

## Diferencias en la patogenicidad del complejo de especies *Sporothrix* en un modelo animal

Ingrid Arrillaga Moncrieff,\* Javier Capilla,\*\* Ana M Fernández,\*\*\* Fernando Fariñas,\*\*\*\*,<sup>1</sup> Emilio Mayayo\*,<sup>1</sup>

### RESUMEN

**Antecedentes:** hace poco se describieron tres nuevas especies del complejo *S. schenckii*, cada una con características genéticas y fenotípicas distintas.

**Objetivo:** demostrar las diferencias en la patogenia, la respuesta orgánica y los aspectos morfológicos de las lesiones de la infección experimental por diversas especies de *Sporothrix*.

**Material y método:** se realizó un estudio comparativo de la patogenicidad de *S. globosa*, *S. brasiliensis* y *S. schenckii sensu stricto* utilizando un modelo animal de infección sistémica e infección subcutánea en ratones.

**Resultados:** *S. brasiliensis* fue la especie más virulenta seguida por *S. schenckii* y *S. globosa* fue poco virulenta. La infección por *S. brasiliensis* en animales ocasionó elevada mortalidad e infiltración orgánica masiva con escaso componente inflamatorio y abundantes células fúngicas. *S. schenckii* causó menor afectación orgánica, aunque indujo la formación de granulomas, mientras que la infección con *S. globosa* se distinguió por el escaso componente inflamatorio limitado al área de inoculación.

**Conclusiones:** las diferencias en la infección que ocasionan distintas especies de *Sporothrix* fueron muy significativas y podrían explicar la diversidad de expresiones clínicas y patológicas observadas en la esporotricosis.

**Palabras clave:** *Sporothrix*, esporotricosis, modelos experimentales, patogenicidad, virulencia.

### ABSTRACT

**Background:** Three new species of *Sporothrix* have been recently described within the *Sporothrix* complex. These species show important genetic and phenotypic differences.

**Objectives:** To evaluate the differences in pathogenicity, tissue response and morphological type of lesions in experimental sporotrichosis caused by different species.

**Material and methods:** We performed a comparative study about virulence using a systemic and a subcutaneous model of sporotrichosis in mice caused by *S. globosa*, *S. brasiliensis* and *S. schenckii*.

**Results:** *S. brasiliensis* was the most virulent species, and induced high mortality, high fungal load and multiorgan dissemination, with a low inflammatory response and fungal proliferation in all analysed organs. *S. schenckii* spread to all organs but fungal load was significantly lower than in infection with *S. brasiliensis*. Cellular response consisted in acute inflammatory activity and formation of granuloma. *S. globosa* only caused inflammation in inoculated area.

**Conclusions:** Differences in infection by all three species of *Sporothrix* were significant and this fact could explain the clinical and pathologic diversity usually observed in human sporotrichosis.

**Key words:** *Sporothrix*, sporotrichosis, experimental models, pathogenicity, virulence.

La esporotricosis es una micosis de distribución mundial causada por el hongo dimórfico *Sporothrix*, que tiene una incidencia elevada en áreas tropicales y subtropicales, sobre todo en países como Guatemala, México, Brasil, Colombia y la India.<sup>1</sup> Sus principales reservorios son el suelo y material vegetal, aunque también se ha aislado en muestras procedentes de perros, gatos y otros animales domésticos y salvajes.<sup>2-4</sup> La infección ocurre fundamentalmente por inoculación traumática de material contaminado, en especial de es-

pinas de rosas, por lo que las personas que desempeñan trabajos relacionados con la agricultura y la jardinería constituyen el primer grupo de riesgo para adquirir la enfermedad; no obstante, se han producido infecciones al realizar actividades que involucran la manipulación de heno, madera contaminada,<sup>1,3,5-7</sup> animales infectados o cultivos de *Sporothrix*,<sup>8</sup> y por mordeduras o arañazos de gatos o de cualquier otro animal.

Las presentaciones clínicas más comunes son la afectación linfocutánea y la cutánea,<sup>9</sup> con menor frecuencia

se han descrito casos de esporotricosis pulmonar y otras formas extracutáneas que ocasionan daño osteoarticular, meníngeo o pulmonar por diseminación hematogena del hongo. En los pacientes que sufren algún tipo de inmunodepresión, la infección es más severa y afecta varios órganos.<sup>10</sup> Mientras que la mortalidad por esporotricosis en individuos con inmunidad intacta es baja, la enfermedad en sujetos inmunodeficientes puede ser mortal si no se diagnostica y trata oportunamente.<sup>11</sup>

La variabilidad, gravedad y evolución clínica de las manifestaciones clínicas de la esporotricosis han sido objeto de diversos trabajos experimentales dirigidos a establecer la relación entre las características fenotípicas de la cepa infectiva y la variación clínica observada.<sup>6,7</sup> La termotolerancia, el origen o la pigmentación de las cepas son algunas de las características que se han relacionado con la virulencia y, por tanto, con la evolución de la infección.<sup>12,13</sup>

Hasta el año 2007, se consideraba que *Sporothrix schenckii* era la única especie del género causante de enfermedad en el ser humano; sin embargo, nuestro equipo, por medio de estudios filogenéticos basados en el gen de la calmodulina, combinado con el análisis fenotípico de diferentes aislamientos de origen clínico, determinó que *Sporothrix schenckii* estaba realmente formado por un complejo de especies. A partir de estos resultados se establecieron dos nuevas especies de importancia clínica: *S. brasiliensis* y *S. globosa*, y dos especies ambientales: *S. mexicana* y *S. albi-cans*.<sup>14,15</sup> La infección experimental inducida en ratones con diferentes especies de *Sporothrix* indica que la virulencia

de los aislamientos, la afectación orgánica y la respuesta a la esporotricosis dependen de la especie infectiva.<sup>16</sup>

## MATERIAL Y MÉTODO

### Cepas

Se eligió una cepa de origen clínico de cada una de las tres especies de *Sporothrix* de la colección de los autores: *S. schenckii* (FMR 9018), *S. brasiliensis* (FMR 8314) y *S. globosa* (FMR 8600).

### Animales

Se utilizaron ratones OF1 de seis semanas de edad (Charles River, Criffa SA, Barcelona, España), de 28 a 30 gramos de peso, y se distribuyeron en grupos de 10. Las condiciones de estabulación fueron aprobadas por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universitat Rovira i Virgili.

### Inóculo

Las cepas se sembraron en placas de agar patata dextrosa (APD) y se incubaron durante cuatro días a 30 °C. Se preparó una suspensión de conidios agregando solución salina al 0.9% a los cultivos y rascando suavemente la superficie. Después, se filtró a través de gasas estériles, se sembró en 200 mL de caldo patata dextrosa y se incubó en agitación (150 rpm) a 30 °C durante cuatro días. Posteriormente, los caldos de cultivo se filtraron a través de gasas estériles, se lavaron tres veces con solución salina mediante centrifugación (2500 rpm, 10 min), y el sedimento se resuspendió también en solución salina. El inóculo se ajustó por medio de un hemocitómetro a la concentración requerida y su viabilidad se comprobó con diluciones seriadas y siembras en agar patata dextrosa.

### Infección

Los animales se distribuyeron en grupos de 10, y se establecieron dos modelos de infección: *a)* sistémico, mediante inoculación intravenosa en la vena lateral de la cola, con  $2 \times 10^7$  conidios/animal de *S. schenckii*, *S. brasiliensis* o *S. globosa*, y *b)* subcutáneo, por inoculación en el dorso de 200 conidios/animal de *S. schenckii* o *S. brasiliensis*. En el caso de la infección subcutánea, se trituraron en un mortero puntas de espina de rosál, las cuales se esterilizaron y se agregaron como paso final al inóculo antes de proceder a la infección. Todos los animales se mantuvieron en observación durante 30 días.

\* Unidad de Patología.

\*\* Unidad de Microbiología.  
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira i Virgili, Reus, Tarragona, España.

\*\*\* Microbiología Clínica, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, España.

\*\*\*\* Instituto de Patología y Enfermedades Infecciosas (IAMA), Málaga, España.

<sup>1</sup> Fundación IO (Internacional Infectious Diseases Organization), España.

Correspondencia: Dr. Emilio Mayayo. Unidad de Patología, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad Rovira y Virgili, C/ Sant Llorenç 21, 43201-Reus, Tarragona, España.

Correo electrónico: emilio.mayayo@urv.cat

Recibido: noviembre, 2009. Aceptado: enero, 2010.

Este artículo debe citarse como: Arrillaga-Moncrieff I, Capilla J, Fernández AM y col. Diferencias en la patogenidad del complejo de especies *Sporothrix* en un modelo animal. Patología Rev Latinoam 2010;48(2):82-87.

### Carga fúngica y estudio histopatológico

A los 30 días de la inoculación, los animales supervivientes infectados por vía intravenosa fueron sacrificados por anoxia con CO<sub>2</sub>. Se extrajeron asépticamente el bazo, el hígado, los testículos, los riñones, los pulmones y el cerebro. Una porción de cada órgano se fijó en formol al 10%, se deshidrató y se incluyó en parafina. Se realizaron secciones de 2 mcm que se tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E), PAS y Grocott, para su posterior estudio histológico. Otra porción de cada órgano (de 1 g, aproximadamente) se homogeneizó en 2.5 mL de solución salina, y se sembró en agar patata dextrosa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Los animales infectados por vía subcutánea fueron sacrificados por parejas los días 2, 4, 7, 14, 21 y 30 después de la infección. Se tomaron muestras de la zona de inoculación y se procesaron para su estudio histopatológico, como ya se describió. Se realizó también una valoración citológica mediante las improntas de las lesiones supurativas. Estas improntas se hicieron tocando suavemente las lesiones con portaobjetos, y después se tiñeron con Giemsa y PAS.

### Análisis estadístico

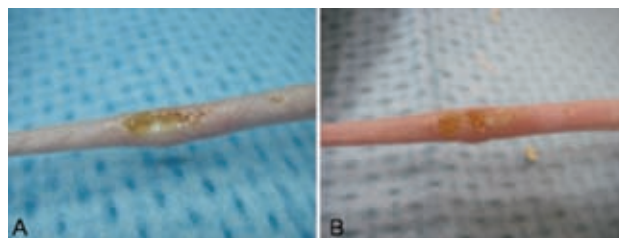
Los datos de supervivencia se analizaron con la prueba t. Los datos de la recuperación fúngica se transformaron a log<sub>10</sub> y se compararon con la prueba Mann-Whitney U, utilizando GraphPad Prism 4 para Windows. Se consideró valor significativo una  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

Siete días después de la inoculación, todos los animales infectados por vía intravenosa o subcutánea con cualquiera de las especies de *Sporothrix* tenían un nódulo eritematoso.

### Evolución de las lesiones

A los 15 días, los animales inoculados por vía intravenosa mostraban lesiones costrosas en el lugar de la infección, independientemente de la especie infectiva. A los 20 días, se observó excavación y ulceración en las lesiones de 70% de los animales infectados con *S. schenckii*. En contraste, los inoculados con *S. brasiliensis* tenían numerosas lesiones costrosas (o lesiones satélite); en el caso de los inoculados con *S. globosa*, las lesiones costrosas eran únicas y de menor tamaño (figura 1). A partir de los 20 días, y hasta finalizar el periodo experimental, se notó un incremento



**Figura 1.** Lesiones en la cola de ratones 20 días después de la inoculación intravenosa con  $2 \times 10^7$  conidios/animal. (A) Lesión ulcerada y excavada con lesiones satélite producida por *S. schenckii*. (B) Lesiones múltiples costrosas en animales inoculados con *S. brasiliensis*. Las figuras de este artículo aparecen a color en el anexo 2 de este número.

de lesiones satélite en los ratones infectados con *S. schenckii* o *S. brasiliensis* correspondientes a la diseminación hematógica, linfática (o ambas) del hongo. Las lesiones producidas por *S. globosa* no evolucionaron.

En los animales inoculados subcutáneamente con *S. schenckii* o *S. brasiliensis* aparecieron nódulos eritematosos locales a los nueve días, que fueron convirtiéndose en lesiones excavadas y ulceradas en un lapso de 20 días; un mes después, comenzaron a supurar (figura 2). Ninguno de estos animales mostró lesiones satélite.



**Figura 2.** Lesión ulcerada supurativa en ratones OF-1 tras 30 días de infección subcutánea con  $2 \times 10^7$  conidios/animal de *S. schenckii*.

### Supervivencia

Todos los animales infectados por vía intravenosa con *S. brasiliensis* o con *S. schenckii* fallecieron entre 9 y 23 días después de la inoculación, sin que hubiera una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre ellos; sin embargo, la supervivencia fue del 100% en los infectados con *S. globosa*. La supervivencia de los inoculados subcutáneamente con cualquiera de las especies fue del 100%.

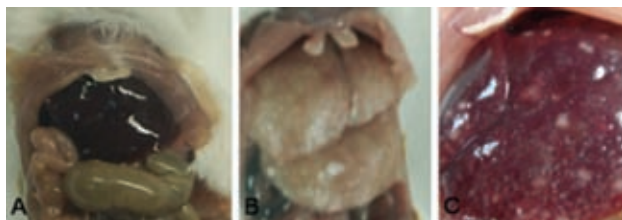
### Carga fúngica

La determinación de la carga fúngica tras la inoculación sistémica reveló la gran capacidad de diseminación de *S. brasiliensis* y *S. schenckii*, ya que en todos los órganos estudiados se recuperaron ambas especies en concentraciones elevadas. La carga fúngica (UFC/g de tejido) fue significativamente superior en los animales infectados con *S. brasiliensis* que en aquéllos con *S. schenckii* en los órganos analizados ( $p = 0.043$  a  $< 0.001$ ). Aunque también se recuperó *S. globosa* en todos los órganos, la carga fúngica fue significativamente menor en comparación con las otras especies de *Sporothrix* ( $p < 0.001$  en todos los órganos vs *S. brasiliensis* y *S. globosa*). *S. brasiliensis* mostró un marcado neutrotropismo, con valores de  $7.31 \pm 0.64$  UFC/g ( $\log_{10}$  mediana  $\pm$  desviación estándar) mientras que este órgano fue escasamente afectado por *S. schenckii* o *S. globosa* ( $3.84 \pm 2.10$  UFC/g y  $0.74 \pm 1.33$  UFC/g, respectivamente).

### Estudio histopatológico

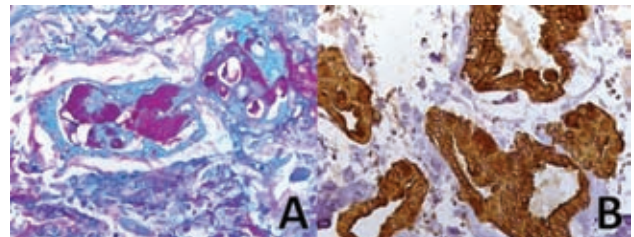
Al final del periodo experimental, los animales inoculados por vía intravenosa con *S. brasiliensis* o *S. schenckii* —pero no los inoculados con *S. globosa*— revelaron una marcada hepatoesplenomegalia. En la infección por *S. schenckii* se observaron abundantes microabscesos en el hígado y el bazo, mientras que una considerable hepatoesplenomegalia con isquemia generalizada en el hígado fue la característica de *S. brasiliensis*. No se detectaron alteraciones macroscópicas en los tejidos de animales inoculados con *S. globosa* (figura 3).

Las secciones histológicas teñidas con H-E pertenecientes a los tejidos infectados con *S. brasiliensis* intravenoso mostraron abundantes lesiones difusas en todos los órganos, con infiltración masiva de células fúngicas en



**Figura 3.** Aspecto macroscópico del hígado tras 30 días de inoculación intravenosa con *Sporothrix* spp. (A) La infección con *S. globosa* no produjo alteraciones macroscópicas visibles. (B) Los animales infectados con *S. brasiliensis* presentaban hepatoesplenomegalia con palidez del órgano debido a una isquemia generalizada. (C) Los ratones infectados con *S. schenckii* presentaban hepatoesplenomegalia con lesiones micronodulares de color blanquecino en la superficie del hígado y del bazo.

diferentes estadios de maduración y ausencia de células inflamatorias (figura 4A). Por el contrario, en los animales infectados con *S. schenckii* se observaron granulomas de centro necrótico, rodeados de infiltrado linfocítico con cantidad variable de leucocitos polimorfonucleares distribuidos en el área central, donde se encontraban células fúngicas (figura 4B). No se apreciaron alteraciones histológicas en los animales infectados con *S. globosa*, solamente lesiones costrosas en la epidermis del sitio de inoculación, con escaso componente inflamatorio (figura 4).



**Figura 4.** Secciones histopatológicas de hígado. (A) Infiltración masiva de esporas de *S. brasiliensis* que desplazan a los hepatocitos. (H-E x250). (B) Granuloma abscesificante de centro necrótico con muy escasas esporas de *S. schenckii* (H-E x100).

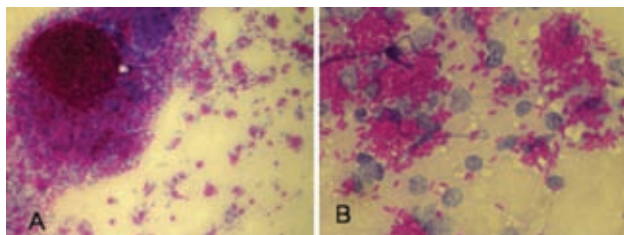
Las tinciones de PAS y Grocott revelaron en los tejidos afectados por *S. brasiliensis* abundantes células levaduriformes dentro y fuera de los citoplasmas celulares. Las levaduras de *S. brasiliensis* eran más ovaladas y de menor tamaño; en *S. schenckii*, estaban en el centro de la lesión granulomatosa y mostraban una característica forma alargada de “cigarro puro”. Al evaluarse las muestras de tejido infectado con *S. globosa* con las tinciones de PAS y Grocott, se notaron escasas células fúngicas levaduriformes ovaladas. Aunque se ha comunicado la existencia de cuerpos asteroides en la esporotricosis experimental,<sup>17</sup> no hallamos en ningún tejido cuerpos asteroides con el fenómeno de Splendore-Hoeppli o células gigantes multinucleadas.

En el análisis de preparaciones histológicas de piel teñidas con H-E de animales infectados subcutáneamente con *S. schenckii* no se apreciaron cambios histológicos en las muestras correspondientes a los días 2, 4 y 7. A partir del día 14 aparecieron lesiones ulceradas, con pérdida de la continuidad en la epidermis, que mostraba zonas de hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Era notorio el componente inflamatorio en las estructuras cutáneas y subcutáneas, con leucocitos polimorfonucleares y células gigantes tipo cuerpo extraño. Con la tinción de PAS se revelaron abundantes células levaduriformes en forma de



cigarro puro que alternaban con otras ovales, algunas de ellas en gemación.

En las improntas realizadas a partir de las lesiones producidas por *S. schenckii*, en las tinciones de Giemsa y en las de PAS, se apreció una notable respuesta inflamatoria con leucocitos polimorfonucleares, linfocitos e histiocitos en un marcado fondo necrótico. La tinción de PAS resultó altamente informativa y demostrativa en la detección del pleomorfismo de las células fúngicas con formas alargadas e incluso ovales de *S. schenckii* (figura 5).



**Figura 5.** Improntas de las lesiones ulceradas de ratones inoculados subcutáneamente con *S. schenckii*. (A) Respuesta inflamatoria, con leucocitos polimorfonucleares e histiocitos con fondo necrótico que acompañan a las células fúngicas (PAS x100). (B) Detalle donde se observa una morfología polimórfica para las células fúngicas (PAS x400).

## DISCUSIÓN

La variabilidad clínica, gravedad y evolución de la esporotricosis han sido objeto de estudio de numerosos grupos de investigación. Antes de 2007, año en el que se describieron tres nuevas especies de *Sporothrix*, se identificaba al agente causal de la esporotricosis como *S. schenckii*. Sobre este escenario, numerosos autores atribuyeron la variabilidad de la infección a las diferencias fenotípicas y fisiológicas observadas entre cepas. Mediante estudios experimentales realizados *in vivo* se correlacionó la termotolerancia, la pigmentación o la composición de la pared con la virulencia. Dixon y col.<sup>6</sup> utilizaron un modelo de infección sistémica en ratones para comparar la virulencia entre distintas cepas de *S. schenckii*, y demostraron que las cepas que tenían conidios pigmentados y la capacidad de crecer a 37 °C eran más virulentas, sin importar su origen clínico o ambiental; sin embargo, las cepas incapaces de crecer a 37 °C eran avirulentas, independientemente de la pigmentación.<sup>6</sup> En estudios posteriores se determinó que las cepas con un mayor contenido de ramnosa en la pared celular eran más virulentas que aquéllas en las

que predominaba la manosa.<sup>7</sup> En otras investigaciones se comprobó que las cepas aisladas de pacientes con esporotricosis sistémica eran más virulentas que las obtenidas de infecciones linfocutáneas en un modelo de infección subcutánea en ratones.<sup>17</sup>

Con la reciente identificación de nuevas especies de *Sporothrix* se hizo indispensable comprobar si la virulencia de la infección depende de la especie. Para realizar este tipo de estudios, es necesario utilizar modelos experimentales de infección. Este tipo de modelos es altamente informativo, ya que da al investigador la posibilidad de controlar un gran número de variables tales como concentración de inóculo, cepa infectiva, vía de inoculación, estado inmunitario del huésped, etc., que no pueden ser controladas en el caso de las infecciones en humanos. Los estudios de virulencia, como el que aquí se presenta, permiten evaluar y comparar en tiempo real la gravedad y el curso de una infección, así como las características histopatológicas y la respuesta orgánica a la misma. No obstante, hay que ser consciente de que el modelo animal representa una aproximación de una infección, y por ello las conclusiones obtenidas deben ser trasladadas a la clínica humana con cautela.<sup>8</sup>

El estudio de la esporotricosis causada por distintas especies del complejo *Sporothrix* en modelos animales ha demostrado la existencia de diferencias evidentes no solamente en cuanto a su virulencia, sino también en la respuesta inflamatoria y la afectación orgánica, observaciones que podrían estar íntimamente relacionadas con el curso de las infecciones en humanos.

*S. brasiliensis* fue la especie más virulenta, ya que en animales ocasionó elevada mortalidad y diseminación multiorgánica. *S. schenckii sensu stricto* produjo una mortalidad comparable a la de *S. brasiliensis*; sin embargo, la carga fúngica fue significativamente menor en los órganos estudiados. Se ha comunicado que la piel, los pulmones, el bazo y los testículos son los órganos más afectados en modelos experimentales de esporotricosis sistémica.<sup>13,17</sup>

Los resultados de los autores sugieren que *S. brasiliensis* tiene una elevada capacidad de diseminación a todos los órganos analizados, mientras que *S. schenckii* mostró tropismo preferente hacia el hígado, los testículos y el bazo. La elevada carga fúngica vista en el cerebro de los animales infectados con *S. brasiliensis* es un hallazgo que podría ubicar a esta especie como la causante de las afectaciones

meníngeas que sufren los pacientes con SIDA.<sup>10,18,19</sup> La infección con *S. mexicana* o *S. globosa* se distingue claramente de la producida por *S. brasiliensis* o *S. schenckii* por la baja carga fúngica encontrada en los órganos y la incapacidad de reducir la supervivencia de los animales infectados.<sup>14</sup> Otro hallazgo de interés es la diferencia en la respuesta inflamatoria desencadenada por las distintas especies. El patrón clásico de respuesta histopatológica atribuido a la esporotricosis consiste en una lesión que combina una reacción piógena y granulomatosa con microabcesos y elementos fúngicos redondeados o en forma de cigarro puro localizada principalmente en el centro del granuloma.<sup>12</sup> Dicha respuesta solamente se observó en los animales infectados con *S. schenckii*. En el caso de *S. brasiliensis*, no se apreció componente inflamatorio a pesar de la elevada densidad de elementos fúngicos hallados, especialmente en el hígado. En este órgano se encontraron abundantes conidios en el interior de macrófagos, una imagen que recuerda a las infecciones hepáticas producidas por *Histoplasma capsulatum*, en las que hay células fúngicas en el interior de las células de Kupffer.<sup>20</sup>

El objetivo de este trabajo es informar al patólogo y al microbiólogo de los últimos hallazgos en modelos animales de esporotricosis y las características diferenciales de la infección según la especie infectiva. Al momento de emitir un diagnóstico, el patólogo debe considerar las variaciones histopatológicas referentes a las lesiones macro y microscópicas, así como a la respuesta inflamatoria, ya que la identificación de la especie de *Sporothrix* puede facilitar la elección de una terapia antifúngica adecuada. Si bien la remisión espontánea de la esporotricosis no es rara, casi todos los pacientes requieren tratamiento. En la mayoría de los casos de infección localizada es efectiva la administración de solución saturada de yoduro de potasio e hipertermia local. Para el manejo de las formas extracutáneas y diseminadas se recurre a los azoles, polienos y alaninas, aunque en pacientes con inmunidad afectada el pronóstico no es bueno, pese al tratamiento antifúngico.<sup>11</sup> Los estudios *in vitro* han demostrado que las diferentes especies del complejo *Sporothrix* poseen distinta sensibilidad a los antifúngicos;<sup>16</sup> por lo que la adecuada identificación de la especie permitiría elegir la antimicoterapia idónea.

#### Conflicto de intereses

Los autores no tienen ningún conflicto de intereses.

#### REFERENCIAS

1. Mesa-Arango AC, del Rocio Reyes-Montes M, Perez-Mejia A, et al. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. J Clin Microbiol 2002;40:3004-3011.
2. Lopes-Becerra LM, Schubach A, Costa RO. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. An Acad Bras Cienc 2006;78:293-308.
3. Schubach A, Barros MB, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. Curr Opin Infect Dis 2008;21:129-133.
4. Welsh RD. Sporotrichosis. J Am Vet Med Assoc 2003;223:1123-1126.
5. Bonasse J, Miller A, Civila E, et al. Cutaneous lymphangitic-nodular sporotrichosis with multiple portals of entry. Med Cutan Ibero Lat Am 1988;16:263-265.
6. Dixon DM, Duncan RA, Hurd NJ. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix* spp. from the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. J Clin Microbiol 1992;30:951-954.
7. Fernandes KS, Mathews HL, Lopes Bezerra LM. Differences in virulence of *Sporothrix schenckii* conidia related to culture conditions and cell-wall components. J Med Microbiol 1999;48:195-203.
8. Capilla J, Clemons KV, Stevens DA. Animal models: an important tool in mycology. Med Mycol 2007;45:657-684.
9. Ramos e Silva M, Vasconcelos C, Carneiro S, et al. Sporotrichosis. Clin Dermatol 2007;25:181-187.
10. Silva-Vergara ML, Maneira FR, de Oliveira RM, et al. Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. Med Mycol 2005;43:187-190.
11. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2007;45:1255-1265.
12. da Rosa AC, Scroferneker ML, Vettorato R, et al. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. J Am Acad Dermatol 2005;52:451-459.
13. Tachibana T, Matsuyama T, Mitsuyama M. Characteristic infectivity of *Sporothrix schenckii* to mice depending on routes of infection and inherent fungal pathogenicity. Med Mycol 1998;36:21-27.
14. Marimon R, Cano J, Gene J, et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol 2007;45:3198-3206.
15. Marimon R, Gene J, Cano J, et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006;44:3251-3256.
16. Marimon R, Serena C, Gene J, et al. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:732-734.
17. Brito MM, Conceicao-Silva F, Morgado FN, et al. Comparison of virulence of different *Sporothrix schenckii* clinical isolates using experimental murine model. Med Mycol 2007;45:721-729.
18. Kauffman CA. Sporotrichosis. Clin Infect Dis 1999;29:231-6;quiz 237.
19. Vilela RG, Souza GF, Fernandes Cota G, et al. Cutaneous and meningeal sporotrichosis in a HIV patient. Rev Iberoam Micol 2007;24:161-163.
20. Salfelder K. Atlas of fungal pathology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990.