isolamento dos Agentes

Coleta das amostras

Após a triagem os pacientes felinos foram realizados as coletas. Os felinos com edema nasal foram coletados uma amostra por punção por agulha fina (PAAF), no qual foi inserida agulha hipodérmica 16G 1 ½ (1,60 x 40mm) (Figura 1) e semeadas com a pressão do êmbolo de uma seringa de três ml no meio de cultura. A cavidade nasal que apresentar descarga nasal, ocular e auricular foram coletadas com *swab* e cultivadas no meio de cultura (ver figura 5).

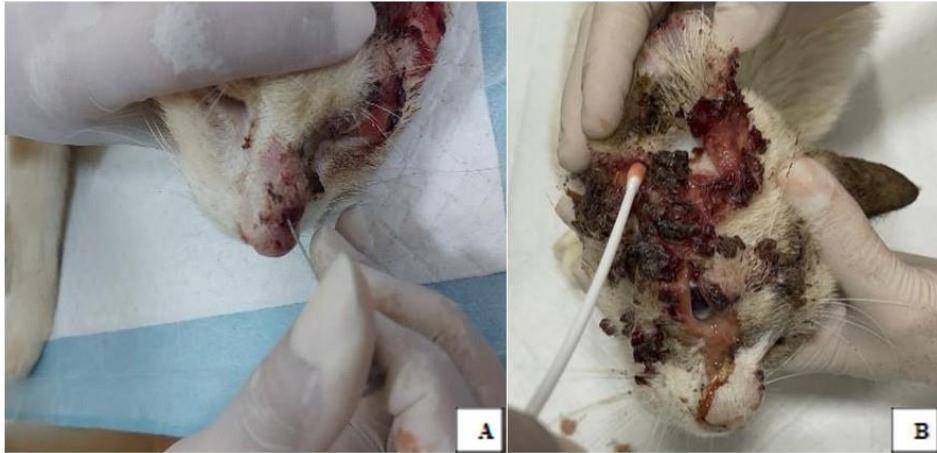


Figura 5 Gato com aumento do volume nasal, amostra sendo coletada por PAAF (A); Gato com lesão cutânea ulcerada na região da cabeça, amostra sendo coletada com *swab* (B).

Isolamento e Identificação dos fungos

As amostras de cada *swab* foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud e placas de Ágar Niger e incubado a 25 °C por duas semanas, as placas foram observadas a cada 24 horas. Colônias com características compatíveis de *Sporothrix* e *Cryptococcus* foram subcultivadas.

As colônias subcultivadas em ágar Sabouraud dextrose (SDA) para identificação clássica pela técnica de macro e micromorfologia. A macromorfologia foi realizada em placas de Petri contendo ágar Sabouraud por 10 dias. A microscopia foi realizada com coloração com lactofenol azul de algodão após o microcultivo para observação das estruturas micromorfológicas dos fungos (LACAZ, 2002).

A identificação molecular dos fungos foi realizada através da extração do DNA usando o protocolo Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (FERRER et al., 2001).

As regiões ITS1-5.8S rRNA-ITS2 foram amplificadas por PCR usando os pares de *primers* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3) (WHITE et al., 1990). As condições de amplificação consistiram em desnaturação inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min, anelamento dos *primers* a 53°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose

e em seguida purificados com Polietilenoglicol 8000 (PEG) 20% (PAITHANKAR; PRASAD, 1991). A reação de sequenciamento nucleotídico foi realizada com produto de PCR purificado usando o kit BigDye Terminator v3.1, seguindo as recomendações do fabricante, e precipitado com Etanol/EDTA. As amostras foram eletro- injetadas no analisador automático ABI PRISM 3130xL (ThermoFisher) do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM/INPA - Brasil).

As sequências nucleotídicas de ITS geradas dos isolados foram conferidas, compiladas e editadas com o auxílio do programa BioEdit 7.0.9.0 (HALL, 1999) e depositadas no NCBI GenBank com os números de acesso, respectivamente.

As sequências de DNA de espécies relacionadas recuperadas do banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990) foram comparadas às obtidas considerando valores acima de 97% de similaridade. A árvore de distância genética foi gerada usando o método de agrupamento de vizinhos (NJ - *Neighbor Joining*) com o auxílio do programa MEGA X (KUMAR et al., 2018). As porcentagens de árvores replicadas nas quais os táxons associados se agruparam no teste *bootstrap* (1000 réplicas) também foram determinadas.

Determinação da CIM frente aos antifúngicos convencionais

Os procedimentos serão realizados de acordo com o protocolo M27 e M38-A3 recomendado pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE (CLSI, 2017a e b). As soluções estoque de antifúngicos anfotericina B (ANF), itraconazol (ITR) e cetoconazol (CTZ) serão preparadas previamente diluídas em dimetil sulfoxido (DMSO) e a de fluconazol (FLZ) diretamente em meio RPMI 1640. Em seguida as soluções serão diluídas em meio RPMI 1640 líquido (pH= 7,0) tamponado com ácido morfolino propanossulfônico (MOPS). Todas as soluções serão armazenadas a uma temperatura de -20 °C até o momento do uso.

Para a preparação do inóculo fúngico, as cepas foram previamente reativadas e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose por 48 horas. Em seguida será feita a suspensão de células em 5 ml de solução salina estéril (0,85%) e a quantificação delas em câmara de Neubauer. De acordo com a quantidade de células presentes na solução será calculada uma concentração final

de 2×10^3 células/ml e posteriormente o volume correspondente do inóculo inicial será transferido para um novo tubo contendo 10 ml de meio RPMI 1640.

Para a microdiluição em caldo, primeiramente 100 µL de meio RPMI 1640 foi distribuído aos 96 poços da microplaca, em seguida 100 µL da solução da droga foram transferidos a partir do segundo poço com o auxílio da pipeta multicanal, realizando a diluição seriada da droga até o poço número dez. Por fim, foram adicionados 100 µL do inóculo fúngico nos poços da 1ª até a 11ª coluna da placa para o controle positivo. A 12ª coluna ficou com o controle negativo. A faixa de concentração testada para o FLZ era de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL e a da ANF, CTZ e ITZ de 0,062 µg/mL a 16 µg/mL.

As microplacas serão incubadas a 35 °C por 72 horas, após este tempo será realizada a leitura visual da concentração inibitória mínima (CIM), tendo como comparação o crescimento nos poços do controle positivo. A CIM da ANF será determinada como a menor concentração capaz de inibir completamente (100%) o crescimento fúngico e para os azólicos a que gerar o uma redução parcial (50%) quando comparado ao crescimento nos poços do controle positivo.

Análise estatística

O isolamento dos agentes causadores de micoses profundas foi realizado em triplicata. A construção da árvore filogenética foi feita utilizando o modelo Neighbour-Joining (NJ) e o modelo p-distance, com bootstrap de 1.000 replicatas. Essa árvore filogenética foi construída usando o software Mega versão v.10.0.2, a partir do alinhamento dos sequenciamentos obtidos.

RESULTADOS

Isolamentos de Agentes Fúngicos

Foram coletadas 38 amostras de gatos, 78,9% (30/38) apresentaram agentes fúngicos. Destes, 96,6% (29/30) foram identificados como *Sporothrix* spp., enquanto apenas 3,3% (1/30) foram positivos para *Cryptococcus* sp. (ver Tabela 1). Os gatos com lesões cutâneas na face, olhos, e aumento do volume nasal (nariz de palhaço) foram diagnosticados com *Sporothrix brasiliensis* (ver Figura 6). Já um gato com acometimento do agente *Cryptococcus neoformans* foi ilustrado na Figura 7.

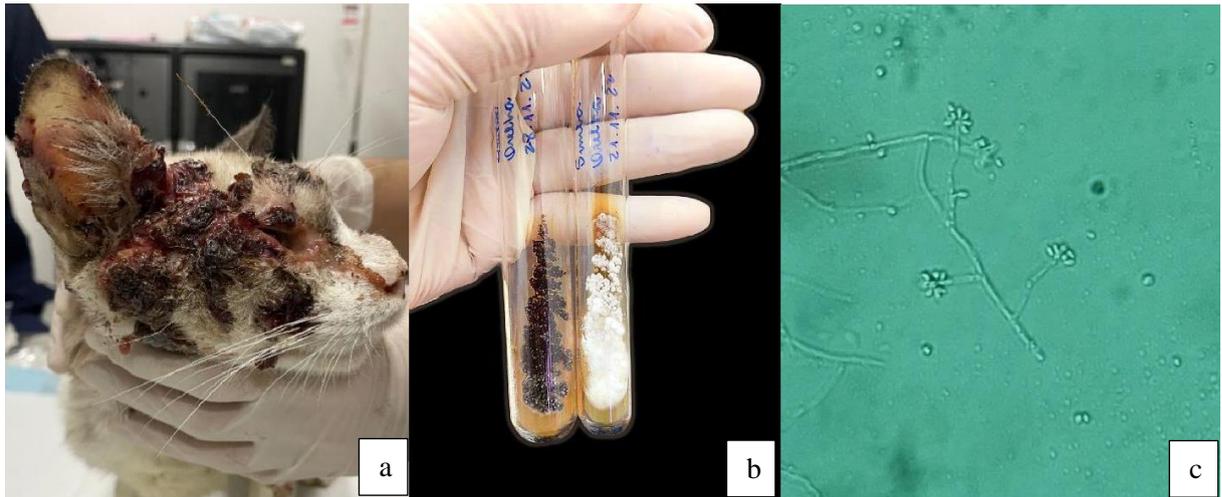


Figura 6 Lesão em Felino, Cultura e Cultivo de *Sporothrix brasiliensis*. a) felino com lesão na face lateral com comprometimento do tecido cutâneo com disseminação para a região ocular, orelha e aumento no plano nasal; b) macroscopia de *S. brasiliensis* em um período de incubação para a região ocular, orelha em meio ágar Sabouraud; c) microscopia de *S. brasiliensis* com a característica de uma flor (margarida) observada na objetiva 40X.

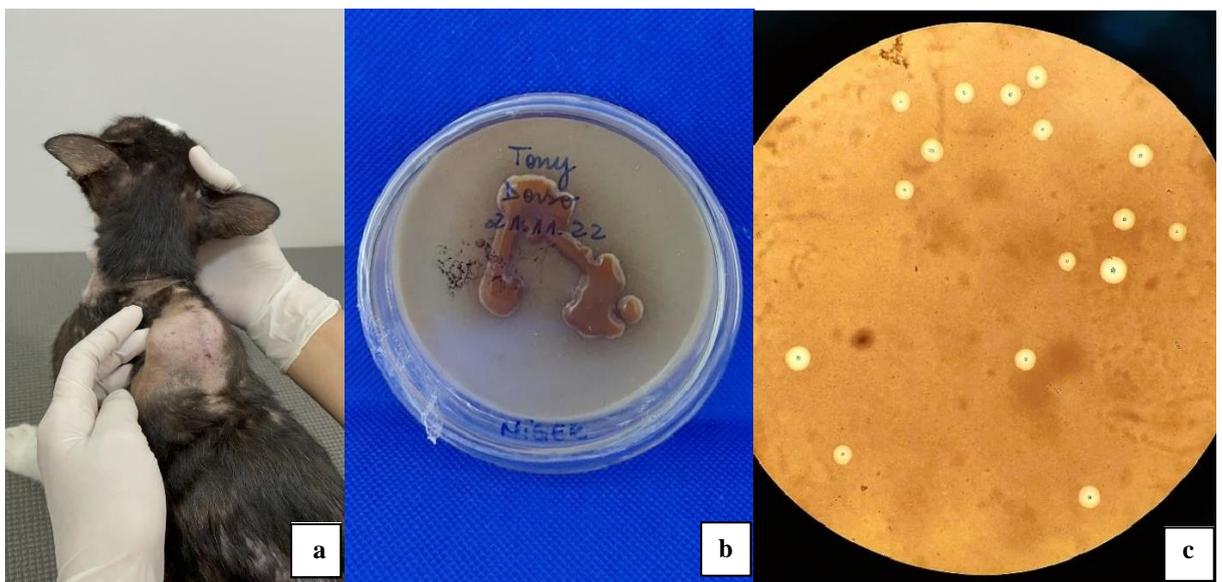


Figura 7 Lesão cutânea, cultivo, macro e microscopia fúngica de *Cryptococcus neoformans*. a) felino apresentando área alopecica com aumento na região dorsal interescapular; b) macroscopia de *C. neoformans* em um período de incubação de 8 dias cultivado em ágar Níger; c) microscopia de *C. neoformans* observado na objetiva 40X.

Características Clínico e Epidemiológicas

O estudo dos aspectos clínicos e epidemiológicos da Esporotricose em gatos com lesões na clínica veterinária revelou que a maioria dos gatos afetados pela doença é do sexo masculino (82,7% ou 24 dos 29 gatos). Os gatos com idade de dois anos (48,2% ou 14 dos 29 gatos) foram os mais afetados, enquanto gatos com idade de seis meses, oito meses, quatro anos e sete anos foram menos afetados (3,4% ou 1 dos 29 gatos). Quanto ao estilo de vida dos gatos, os semidomiciliados e os de vida livre (44,8% ou 13 dos 29 gatos) foram os mais afetados.

Estes gatos têm um lar, mas também têm acesso livre às ruas. Todos os gatos semidomiciliados e de vida livre viviam na área urbana na cidade de Manaus, AM. (Tabela 1)

Tabela 1. Características Clínicas e Epidemiológicas da Criptococose e da Esporotricose em Gatos de Manaus.

Características epidemiológicas e clínicas	Criptococose Isolados positivos (%)	Esporotricose Isolados positivos (%)
Idade		
6 meses		1/29 (3,4%)
8 meses		1/29 (3,4%)
1 ano	1/1 (100%)	6/29 (20,6%)
2 anos		14/29 (48,2%)
3 anos		5/29 (17,2%)
4 anos		1/29 (3,4%)
7 anos		1/29 (3,4%)
Sexo		
Macho	1/1 (100%)	24/29 (82,7%)
Fêmea		5/29 (17,2%)
Estilo de vida		
Domiciliado		3/29 (10,3%)
Semidomiciliado	1/1 (100%)	13/29 (44,8%)
Vida livre		13/29 (44,8%)
Lesão cutânea		25/29 (86,2%)
Lesão subcutânea	1/1 (100%)	3/29 (10,3%)
Lesão ocular		1/29 (3,4%)

Identificação do Isolados Através do Sequenciamento das regiões ITS1 e ITS4

Na presente investigação, a identificação molecular dos agentes fúngicos *Sporothrix* e *Cryptococcus* foi realizada por meio de sequenciamento de regiões específicas. Para o *Sporothrix*, a região ITS foi utilizada e todos os 5 isolados avaliados apresentaram sequências similares a 100% com o isolado tipo de *Sporothrix brasiliensis* TYPE NCBI. A Figura 3 ilustra a árvore filogenética dos isolados deste estudo e de outros agentes fúngicos presentes na base de dados NCBI.

Observou-se que houve relação de ancestralidade dos três isolados com cepas referências de *S. schenckii* CFP 00746, *S. brasiliensis* CFP 00551 e o que consta no banco de dados da NCBI para a comparação de similaridade. O isolado 10 mostrou 100% de

compatibilidade com o isolado *C. neoformans* MG46461666.1 do NCBI. Observou-se também a relação de parentesco e compartilhamento de ancestralidade dos isolados 34 e 36 de 78% com a cepa de referência CFP 00551 e *S. brasiliensis* KP890194.1(Figura 8).

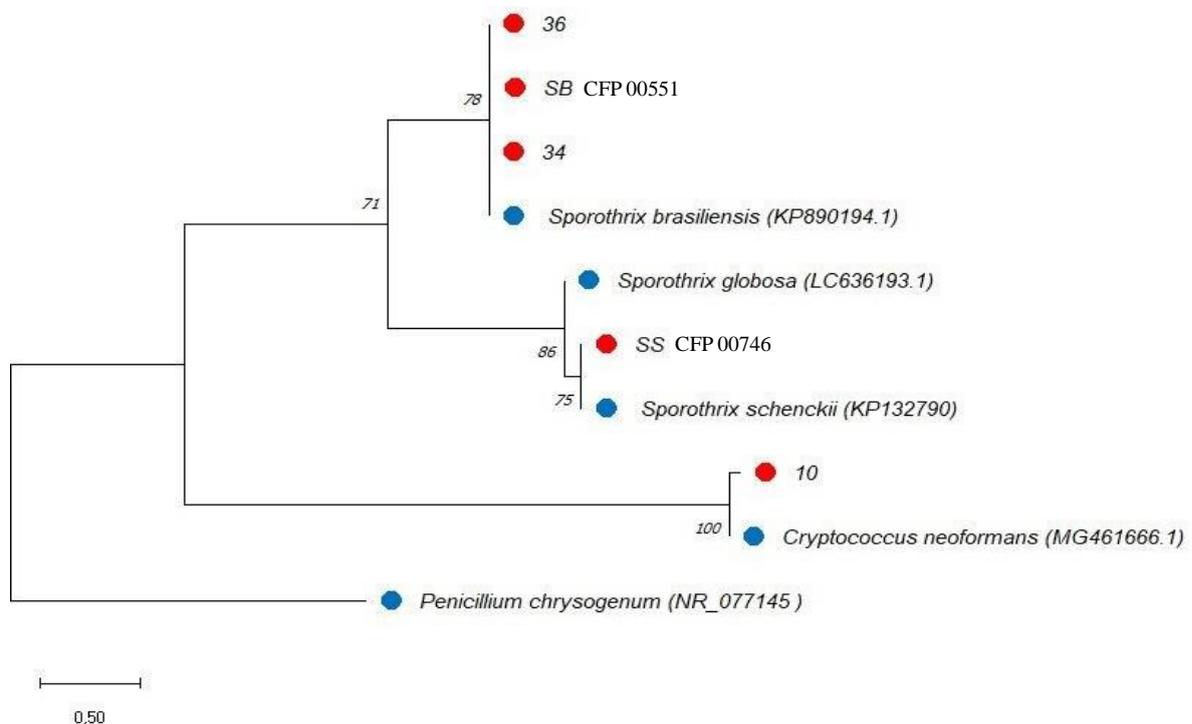


Figura 8 Árvore filogenética Neighbour-Joining (NJ), construída para o marcador molecular espaçador transcrito interno (ITS) no software MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As amostras de cepas selecionadas: 10, 34 e 36 com o controle positivo (C+), foram utilizadas as cepas SS e SB. O *Penicillium chrysogenum* NR_077145 foi usado como grupo externo.

Sensibilidade Antifúngica

O teste de susceptibilidade antifúngica foi realizado em isolados fúngicos de *Sporothrix* e *Cryptococcus*, utilizando os principais antifúngicos usados na medicina veterinária para gatos. O objetivo era determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de acordo com as normas da CLSI (2017a e b). Na tabela 3, é possível ver as espécies fúngicas e as concentrações dos antifúngicos. Em geral, a CIM variou de 0,062 a 8 µg/mL para as duas espécies fúngicas isoladas. Dos 29 isolados de *S. brasiliensis*, a maior CIM foi encontrada para o fluconazol (64 µg/mL) e a menor para o cetoconazol (0,25 µg/mL). Já o isolado de *Cryptococcus neoformans* apresentou maior CIM para o fluconazol (4 µg/mL).

Tabela 2. Distribuição das concentrações inibitórias mínimas (CIM), faixa e média geométrica dos isolados de *Sporothrix* e *Cryptococcus* em gatos da cidade de Manaus-AM.

Antifúngico	Espécie Fúngica	n	MG*	Faixa µg/mL
Anfotericina B			7,27	4 - 8
Cetoconazol	<i>S. brasiliensis</i>	29	0,25	0,125 - 0,5
Itraconazol			0,57	0,25 - 1
Fluconazol			64	64
Anfotericina B			2	2 - 8
Cetoconazol	<i>C. neoformans</i>	1	0,062	0,062 - 8
Itraconazol			2	2 - 8
Fluconazol			4	4 - 32

*Média Geométrica

6 DISCUSSÃO

O presente artigo apresenta os resultados de uma pesquisa que investigou a prevalência de agentes fúngicos em casos positivos de infecções em gatos. Os resultados mostraram a predominância de *Sporothrix brasiliensis* em casos de esporotricose felina, além da presença de *Cryptococcus neoformans* na região amazônica. A análise dos aspectos clínicos e epidemiológicos revelou que a esporotricose afeta principalmente gatos machos e com idade de dois anos. O estudo destaca a importância do diagnóstico e identificação molecular dos agentes

fúngicos em gatos, bem como a necessidade de monitorar a susceptibilidade antifúngica para melhorar a eficácia do tratamento.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram a predominância de agentes fúngicos em casos positivos de infecções em gatos, com destaque para o gênero fúngico *Sporothrix* spp que foi encontrada em 96,6% dos casos (29/30). Deve-se salientar que dois dos isolados de *Sporothrix* spp. foram identificados como *S. brasiliensis* por sequenciamento da região ITS. Recentemente, um estudo realizado no Estado Espírito Santo por Rediguiéri et al. (2022), mostrou resultados similares ao nosso sobre esporotricose felina, no qual a maioria dos casos analisados 92,5% foram causados por *S. brasiliensis*. A esporotricose já se encontra em quase todo o território brasileiro. Sobre a evolução temporal e prevalência da esporotricose causada por *S. brasiliensis* em outros Estados do Brasil são descritas por Rodrigues et al. (2022). Dessa forma, potencialmente, os demais 28 isolados do presente estudo também são da espécie *S. brasiliensis*.

Além disso, neste estudo, foi encontrado um gato com criptococose causada por *Cryptococcus neoformans*. Esse resultado está de acordo com a literatura que demonstra a importância dessa espécie para a doença em felinos (DE OLIVEIRA CARVALHO DA SILVA; SOUZA; PEREIRA, 2021). Em outros Estados do Brasil o *C. neoformans* foi isolado em 19 gatos no Rio de Janeiro (REIS et al., 2021). Porém, é necessário realizar mais estudos sobre a incidência e prevalência da criptococose felina com uma amostragem maior para verificar a real situação da doença no Estado do Amazonas e outras regiões do Brasil. Segundo o histórico clínico do paciente felino com criptococose neste estudo, no local da residência, havia muitos pombos. Visto que o *C. neoformans* foi isolado das fezes de pombos presentes no ambiente na cidade de Manaus - AM, conforme descrito por Alves et al. (2016).

A análise dos aspectos clínicos e epidemiológicos revelou que a esporotricose afetou principalmente gatos do sexo macho (82,7%) e com idade de dois anos (48,2%), o que pode ser devido à maior exposição a fatores de risco, como expressar características da espécie como a de escavar e encobrir suas fezes com terra, afiação de unhas em matéria orgânica, e principalmente mordedura e arranhadura durante disputas territoriais e brigas com outros animais (ALMEIDA et al., 2018).

Os gatos semidomiciliados e de vida livre (44,8%) foram mais afetados pelo *S. brasiliensis*, possivelmente devido à maior exposição ao ambiente e interação com outros animais (LECCA et al., 2020; REDIGUIERI et al., 2022). Os gatos semidomiciliados são os animais que possui um tutor, porém o mesmo não tem controle do acesso as ruas. A falta de

controle desses animais em suas residências é um fator importante que pode levar a transmissão da doença animal – humano (zoonose). A situação para os gatos errantes (vida livre), torna alarmante devido ao contágio animal-animal em grupos (epizootia) (REDIGUIERI et al., 2022; RODRIGUES et al., 2022), desencadeando um surto e por sua vez disseminando o agente fúngico em Manaus. Como não há nenhum registro oficial na literatura sobre o monitoramento da esporotricose na cidade de Manaus-AM, faz-se necessário elaborar um sistema de manejo, prevenção e tratamento da esporotricose por parte da saúde pública e veterinária em Manaus.

Estudos prévios mostraram que o sequenciamento da ITS tem sido usada na identificação de espécies de *Sporothrix* spp. e agrupa em um ramo monofilético as espécies patogênicas do complexo *C. neoformans/C. gatti* e do complexo *Sporothrix* (PORTER; BRIAN GOLDING, 2011). Essa identificação permite uma melhor compreensão da epidemiologia desses patógenos em diferentes regiões do mundo (CHEN; MEYER; SORRELL, 2014; MEYER et al., 2003). Em um estudo recente, Rodrigues et al. (2016) utilizaram o sequenciamento da ITS para identificar e classificar isolados de *S. brasiliensis* com 100% de similaridade aos isolados tipo da espécie.

Quanto a avaliação da susceptibilidade antifúngica, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de antifúngicos utilizados na medicina veterinária é fundamental para avaliar a eficácia do tratamento e prevenir a resistência aos medicamentos (BERKOW; LOCKHART; OSTROSKY-ZEICHNER, 2020). No presente estudo os isolados de *Sporothrix* spp., *S. brasiliensis* e *C. neoformans* apresentaram sensibilidade aos antifúngicos testados. Esses resultados estão de acordo com Córdoba et al. (2018) e Waller et al., (2021). Na cidade de Manaus, o tratamento tem sido feito segundo (LLORET et al., 2013; PENNISI et al., 2013) que utiliza FLZ para criptococose e ITZ para esporotricose. Alguns trabalhos (GREMIÃO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2020) tem avaliado também antifúngicos no tratamento dos gatos.

Este trabalho científico apresenta algumas limitações importantes, como a ausência de sequenciamento de todos os isolados de *Sporothrix* e a falta de genotipagem do isolado de *Cryptococcus neoformans*, além de sua abrangência restrita a uma única clínica com uma abordagem de conveniência. No entanto, oferece perspectivas promissoras para estudos futuros. A identificação da espécie de todos os isolados de *Sporothrix* pode confirmar que todos são *S. brasiliensis*, proporcionando novas informações para o campo da micologia. Além

disso, estudos mais amplos têm o potencial de melhor descrever a epidemiologia das micoses profundas em gatos, contribuindo para a compreensão de uma zoonose relevante.

7 CONCLUSÃO

O artigo apresentou resultados que indicam a predominância de agentes fúngicos em casos positivos de infecções em gatos, com destaque para a presença de *Sporothrix* spp. (incluindo *S. brasiliensis*) e *C. neoformans*. A análise dos aspectos clínicos e epidemiológicos revelou que a esporotricose afeta principalmente gatos machos e com idade de dois anos. Estudos anteriores mostraram que o sequenciamento da ITS pode ser usado para identificação e diferenciação de espécies de fungos. A avaliação da susceptibilidade antifúngica demonstrou a sensibilidade dos isolados aos antifúngicos convencionais. O estudo destaca a importância de monitorar a susceptibilidade antifúngica e a predominância de *S. brasiliensis* em casos de esporotricose felina e a presença de *Cryptococcus neoformans* na região amazônica.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, B. A. et al. First case report of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in the state of Ceará – Brazil. **Medical Mycology Case Reports**, v. 40, p. 12–15, 1 jun. 2023.
- ALFARO-ALARCÓN, A. et al. Histoplasmosis diseminada en un gato doméstico en Costa Rica. **Ciencias Veterinarias**, v. 37, n. 2, p. 11–21, 3 out. 2019.
- ALMEIDA, A. J. et al. Sporotrichosis in domestic felines (*Felis catus domesticus*) in Campos dos Goytacazes/RJ, Brazil. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1438–1443, 1 jul. 2018.
- ALMENDROS, A. et al. First case of feline cryptococcosis in Hong Kong, caused by *Cryptococcus neoformans*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 29, p. 8–11, 1 set. 2020.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ALVES, G. S. B. et al. Molecular typing of environmental *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex isolates from Manaus, Amazonas, Brazil. **Mycoses**, v. 59, n. 8, p. 509–515, 1 ago. 2016.
- ALVES, M. D. M. et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 5, p. 1–11, 1 maio 2020.
- ALVES SOARES, E. et al. Mortality by cryptococcosis in Brazil from 2000 to 2012: A descriptive epidemiological study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007569, 1 jul. 2019.
- ARINELLI, A. et al. Ocular Sporotrichosis: 26 Cases with Bulbar Involvement in a Hyperendemic Area of Zoonotic Transmission. <https://doi.org/10.1080/09273948.2019.1624779>, v. 28, n. 5, p. 764–771, 3 jul. 2019.
- AULAKH, H. K.; AULAKH, K. S.; TROY, G. C. Feline Histoplasmosis: A Retrospective Study of 22 Cases (1986–2009). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 48, n. 3, p. 182–187, 1 maio 2012.
- BAILLY, S. et al. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. – Trends over 10 years. **Journal of Infection**, v. 72, n. 1, p. 103–111, 1 jan. 2016.
- BARNACLE, J. R. et al. The first three reported cases of *Sporothrix brasiliensis* cat-transmitted sporotrichosis outside South America. **Medical Mycology Case Reports**, v. 39, p. 14–17, 1 mar. 2023.
- BARRS, V. R. Feline aspergillosis. **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**, p. 337–356, 11 jun. 2018.
- BEATTY, J. A. et al. **Peripheral vestibular disease associated with cryptococcosis in three cats** *Journal of Feline Medicine and Surgery*. [s.l: s.n.].

- BERKOW, E. L.; LOCKHART, S. R.; OSTROSKY-ZEICHNER, L. Antifungal susceptibility testing: Current approaches. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, 1 jul. 2020.
- BERNARDES-ENGEMANN, A. R. et al. Anti-Sporothrix Antibody Detection in Domestic Cats as an Indicator of a Possible New Occurrence Area for Sporotrichosis in North Brazil. **Mycopathologia**, v. 187, n. 4, p. 375–384, 1 ago. 2022.
- BRITO-SANTOS, F. et al. Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* VGII in southeast Brazil: The One Health approach revealing a possible role for domestic cats. **Medical Mycology Case Reports**, v. 24, n. March, p. 61–64, 2019.
- BRÖMEL, C.; SYKES, J. E. Histoplasmosis in Dogs and Cats. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 20, n. 4, p. 227–232, 1 nov. 2005.
- CARDOSO, P. H. M. et al. Feline Nasal Granuloma Due to *Cryptococcus gattii* Type VGII. **Mycopathologia**, v. 176, n. 3–4, p. 303–307, 2013.
- CASTRO, N. B. et al. Doenças micóticas em gatos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1313–1321, 2017.
- CASTRODALE, L. J. et al. Prolonged Incubation Period for *Cryptococcus gattii* Infection in Cat, Alaska, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 1034, jun. 2013.
- CAVALCANTE, F. E. P. et al. HISTOPLASMOSE FELINA (Feline histoplasmosis). **Ciência Animal**, v. 32, n. 4, p. 173–180, 2022.
- CHAKRABARTI, A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 3–14, 1 jan. 2015.
- CHEN, S. C. A.; MEYER, W.; SORRELL, T. C. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.
- COELHO, C.; FARRER, R. A. **Pathogen and host genetics underpinning cryptococcal disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2020. v. 105
- CRUZ, I. L. R. et al. Evolution of virulence-related phenotypes of *Sporothrix brasiliensis* isolates from patients with chronic sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 5–18, 1 mar. 2021.
- DA ROCHA, R. F. D. B. et al. **Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide**. **Journal of Small Animal Practice** Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2018.
- DANESI, P. et al. Molecular identity and prevalence of *Cryptococcus* spp. Nasal carriage in asymptomatic feral cats in Italy. **Medical Mycology**, v. 52, n. 7, p. 667–673, 2014.
- 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, p. 165–191, 1 mar. 2016.
- 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, out. 2011.

DE OLIVEIRA CARVALHO DA SILVA, B. M.; SOUZA, N. F. DE; PEREIRA, W. L. A. Peritoneal Cryptococcosis in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 49, 2021.

DUNCAN, C.; STEPHEN, C.; CAMPBELL, J. Clinical characteristics and predictors of mortality for *Cryptococcus gattii* infection in dogs and cats of southwestern British Columbia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 47, n. 10, p. 993, out. 2006.

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** 2021, Vol. 7, Page 170, v. 7, n. 3, p. 170, 26 fev. 2021.

FERNANDES, G. F. et al. Serodiagnosis of sporotrichosis infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using a specific antigen, SsCBF, and crude exoantigens. **Veterinary Microbiology**, v. 147, n. 3–4, p. 445–449, 27 jan. 2011.

FERRARI, E.; CÁSSIA, C. R.; SANTANA, A. E. First report of oral cryptococcal osteomyelitis in a cat. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1–6, 1 maio 2023.

FERREIRA, B. H. et al. Ploidy determination in the pathogenic fungus *Sporothrix* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. FEB, 2019.

FERRER, C. et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2873–2879, 2001.

FICHMAN, V. et al. Severe Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*: Antifungal Susceptibility and Clinical Outcomes. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 49, 28 dez. 2022.

FIELDER, S. E. et al. Feline histoplasmosis presenting with bone and joint involvement: clinical and diagnostic findings in 25 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 21, n. 10, p. 887–892, 1 out. 2019.

FINDLEY, K. et al. Phylogeny and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Cryptococcus* Species and Closely Related Saprobiotic Taxa in the Tremellales. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 353, 2009.

FOUREMAN, P. et al. Spinal Cord Granuloma due to *Coccidioides immitis* in a Cat. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 373–376, 1 maio 2005.

FRANCESCHI, N. T. et al. Pub. 241 Esporotricose óssea em gato causada por *Sporothrix brasiliensis* Bone Sporotrichosis in a Cat Caused by *Sporothrix brasiliensis*. v. 45, n. 1, p. 241, 2017.

FRANZOT, S. P.; SALKIN, I. F.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: Separate Varietal Status for *Cryptococcus neoformans* Serotype A Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 838, 1999.

GILOR, C. et al. Clinical aspects of natural infection with *Blastomyces dermatitidis* in cats: 8 cases (1991–2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 1, p. 96–99, 1 jul. 2006.

GREENE, R. T.; TROY, G. C. Coccidioidomycosis in 48 Cats: A Retrospective Study (1984–1993). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 2, p. 86–91, 1 mar. 1995.

- GREMIÃO, I. D. F. et al. Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. **Australian Veterinary Journal**, v. 89, n. 9, p. 346–351, set. 2011.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical Mycology**, v. 53, n. 1, p. 15–21, 1 jan. 2015.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 1 jan. 2017.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Geographic Expansion of Sporotrichosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 3, p. 621, 2020.
- GREMIÃO, I. D. F. et al. Guideline for the management of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and literature revision. **VETERINARY MICROBIOLOGY-REVIEW**, v. 52, p. 107–124, 2021.
- GRINSTEAD, C. R. et al. Invasive fungal rhinitis with adnexal involvement caused by *Histoplasma capsulatum* in a cat from a non-enzootic location. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 7, n. 1, 2021.
- GUARRO, J.; GENÉ, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in Fungal Taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 454, 1999.
- GUEDES, P. E. B. et al. Cryptococcosis in a cat. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. August, p. 3–8, 2019.
- GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. **Epidemiological Aspects of Sporotrichosis Epidemic in Brazil. Current Fungal Infection Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 dez. 2015.
- HAGEN, F. et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. **Fungal Genetics and Biology**, v. 78, p. 16–48, 1 maio 2015.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucleic acids symposium series. **Anais...**[London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999.
- HNILICA, K. A., MEDLEAU, L. **Dermatologia de Pequenos Animais - Atlas Colorido e Guia Terapêutico**. 2. ed. [s.l: s.n.].
- INDOUNG, S. et al. Feline sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* sensu stricto in Southern Thailand: phenotypic characterization, molecular identification, and antifungal susceptibility. **Medical Mycology**, v. 60, n. 9, 3 out. 2022.
- IQBAL, N. et al. Correlation of genotype and in vitro susceptibilities of *Cryptococcus gattii* strains from the Pacific Northwest of the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 2, p. 539–544, fev. 2010.
- JUNIANITO, V. et al. Pathology of cutaneous blastomycosis in a cat. **ARSHI Veterinary Letters**, v. 4, n. 1, p. 3–4, 6 mar. 2020.

- KANO, R. et al. First Isolation of Azole-Resistant *Cryptococcus neoformans* from Feline Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 180, n. 5–6, p. 427–433, 2015.
- KANO, R.; SUGITA, T.; KAMATA, H. Antifungal Susceptibility of Clinical Isolates and Artificially Produced Multi-azole-resistant Strains of *Cryptococcus neoformans* (formerly: *Cryptococcus grubii*) to Ravuconazole. **Medical Mycology Journal**, v. 61, n. 1, p. 11–13, 2020.
- KUMAR, S. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular biology and evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547, 2018.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 4, n. 7, 2014.
- KWON-CHUNG, K. J. et al. The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. **mSphere**, v. 2, n. 1, p. 1–7, 2017.
- LACAZ, C. DA S. **Tratado de micologia médica Lacaz**. [s.l.] Sarvier, 2002.
- 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, 1 mar. 2020.
- LESTER, S. J. et al. Cryptococcosis: Update and emergence of *Cryptococcus gattii*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 4–17, 2011.
- LIVET, V. et al. Cryptococcal nasopharyngeal polypoid mass in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 1, n. 2, p. 205511691559723, 2015.
- LLORET, A. et al. Rare systemic mycoses in cats: Blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 624–627, 27 jul. 2013a.
- 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, 27 jul. 2013b.
- LOPES-BEZERRA, L. M. et al. Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical Mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S126–S143, 1 abr. 2018.
- MACDOUGALL, L.; FYFE, M. Emergence of *Cryptococcus gattii* in a Novel Environment Provides Clues to Its Incubation Period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1851, maio 2006.
- MAKRI, N. et al. First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix* species) in a cat in the UK. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 6, n. 1, 1 jan. 2020.
- MARQUES, A. B. S. et al. Esporotricose felina na região periocular - eficácia do tratamento com itraconazol. **Acta Scientiae Veterinariae - Case Report**, v. 50, 2022.
- MARTINS, D. B. et al. **Massive cryptococcal disseminated infection in an immunocompetent cat**. **Veterinary Dermatology**, abr. 2011.

- MARUYAMA, F. H. et al. Genetic Diversity of the *Cryptococcus gattii* Species Complex in Mato Grosso State, Brazil. **Mycopathologia**, v. 184, n. 1, p. 45–51, 2019.
- MASCHIO-LIMA, T. et al. Clinical and epidemiological aspects of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and in vitro antifungal susceptibility. **Veterinary Research Communications**, v. 45, p. 171–179, 2021.
- MELLO, C. B. E. et al. Disseminated histoplasmosis in a Brazilian domestic cat: early diagnosis and successful treatment. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 6, p. 1835–1840, 1 dez. 2019a.
- MELLO, C. B. E. et al. Disseminated histoplasmosis in a Brazilian domestic cat: early diagnosis and successful treatment. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, n. 6, p. 1835–1840, 1 dez. 2019b.
- MEYER, W. et al. Molecular typing of Ibero American *Cryptococcus neoformans* isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 1 fev. 2003.
- MYERS, A. et al. Atypical cutaneous cryptococcosis in four cats in the USA. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 4, p. 405-e97, 2017.
- NAKASU, C. C. T. et al. Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 163–171, 1 mar. 2021.
- NEWMAN, R.; SCHAIBLE, M. Isolation of *Cryptococcus gattii* from feline chronic stage lipid pneumonia. **Medical Mycology Case Reports**, v. 25, n. March, p. 19–21, 2019.
- NUNES RODRIGUES, T. C.; STROOBANTS, L. R.; VANDENABEELE, S. I. Feline cutaneous nodular and ocular *Cryptococcus neoformans* in Belgium. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 6, n. 1, 2020.
- ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 272–279, 1 jun. 2003.
- OLIVARES, R. W. I. et al. First report of a subcutaneous infection by *Cryptococcus neoformans* (former *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*) in a cat in Costa Rica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 2535–2540, 1 dez. 2021.
- 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, 1 set. 2017.
- PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. **Nucleic acids research**, v. 19, n. 6, p. 1346, 1991.
- PAULA, D. A. J. DE et al. Occurrence and molecular characterization of cryptococcosis in dogs and cats in Mato Grosso, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 167–172, 2014.
- PAULIN, J.; MORSHED, M.; ARMIÉN, A. G. Otitis interna induced by *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* in a cat. **Veterinary pathology**, v. 50, n. 2, p. 260–3, 13 mar. 2013.

- PAVELSKI, M. et al. Fungal pneumonia in dogs and cats with pulmonary clinical signs in southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p. 696–702, 2018.
- PENNISI, M. G. et al. Cryptococcosis in cats: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 7, p. 611–618, 2013.
- PEREIRA, S. A. et al. Aspectos Terapêuticos da Esporotricose Felina. **Acta Scientiae Veterinária**, v. 37, n. 4, p. 311–321, 2009.
- PEREIRA, S. A. et al. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v. 166, n. 10, p. 290–294, 1 mar. 2010.
- PIMENTA, P. et al. Blepharitis due to *Cryptococcus neoformans* in a cat from northern Portugal. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 1, n. 2, p. 205511691559396, 1 jul. 2015.
- PIROFSKI, L. ANNE; CASADEVALL, A. What is infectiveness and how is it involved in infection and immunity? **BMC Immunology**, v. 16, n. 1, 26 mar. 2015.
- PORTER, T. M.; BRIAN GOLDING, G. Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons? **New Phytologist**, v. 192, n. 3, p. 775–782, 1 nov. 2011.
- REDIGUIERI, B. C. et al. Clinical, Epidemiological, and Epizootic Features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **EcoHealth**, v. 19, n. 1, p. 124–134, 1 mar. 2022.
- REINHART, J. M. et al. **Feline histoplasmosis: Fluconazole therapy and identification of potential sources of Histoplasma species exposure.** **Journal of Feline Medicine and Surgery**, dez. 2012.
- REIS, É. G. et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 14, n. 6, p. 399–404, jun. 2012.
- REIS, R. S. et al. Cryptococcus neoformans VNII as the Main Cause of Cryptococcosis in Domestic Cats from Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Fungi 2021, Vol. 7, Page 980**, v. 7, n. 11, p. 980, 18 nov. 2021.
- RIBEIRO, E. A. et al. Occurrence of *Cryptococcus neoformans* in the excreta of urban pigeons in the municipality of Redenção in Amazônia, Brazil. **Acta Biomédica Brasiliensia**, v. 10, n. 1, p. 27–34, 2020.
- RODRIGUES, A. M. et al. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. **Fungal Biology**, v. 120, n. 2, p. 246–264, 1 fev. 2016.
- RODRIGUES, A. M. et al. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia 2020 185:5**, v. 185, n. 5, p. 813–842, 12 fev. 2020a.
- RODRIGUES, A. M. et al. **Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends.** **Journal of FungiMDPI**, , 1 ago. 2022.

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** Public Library of Science, , 1 jul. 2016.

RODRIGUES, R. et al. Cats with central nervous system cryptococcosis. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 48, 2020b.

SEYEDMOUSAVI, S. et al. **Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals**. [s.l.: s.n.].

SHAVER, S. L.; FOY, D. S.; CARTER, T. D. Clinical features, treatment, and outcome of dogs with *Coccidioides osteomyelitis*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 260, n. 1, p. 63–70, 1 jan. 2022.

SIKAK, M. K. et al. Otogenic meningoencephalomyelitis due to *Cryptococcus gattii* (VGII) infection in a cat from Western Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 1, n. 1, p. 205511691558502, 1 jan. 2015.

SIEW HAN, H.; KANO, R. Feline sporotrichosis in Asia. **VETERINARY MICROBIOLOGY-REVIEW**, p. 52:125-134, 2021.

SILVA FILHO, L. E., CORRÊA, P. G. F., TAVARES, R. M., ALVES, G. S. B. MATSUURA, A. B. J. **First Case of Cryptococcosis in Felines in Manaus/AM. 29º SBMicrobiologia - ANAIS**. Disponível em: <<https://www.sbmicrobiologia.org.br/29cbm-anaais/resumos/15/R1752-1.PDF>>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SPANAMBERG, A. et al. *Sporothrix brasiliensis* on cats with skin ulcers in southern Brazil. **Medical Mycology**, v. 59, n. 3, p. 301–304, 1 mar. 2021.

SYKES, J. E. et al. In vivo development of fluconazole resistance in serial *Cryptococcus gattii* isolates from a cat. **Medical mycology**, v. 55, n. 4, p. 396–401, 1 jun. 2017.

TRIVEDI, S. R. et al. Feline cryptococcosis. Impact of current research on clinical management. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 13, n. 3, p. 163–172, 2011.

VALERIANO, C. A. T. et al. Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: Case series in the northeast of Brazil. **JAAD Case Reports**, v. 6, n. 10, p. 988, 1 out. 2020.

VERCELLI, C. et al. Diagnostic and therapeutic management of Cryptococcosis in a kitten with practical considerations to veterinary pediatric therapeutic approach. **Medical Mycology Case Reports**, v. 32, p. 61–63, 1 jun. 2021.

VIEILLE, P. et al. Isolation of *Cryptococcus gattii* VGIII from feline nasal injury. **Medical Mycology Case Reports**, v. 22, p. 55–57, 1 dez. 2018.

WALLER, S. B. et al. Susceptibility and resistance of *Sporothrix brasiliensis* to branded and compounded itraconazole formulations. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 155–162, 2021.

WALSH, T. J.; DIXON, D. M. Spectrum of Mycoses. Em: SAMUEL BARON (Ed.). **Medical Microbiology**. 4. ed. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

WHITE, T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR protocols: a guide to methods and applications**, v. 18, n. 1, p. 315–322, 1990.

WOODS, J. P. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 327–331, 1 ago. 2003.

ZARAGOZA, O. Basic principles of the virulence of *Cryptococcus*. **Virulence**, v. 10, n. 1, p. 490–501, 2019.

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

ANEXOS

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do projeto: Isolamento e genotipagem de agentes causadores da criptococose em gatos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus – AM

Nome do pesquisador principal: Nayara de Fátima Lazameth Diniz

Razão social e CIAEP instituição da CEUA que aprovou:

Objetivos do estudo: Isolar e identificar através de método de genotipagem os agentes causadores da criptococose em felinos atendidos em uma clínica veterinária na cidade de Manaus – AM. Descrever se há correlação de predisposição da doença fúngica entre as raças, idade, sexo e estilo de vida; como também observar através do teste de sensibilidade a atividade antifúngica contra o *Cryptococcus*.

Procedimentos a serem realizados com os animais: As visitas ocorrerão seis dias na semana em um período de cinco horas por dia. Serão coletadas amostras de ferimentos na pele, secreções nos condutos auriculares, oculares, nasais, orais e outras partes do corpo apresentando lesões nos membros, região dorsal, ventral e calda; as mostras de alterações edemaciadas (inchaço) nas narinas ou outra parte do corpo do gato também serão coletadas. Todas as amostras serão coletadas com *swab* dos ferimentos abertos com exceção das áreas inchadas que serão coletados por uma agulha fina. O procedimento ocorrerá no período de junho dezembro de 2022. Os gatos serão encaminhados para o consultório e passará por uma anamnese e o tutor será questionado quanto ao histórico do animal sobre vacinas, vermifugação, teste fiv e felv, castração, estilo de vida do gato e contato com outros animais. A forma que será coletada as amostras causarão o mínimo de estresse no felino, dependendo da personalidade do paciente. Em gatos ferais (agressivos) serão utilizadas toalhas para envolver parte ou todo o corpo, ou membros para evitar arranhões no médico veterinário, auxiliar veterinário e o próprio tutor (a). O uso de contenção química (uso de anestésico) será utilizado em último caso, quando não houver nenhuma possibilidade de conter o paciente felino.

Potenciais riscos para os animais: o procedimento não colocará em risco a vida do paciente felino.

Cronograma: A coleta será realizada no período de junho a dezembro de 2022. Segundo dados estimados são atendidos 16 gatos por mês na Clínica Veterinária Gatum – Medicina Felina.

Benefícios: O felino receberá o atendimento adequado, indicado para a sua espécie que ocasionará o mínimo de estresse possível. Receberá o tratamento mais indicado através

do diagnóstico correto, utilizando o agente antifúngico mais indicado para o tratamento buscando a recuperação completa da doença. O tutor será esclarecido e orientado pelo pesquisador principal e médicos veterinários sobre a gravidade da doença, e de como manejar o gato doente. A criptococose é uma doença grave em humanos e animais podendo levá-los a morte. O *Cryptococcus* pode ser transmitido pelo ar, portanto, os gatos podem servir como indicadores da contaminação do agente fúngico presente no ambiente. Esse alerta fará com que ocorra um controle ambiental para que não ocorra mais contaminações e animais e humanos. A participação de cada paciente felino é importante para o estudo para conhecer as características clínicas e epidemiológicas do *Cryptococcus* e, conseqüentemente evitar casos de surto da doença em animais e humanos na cidade de Manaus - AM.

Sua autorização para a inclusão do (s) seu (s) animal (is) nesse estudo é voluntária. Seu (s) animal (is) poderá(ão) ser retirado (s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele (s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações, e nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

Os Médicos Veterinários responsáveis pelo (s) seu (s) animal (is) será o (a) Dr (a) Nayara de Fátima Lazameth Diniz, Adriana Oliveira da Silva Queiroz e Alana Attademo Curi Vidal, inscrito (a) no CRMV sob o nº 0650, 0665 e 0667 - AM. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal Nayara de Fátima Lazameth Diniz também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: (92) 99114-5503/99602-7038

Equipe: Adriana Oliveira da Silva Queiroz, Nayara de Fátima Lazameth Diniz e Alana Attademo Curi Vidal

Endereço: Rua Cameté, nº 7, quadra 2, Conj. Débora – Bairro Dom Pedro I

Telefone: (92) 99202-0222

Declaração de consentimento

Fui devidamente esclarecido (a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao (s) animal (is) pelo (s) qual (is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu (s) animal (is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do (s) meu (s) animal (is) identificado (s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

(_____/____/____), ____/____/____

Assinatura do Responsável

Assinatura do Pesquisador

Responsável:

Nome:

Documento de Identidade:

Identificação do (s) animal (is):

Nome:

Número de identificação:

Espécie:

Raça:

ANEXO II



Informações de contato - PESQUISA INPA

Prontuário de pacientes felinos atendidos em clínica veterinária na cidade de Manaus/AM

 mvet.diniz@gmail.com (não compartilhado) [Alternar conta](#) 

*Obrigatório

Número da Ficha *

Sua resposta

[Próxima](#) [Limpar formulário](#)

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários

Informações de contato - PESQUISA INPA

 mvet.diniz@gmail.com (não compartilhado) [Alternar conta](#)



*Obrigatório

Dados do Tutor

Nome completo do tutor *

Sua resposta

E-mail *

Sua resposta

Endereço *

Sua resposta

Número de telefone *

Sua resposta

[Voltar](#)

[Próxima](#)

[Limpar formulário](#)

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários

Informações de contato - PESQUISA INPA

 mvet.diniz@gmail.com (não compartilhado) [Alternar conta](#)



*Obrigatório

Dados do Felino

Qual é o nome do paciente felino? *

Sua resposta

Qual é a raça? *

Sua resposta

Qual é a pelagem? *

Sua resposta

Qual é a idade? *

Sua resposta

Qual é sexo? *

Macho

Fêmea

Qual é o peso? *

Sua resposta

Informações de contato - PESQUISA INPA

 mvet.diniz@gmail.com (não compartilhado) [Alternar conta](#)



*Obrigatório

Dados Clínicos e Epidemiológicos

Local da residência em que o felino vive? *

- Urbana
- Peri-urbana
- Rural

Qual é o estilo de vida do felino? *

- Domiciliado
- Semidomiciliado
- Resgatado da rua
- Convive com outros gatos

O Felino faz tratamentos preventivos? *

	Vermifugação	Vacinação	Ectoparasitos (carrapatos, pulgas e piolhos)	Testado para FIV e FeLV
Marque mais de uma opção	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

O Felino fez ou faz tratamento para alguma doença? Qual? *

Sua resposta

Qual é o motivo da consulta (queixa principal)? *

Sua resposta

Quais os sinais clínicos apresentados? Há quanto tempo apresenta os sinais? *
Como começou?

	Aumento tamanho do nariz	Espirro	Secreção purulenta	Secreção com sangue	Secreção translúcida (exsudato)	Ferimento no nariz	Ferimento na cabeça	Ferime no membro Qual
Marque mais de um sinal clínico	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>				

Os felinos não testados para FIV/FELV aceitaram fazer o teste? Qual foi o resultado? *

- Sim
- Não

Quais os parâmetros fisiológicos dos felinos? *

Sua resposta

Foi feito exames complementares? *

	Hemograma Completo	Bioquímica.Quais?	Raio - X	Ultrassonografia	Teste rápido para criptococose felina?
Marque mais de um exame	<input type="checkbox"/>				

O paciente felino foi submetido a algum procedimento cirúrgico? Qual? *

Sua resposta

Qual foi o local de coleta das amostras? *

Sua resposta

Diagnóstico da doença? *

Sua resposta

Voltar

Enviar

Limpar formulário

Nunca envie senhas pelo Formulários Google.

Este conteúdo não foi criado nem aprovado pelo Google. [Denunciar abuso](#) - [Termos de Serviço](#) - [Política de Privacidade](#)

Google Formulários