



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

AMANDA GABRIELA DA SILVA

**IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR
PARA ESPOROTRICOSE HUMANA**

Recife – PE

2024

AMANDA GABRIELA DA SILVA

**IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR
PARA ESPOROTRICOSE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador (a): Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientador (a): Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Recife – PE

2024

Silva, Amanda Gabriela da.

Implementação do diagnóstico molecular por NESTED PCR para esporotricose humana / Amanda Gabriela da Silva. - Recife, 2024.
80f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2024.

Orientação: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Coorientação: Manoel Marques Evangelista de Oliveira.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Sporothrix sp; 2. Reação em Cadeia da Polimerase; 3. PCR aninhado; 4. Diagnóstico Rápido. I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves de. II. Oliveira, Manoel Marques Evangelista de. III. Título.

AMANDA GABRIELA DA SILVA

**IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR
PARA ESPOROTRICOSE HUMANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

—
Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

—
Profa. Dra. Rejane Pereira Neves (Examinadora interna)
Universidade Federal de Pernambuco

—
Dra. Maria Daniela Silva Buonafina Paz (Examinadora externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a minha família pelo amor, dedicação e apoio ao longo de toda a jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fazer forte e corajosa diante de todos os obstáculos enfrentados ao longo da caminhada.

À minha família pelo amor incondicional, apoio e incentivo. Em especial, agradeço aos meus pais Maria Verônica e Inaldo Vitor por serem o meu exemplo e a razão da minha existência. Aos meus irmãos Aline, Alice e Gabriel pelo amor e companheirismo de sempre. Aos meus avós, tios (as) e primos (as), que sempre estiveram torcendo por essa conquista.

Ao meu orientador Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves, agradeço não só pela orientação, pela dedicação, pelo incentivo e por acreditar na minha capacidade, mas também por ser um mentor que me proporcionou um grande aprendizado.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Manoel Oliveira por me acolher em seu laboratório, pelo aprendizado e suporte que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos – Micofriends - que fazem parte do meu grupo de pesquisa no Laboratório Multiusuário de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Tropicais (LPDDT/UFPE), obrigada por todo apoio, colaboração, incentivo e amizade. Em especial agradeço a Bruna Sousa e Arthur Cavalcanti, obrigada por me acompanharem e darem suporte em meus experimentos.

Ao Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos/Fiocruz-RJ pela estrutura e apoio para desenvolvimento dos experimentos do estudo. De forma especial, ao Prof. Manoel, Profa Gisela Costa e a Raul Leal minha imensa gratidão por me apoiar e acolher durante este ciclo.

Ao Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas pela colaboração e pela experiência enriquecedora que me foi proporcionada. Em especial, agradeço a Dra. Cláudia Elise Ferraz por compartilhar seu conhecimento e experiência de maneira tão generosa.

Ao Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos (UFPE) na pessoa da Profa. Dra. Rejane Pereira Neves pela estrutura e suporte para desenvolvimento dos experimentos do estudo.

A todos do Laboratório SS pelo apoio, paciência e compreensão ao longo de toda a jornada acadêmica.

Aos meus amigos, pela paciência, incentivo e momentos de descontração que foram essenciais para manter o equilíbrio. Em especial a Thaysa Gonçalves

sua presença constante, seja para discutir ideias ou para me tranquilizar nos momentos mais desafiadores, foi um alicerce essencial ao longo dessa trajetória.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro e ao Programa de Pós-Graduação de Medicina Tropical por prezar pela excelência acadêmica nos proporcionando um curso com qualidade e de notório reconhecimento.

RESUMO

A esporotricose é uma infecção granulomatosa cujo o diagnóstico padrão-ouro é o isolamento de *Sporothrix* sp. em meios de cultura, todavia, é um método dependente do desenvolvimento fúngico, assim, pode levar semanas para ser concluído, além disso, é suscetível de contaminação. Neste sentido, métodos moleculares como a Nested PCR têm se destacado no manejo de diversas infecções, visto que é uma ferramenta para a identificação rápida e precisa de microrganismos, seja a partir de uma cultura pura ou diretamente em amostras biológicas. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi aplicar um protocolo molecular de Nested PCR para a detecção e identificação rápida de *Sporothrix* sp. em amostras biológicas de pacientes com esporotricose. Variáveis clínicas e epidemiológicas foram descritas a partir da análise dos prontuários. Foram incluídos no estudo, 12 pacientes onde sete (58,3%; n=7/12) eram homens. A idade média dos pacientes foi de 44 anos. Dentre os casos de esporotricose, a forma disseminada foi diagnosticada em 33,3% (n=4/12) dos pacientes, além disso, a hipertensão arterial sistêmica e o HIV foram associados a esta infecção. Com relação a fonte de infecção, 75,0% (n=9/12) dos pacientes relataram contato com gatos por meio de arranhadura ou mordedura. Treze amostras, seis de biópsias cutâneas, cinco de exsudados cutâneos e duas de secreção conjuntival, foram obtidas de pacientes com esporotricose. O sequenciamento do gene da calmodulina identificou todos os isolados como *S. brasiliensis*. A Nested PCR foi capaz de detectar todos os *Sporothrix sensu lato* diretamente das amostras clínicas e a cepa de referência CBS 120339. Diante disso, a Nested PCR constitui uma estratégia valiosa para a detecção e identificação de *Sporothrix* sp. diretamente em amostras clínicas, complementando o método de referência e permitindo uma alternativa mais rápida à cultura.

Palavras-chave: *Sporothrix* sp.; Reação em Cadeia da Polimerase; PCR aninhado; Diagnóstico Rápido.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a granulomatous infection whose gold standard diagnosis is the isolation of *Sporothrix* sp. in culture media. However, this method is dependent on fungal development, so it can take weeks to complete and is susceptible to contamination. In this sense, molecular methods such as Nested PCR have become more prominent in the management of various infections, as it is a tool for the rapid and accurate identification of microorganisms, either from a pure culture or directly in biological samples. In view of the above, the aim of the study was to apply a molecular Nested PCR protocol for the rapid detection and identification of *Sporothrix* sp. in biological samples from patients with sporotrichosis. Clinical and epidemiological variables were described from the analysis of medical records. The study included 12 patients, seven of whom (58.3%; n=7/12) were men. The mean age of the patients was 44 years. Among the cases of sporotrichosis, the disseminated form was diagnosed in 33.3% (n=4/12) of the patients, and systemic arterial hypertension and HIV were associated with this infection. Regarding the source of infection, 75.0% (n=9/12) of the patients reported contact with cats through scratching or biting. Thirteen samples, six from skin biopsies, five from skin exudates and two from conjunctival secretions, were obtained from patients with sporotrichosis. Sequencing of the calmodulin gene identified all the isolates as *S. brasiliensis*. Nested PCR was able to detect all *Sporothrix sensu lato* directly from the clinical samples and the reference strain CBS 120339. Nested PCR is therefore a valuable strategy for detecting and identifying *Sporothrix* sp. directly in clinical samples, complementing the reference method and providing a faster alternative to culture.

Keywords: *Sporothrix* sp.; Polymerase Chain Reaction; Nested PCR; Quick Diagnosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: **A)** Exame micológico direto evidenciando células leveduriformes elípticas apresentando halo à coloração panóptica; **B)** *Sporotrix* sp. em ágar mycosel demonstrando colônias brancas e enrugadas que escureceram gradualmente até uma cor enegrecida; **C)** Micromorfologia com filamentos miceliais delgados, septados e conidióforos contendo conídios com arranjo floral em forma de “margaridas” 42

Figura 2: Análise filogenética dos isolados de *Sporothrix* sp. a partir do sequenciamento dos genes que codificam a calmodulina (CAL). 43

Figura 3: Produtos de Nested PCR em gel de agarose. Da esquerda para a direita **1:** Marcador molecular DNA ladder 1 kb; **2:** Controle positivo (cepa CBS 120339 (antiga IPEC 16490); **3:** Controle negativo; **4:** HC100/2023; **5:** HC141/2023; **6:** HC201/2023; **7:** HC204/2023; **8:** HC212/2023; **9:** HC237/2023; **10:** HC256/2023; **11:** HC262/2023; **12:** HC264/2023; **13:** HC305/2023; **14:** HC312/2023; **15:** HC313/2023 **16:** HC HC313.1/2023. O produto de PCR aninhado é um amplicon de 152pb..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição das características epidemiológicas e clínico-laboratoriais dos pacientes diagnósticos com esporotricose em um hospital de referência na cidade do Recife – PE.....	40
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Infusão de Cérebro e Coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
BT2	β -tubulina
CAL	Calmodulina
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
KOH	Hidróxido de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massa em tempo de voo por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>)
PAS	Ácido periódico de Schiff (<i>Periodic acid-Schiff</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PLECT	paracoccidioomicose, leishmaniose tegumentar, esporotricose, cromomicose, tuberculose cutânea
PRM	<i>Peptídeo rhamnoman</i>
RCA	Amplificação em círculo rolante (<i>Rolling Circle Amplification</i>)
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
SDA	Ágar Sabourand Dextrose
SsCBF	<i>Sporothix schenckii</i> Con A-Binding Fraction
SUS	Sistema Único de Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. ESPOROTRICOSE HUMANA.....	19
2.2. FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE HUMANA	21
2.3. DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE	24
2.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR	27
2.5. NESTED PCR.....	29
3. PERGUNTA DA PESQUISA.....	32
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo geral.....	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. MÉTODOS	34
5.1. Desenho do estudo.....	34
5.2. População alvo e área geográfica de abrangência.....	34
5.3. Amostragem: recrutamento e acompanhamento.....	34
5.4. Critérios de inclusão e exclusão.....	35
5.4.1. Critérios de inclusão	35
5.4.2. Critérios de exclusão	35
5.5. Definição das variáveis e coleta de dados.....	35
5.5.1. Categorização das variáveis.....	35
5.6. Métodos de coleta e processamento de dados	36
5.7. Padronização das técnicas	36
5.7.1. Obtenção e processamento das amostras clínicas (diagnóstico micológico convencional).....	36
5.7.2. Identificação molecular dos isolados clínicos de <i>Sporothrix</i> sp.	36
5.7.3. Extração e quantificação de DNA das amostras clínicas para diagnóstico molecular por Nested PCR	38
5.7.4. Protocolo molecular de Nested PCR	38
5.8. Análise dos dados.....	39
5.9. Aspectos éticos.....	39
6. RESULTADOS	40
7. DISCUSSÃO	46
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	52
REFERÊNCIAS	53

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) ..	58
APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS	61
APÊNDICE C - TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE	65
APÊNDICE D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (HC/UFPE).....	67
APÊNDICE E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (IOC/Fiocruz).....	69
ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO SERVIÇO DE DERMATOLOGIA (HC/EBSERH/UFPE)	71
ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA DO LABORATÓRIO DE TAXONOMIA, BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO/Fiocruz-RJ.....	72
ARTIGO:	73

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção granulomatosa causada por fungos do gênero *Sporothrix* sp. que acomete principalmente o tecido subcutâneo, mas também, pode ocorrer de forma sistêmica e afetar outros órgãos além da pele (SCHECHTMAN *et al.*, 2022). O diagnóstico padrão-ouro da micose é o isolamento de *Sporothrix* sp. em meios de cultura. Todavia, é um método dependente do desenvolvimento fúngico e por isso pode levar semanas para ser concluído, além disso, é suscetível à contaminação e a depender da amostra biológica, pode haver baixa carga fúngica, a qual impede o isolamento (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Em virtude da necessidade de métodos mais rápidos para o diagnóstico da esporotricose, ensaios de Nested PCR têm se destacado no âmbito da biologia molecular, devido à sua capacidade de amplificar fragmentos de DNA a partir de poucas unidades formadoras de colônias (UFC) (HU *et al.*, 2003; LUIZ *et al.*, 2021). No entanto, a maioria dos protocolos exige o isolamento da cepa em cultura. Neste sentido, é necessário realizar ensaios diretamente a partir da própria amostra biológica afim de oferecer a melhor estratégia diagnóstica (DE CAROLIS; POSTERARO; SANGUINETTI, 2022).

Em relação aos métodos diagnósticos inovadores para a esporotricose, Hu e colaboradores (2003) foram os primeiros a identificar cepas de *Sporothrix* sp. usando Nested PCR. Os resultados obtidos revelaram positividade da Nested PCR com apenas uma UFC do fungo e sensibilidade 100 vezes maior quando comparada com a PCR convencional (HU *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2010). Embora os resultados tenham sido satisfatórios, é necessário padronizar um protocolo para detectar fungos diretamente em outras amostras clínicas, já que os testes foram feitos apenas com cepas isoladas e em biópsias. Além disso, faltam estudos sobre a aplicação desse método em diferentes tipos de amostras clínicas.

Diante da necessidade de um diagnóstico rápido e preciso, Oliveira e colaboradores (2020) aprimoraram a Nested PCR desenvolvida por Hu e a utilizaram para elucidar a etiologia infecciosa de cinco casos de meningoencefalite crônica em que os testes imunológicos e microbiológicos foram negativos. Isso permitiu aos autores detectar o fragmento de 152 bp,

indicando a presença de *Sporothrix sensu lato* em todos os pacientes examinados (OLIVEIRA *et al.*,2020). Mais tarde, Luiz e colaboradores aplicaram o protocolo aprimorado em amostras de fragmento de tecido de felinos com esporotricose e foi demonstrada a detecção do *Sporothrix sensu lato* (LUIZ *et al.*, 2021).

De acordo com os resultados obtidos por Oliveira e colaboradores (2020) e Luiz e colaboradores (2021), a Nested PCR se constitui uma estratégia diagnóstica promissora às metodologias tradicionais (OLIVEIRA *et al.*,2020; LUIZ *et al.*,2021). Diante disso, o presente estudo se propôs a aplicar o protocolo de Nested PCR baseado na detecção do gene 18S do RNA ribossômico para detectar cepas de *Sporothrix* sp. diretamente em amostras clínicas, podendo dessa forma, complementar o método de referência e permitir uma alternativa mais rápida à cultura.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ESPOROTRICOSE HUMANA

A esporotricose foi descrita pela primeira vez em 1898 por Benjamin Schenck, a qual foi associada a ação de um fungo pertencente ao gênero *Sporothricha* (SCHENCK, 1898). Mais tarde, em 1900, Hektoen e Perkins relataram um caso semelhante ao descrito anteriormente e, após o isolamento do fungo, deram-lhe o nome de *Sporothrix schenckii* (HEKTOEN; PERKINS, 1900).

No Brasil, os primeiros casos acometendo humanos foram descritos em 1907 por Lutz e Splendore, e desde então, a doença tem assumido proporções epidemiológicas significativas (LUTZ; SPLENDORE, 1907). O aumento na descrição dos casos pode ser atribuído tanto ao clima quente e úmido prevalente em regiões de clima tropical e subtropical, como também a transmissão zoonótica (CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 2018).

A esporotricose era anteriormente classificada como uma micose subcutânea, porém, nos últimos anos, o termo micose de implantação tornou-se mais adequado. Isso se deve ao fato de que essa infecção fúngica é amplamente reconhecida por sua capacidade de comprometer não apenas o tecido subcutâneo, mas também outras regiões do organismo. É causada pelos do gênero *Sporothrix*, atualmente agrupados em clado clínico e ambiental, possuem propriedades geofílicas, e por isso são tipicamente encontrados em solo rico em matéria orgânica e vegetação viva ou deteriorada (RAMÍREZ-SOTO *et al.*, 2018).

Durante muito tempo, a micose foi amplamente vista como uma doença associada ao trabalho, especialmente devido à sua propagação em atividade agrícolas, jardinagem e criação de animais (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Além disso, veterinários e analistas de laboratório que lidam com culturas fúngicas também estão em risco de infecção acidental, reforçando a necessidade de vigilância e medidas preventivas em diferentes contextos de exposição (VALERIANO *et al.*, 2020).

Embora historicamente a esporotricose tenha um perfil de contaminação ocupacional, o aumento na descrição de casos no Brasil tem sido atribuído à expansão da área urbana e à transmissão por animais domésticos, principalmente gatos. Nesse sentido, os felinos se destacam como principais

carreadores na disseminação de *Sporothrix* sp., sobretudo no ambiente domiciliar (POESTER *et al.*, 2018).

Esse fenômeno se deve ao fato de que os gatos domésticos ainda preservam hábitos selvagens de escavar a terra para encobrir seus dejetos, bem como afiar suas garras em troncos de árvores. Como esses animais estão em contato próximo com humanos, o fungo é inoculado a partir de arranhaduras e mordeduras (POESTER *et al.*, 2018).

Além da alteração na história natural da esporotricose com relação ao perfil de transmissão, também há mudança em termos de frequência. Embora esta micose já tenha sido descrita nos cinco continentes, ela se destaca como uma zoonose emergente no Brasil, pois alguns estados têm sido acometidos por epidemias e surtos protagonizados pelo vínculo epidemiológico com o gato (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

O aumento de casos em humanos no Brasil nas últimas duas décadas tem sido atribuído a epidemia nas regiões Sul e Sudeste protagonizada pela hiperendemia da esporotricose felina e expansão geográfica. Em virtude da prevalência da doença em vários estados brasileiros, o Ministério da Saúde publicou a Portaria nº 264/2020 que inclui a esporotricose humana na Lista Nacional de Notificação Compulsória no âmbito do SUS (PERNAMBUCO, 2021). Apesar disso, a real prevalência da doença ainda não é conhecida, mas estima-se que seja superior ao previsto na literatura.

Além do acometimento nas regiões Sul e Sudeste, as evidências clínicas e laboratoriais indicam aumento significativo dos casos de esporotricose humana no estado de Pernambuco. De acordo com o último boletim epidemiológico emitido pela Secretaria Estadual de Saúde, em 2016 foram notificados 13 casos. Com o novo programa de vigilância dos casos e descentralização de Serviços de Diagnóstico para a esfera municipal o número subiu para 508 novos casos em 2019 e até maio de 2021, quando o boletim foi emitido, já havia 12 casos (PERNAMBUCO, 2021).

O aumento expressivo dos casos de esporotricose humana em Pernambuco, acompanhado da descentralização dos serviços de diagnóstico, reflete uma maior detecção da doença e evidencia sua relevância como um problema de saúde pública. Embora a esporotricose possa afetar indivíduos de diferentes idades e sexo, os inquéritos epidemiológicos indicam um maior

acometimento entre as mulheres (SILVA *et al.*, 2021). Esse padrão pode estar relacionado à maior permanência no ambiente doméstico e ao envolvimento com atividades laborais que incluem o manejo de animais, fator de risco importante para a transmissão da infecção (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

De forma geral, a esporotricose pode acometer pessoas de ambos os sexos, e diferentes idades. Todavia, o delineamento dos inquéritos epidemiológicos demonstra maior acometimento do sexo feminino podendo ser atribuído a maior permanência no lar e o envolvimento com atividades laborais e cuidados dos animais domésticos.

2.2. FORMAS CLÍNICAS DA ESPOROTRICOSE HUMANA

A esporotricose é uma infecção fúngica com diversas manifestações clínicas, sendo, portanto, categorizada em seis grupos: cutânea, mucosa, osteoarticular, sistêmica, imunorreativo e misto. O tipo de apresentação clínica da doença depende da competência imunológica do hospedeiro, virulência da espécie, rota de infecção, tamanho e profundidade do inóculo (SILVA, 2018; OROFINO-COSTA *et al.* 2022).

As manifestações clínicas cutâneas da esporotricose podem ser classificadas em três tipos: linfocutânea, cutânea fixa e inoculação múltipla. A forma linfocutânea é a mais frequente, correspondendo a 46% a 92% dos casos. Geralmente, acomete áreas expostas do corpo, como mãos e antebraços em adultos, enquanto, em crianças, a face é um local frequentemente afetado. Clinicamente, caracteriza-se pelo aparecimento de uma pápula, nódulo ou úlcera no ponto de inoculação do fungo. Após alguns dias, novos nódulos podem surgir ao longo do trajeto linfático regional (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

A forma cutânea fixa, também chamada de localizada, representa aproximadamente 25% dos casos. Caracteriza-se por uma única lesão restrita ao local da infecção, sem disseminação pelos vasos linfáticos. Essa variante afeta, com maior frequência, o pescoço, o tronco, as pernas e, especialmente, a face. Já a inoculação múltipla apresenta-se com lesões cutâneas polimórficas em diferentes pontos de entrada do fungo. Embora menos documentada, essa forma está frequentemente associada a casos zoonóticos, nos quais múltiplos traumas, como arranhões e mordidas, favorecem a infecção em diversos locais (OROFINO-COSTA *et al.* 2022).

As formas mucosas da esporotricose podem se manifestar em qualquer mucosa do corpo, sendo as mais comuns as localizadas na região ocular e nasal. Em relação à frequência, a mucosa ocular é a mais afetada, apresentando-se geralmente como uma conjuntivite granulomatosa com lesões vegetantes na conjuntiva palpebral e/ou bulbar. Essa forma está fortemente associada à transmissão zoonótica, especialmente devido ao contato próximo entre humanos e gatos. A infecção pode ocorrer quando esses animais espirram, dispersando aerossóis contaminados que atingem a mucosa ocular, ou quando indivíduos tocam os animais e, posteriormente, levam as mãos contaminadas aos olhos. O comprometimento nasal, por sua vez, manifesta-se por obstrução ou ulceração da mucosa nasal, embora seja uma forma menos frequente da doença (OROFINO-COSTA *et al.* 2022).

A esporotricose osteoarticular pode afetar articulações, tendões ou ossos, geralmente em até dois focos, podendo resultar tanto da inoculação direta quanto da disseminação hematogênica. Clinicamente, os pacientes apresentam dor, edema e limitação funcional na região acometida. Indivíduos que sofreram mordidas estão mais predispostos a essa forma clínica, devido à profundidade da inoculação do fungo. Além disso, pessoas com fragilidades osteometabólicas, como idosos ou aqueles em uso prolongado de corticoides, também apresentam maior risco de desenvolver essa manifestação da doença (COSTA *et al.* 2008).

A esporotricose disseminada é uma manifestação rara da doença e pode se apresentar na forma cutânea ou sistêmica. Nesses casos, considera-se que a infecção ocorre devido à inoculação, ingestão ou inalação do fungo. Geralmente, o ponto de entrada pode ser o sistema pulmonar, com posterior disseminação hematogênica. Embora não existam fatores de risco bem definidos, as formas disseminadas da doença são raramente observadas em indivíduos imunocompetentes, estando quase sempre associadas a algum grau de imunossupressão. Entre as condições predisponentes estão HIV/Aids com contagem de CD4+ inferior a 200 células/mm³, etilismo, desnutrição, transplantes, neoplasias hematológicas malignas e uso prolongado de corticoides (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

A esporotricose cutânea disseminada ocorre por disseminação hematogênica e se caracteriza clinicamente pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares, pustulosas e crostosas, associadas a placas ou úlceras,

distribuídas por diversas regiões da pele, sem comprometimento extracutâneo. Por outro lado, a esporotricose disseminada sistêmica apresenta um quadro clínico mais variável. Nos casos em que há envolvimento sistêmico, dois ou mais órgãos ou sistemas podem ser acometidos, sendo os mais frequentemente afetados o sistema nervoso central, os pulmões, o sistema osteoarticular e a medula óssea (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

Os casos extracutâneos são menos comuns e apresentam maior dificuldade diagnóstica, uma vez que não há lesões cutâneas evidentes. Esses casos estão frequentemente relacionados à inalação de esporos e à disseminação hematogênica, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Aproximadamente 80% dessas ocorrências envolvem o acometimento ósseo, tornando os ossos as estruturas mais afetadas (OROFINO-COSTA *et al.* 2022; SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

Considerando a possibilidade de infecção por inalação de esporos e outros propágulos infecciosos do *Sporothrix sp.*, a esporotricose também pode se manifestar na forma pulmonar, assemelhando-se à tuberculose, com um padrão cavitário ou disseminado, mas também podendo apresentar-se sem cavitações. Em casos mais raros, a doença pode evoluir para neuroesporotricose, ocorrendo nas formas mais invasivas da infecção, principalmente em pacientes com Aids. Destaca-se que algumas espécies do gênero *Sporothrix* possuem maior virulência e neurotropismo, especialmente cepas de *S. brasiliensis* (OROFINO-COSTA *et al.* 2022).

Além disso, pacientes com manifestações cutâneas ou mucosas podem desenvolver reações de hipersensibilidade ao longo da doença. Essas reações incluem: eritema nodoso caracterizado por nódulos subcutâneos dolorosos, geralmente localizados nos membros inferiores. Eritema multiforme com lesões cutâneas variadas, incluindo máculas, pápulas ou vesículas. Síndrome de Sweet que é uma dermatose febril aguda, caracterizada por pápulas ou placas eritematosas dolorosas. Artrite reativa caracterizada por uma inflamação articular secundária à infecção, sem a presença direta do patógeno na articulação. (OROFINO-COSTA *et al.* 2022).

2.3. DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE

A elucidação diagnóstica da esporotricose constitui um desafio para os profissionais de saúde, isso se deve a diversidade de apresentações de formas clínicas, bem como ao fato da semelhança das lesões que pode mimetizar outros quadros clínicos verrucosos. Neste sentido, torna-se necessário realizar o diagnóstico diferencial com as doenças que pertencem ao grupo PLECT, a saber: paracoccidioidomicose, leishmaniose tegumentar, esporotricose, cromomicose, tuberculose cutânea (COSTA; MARTÍNEZ; AZULAY, 2018).

O diagnóstico da esporotricose se baseia em um conjunto de informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais. Os procedimentos laboratoriais estabelecidos definem o diagnóstico micológico, isto é, o isolamento do fungo em cultura a partir de amostras de secreção da lesão, raspado ou fragmento de biopsia como o método padrão-ouro. Vale ressaltar que dependendo do quadro clínico, outros espécimes clínicos como, líquido cefalorraquidiano (LCR), sangue e urina podem ser utilizados para diagnóstico (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

O diagnóstico micológico consiste no exame direto e isolamento em meio de cultura. O exame direto a partir de amostras de lesões é realizado por meio da microscopia direta clarificada com hidróxido de potássio (KOH) a 20% (LACAZ *et al.*, 2002) ou coradas com Giemsa ou panótico rápido (VALERIANO *et al.*, 2020). Em casos positivos, evidencia a presença de células leveduriformes apresentando de 2 a 6 μm de diâmetros, esféricas ou elípticas na forma de “charuto” (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Destaca-se que o exame direto em amostras humanas é considerado de baixa sensibilidade, uma vez que, geralmente, são observadas poucas células leveduriformes. Além disso, a visualização dessas células leveduriformes em parasitismo, podem ser observadas em micoses causadas por *Histoplasma capsulatum* e *Candida glabrata*, reduzindo a especificidade do teste. Por essa razão, essa etapa não é considerada uma ferramenta diagnóstica definitiva para humanos, tornando essencial o isolamento e a identificação do agente para a confirmação da infecção (OROFINO-COSTA *et al.* 2017).

Por sua vez, o isolamento em cultura pode ser realizado em Ágar Sabouraud Dextrose (SAD), ágar Mycosel ou BHI (*Brain Heart Infusion*), incubados a 37°C ou 25°C. A variação da temperatura permite a observação de

duas morfologias distintas do fungo. Isso ocorre porque os fungos do gênero *Sporothrix* possuem propriedades termodimórficas, ou seja, apresentam a capacidade de apresentar sua morfologia em duas fases distintas, a filamentosa ou hifal (infectante), quando encontrado no ambiente e/ou cultivado a temperatura ambiente, e a leveduriforme (parasitismo), quando incubada a 37° C (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Quando cultivado a temperatura ambiente, o crescimento miceliano se dá entre 3 a 14 dias, e na micromorfologia são observadas hifas hialinas e septadas com ramificações e conidióforo que sustentam conídios piriformes em disposição simpodial, cuja morfologia é um arranjo floral (“semelhante a pétalas de margarida”). Em relação a pigmentação da colônia, o fungo inicialmente cresce apresentando coloração branca a creme, tornando-se enegrecidas após alguns dias devido à produção de melanina. (VALERIANO *et al.*, 2020). O termodimorfismo é evidenciado por meio da inversão do micélio para levedura em BHI após incubação a 37°C. As colônias semelhantes a leveduras têm uma superfície de cor creme (OROFINO-COSTA *et al.* 2017).

Além do exame direto e a obtenção da cultura, outras metodologias podem ser aplicadas para confirmação dos casos de esporotricose, a saber, o exame histopatológico, exames sorológicos, análises moleculares e proteômicas. No entanto, assim como no exame direto, na histopatologia, a visualização de leveduras é difícil devido à sua baixa quantidade nos tecidos humanos. Quando presentes, essas estruturas fúngicas podem ser evidenciadas por colorações específicas, como ácido periódico de Schiff (PAS) ou pela metenamina de prata pelo método de Grocott-Gomori (MORRIS-JONES, 2002).

Frequentemente a avaliação histopatológica revela um padrão de infiltrado inflamatório piogênico, associado ou não, um aspecto granulomatoso. Apesar da técnica contribuir para elucidação diagnóstica, geralmente é considerada inespecífica e pode assemelhar-se com outras doenças granulomatosas como tuberculose cutânea, hanseníase e infecções fúngicas profundas (MAHAJAN *et al.*, 2005).

Quanto às técnicas sorológicas, estas por sua vez podem ser utilizadas quando não é possível obter o agente etiológico em meio de cultura, principalmente nas formas atípicas ou extracutâneas da esporotricose, e para acompanhamento do tratamento, pois a avaliação dos níveis de anticorpos

permite monitorar a recidiva. O método baseado em ELISA é capaz de detectar anticorpos IgG contra o antígeno SsCBF (*Sporothrix schenckii* Con A-Binding Fraction) em humanos com 90% de sensibilidade e 80% de especificidade, além de uma baixa taxa de reação cruzada. Apesar dos resultados satisfatórios, a metodologia não é comumente utilizada na prática clínica pois está limitado a centros de pesquisa devido ao alto custo e disponibilidade limitada de testes padronizados (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2005).

Os testes de reação intradérmica podem ser usados como alternativa para o diagnóstico da esporotricose, pois detectam reações de hipersensibilidade tardia à esporotriquina, um complexo antigênico formado por um peptídeo rhamnomann (PRM) na derme. No entanto, essa abordagem está em desuso devido a diversas limitações, como baixa eficácia em casos graves, em pacientes de áreas endêmicas ou previamente tratados, além da falta de padronização da solução antigênica. Além disso, pode gerar resultados falsos-positivos em indivíduos sem doença ativa e falso-negativos em infecções nas formas disseminadas ou extracutâneas. Outro fator importante é que tanto a esporotriquina quanto o PRM não possuem aprovação da Anvisa para uso na rotina de diagnóstico laboratorial no Brasil (Bonifaz *et al.*, 2018).

A análise proteômica por MALDI-TOF MS (espectrometria de massa em tempo de voo por ionização e dessorção a laser assistida por matriz) é outro método que permite a identificação rápida e específica de isolados de *Sporothrix* sp. pela detecção de picos iônicos compatíveis com a massa molecular do fungo. Embora sua confiabilidade e precisão sejam compatíveis com os métodos moleculares atuais, os dispositivos dependem de um banco de dados enriquecido com espectros internos de cepas de referência, somados à disponibilidade de uma equipe capacitada (OLIVEIRA *et al.* 2015).

Os métodos de detecção molecular foram adicionados as técnicas de diagnósticos existentes, pois há a necessidade de agilizar a detecção do agente. Por esta razão, existem diversos protocolos baseados na detecção de ácidos nucléicos de *Sporothrix* sp. No entanto, uma das técnicas mais importantes é o sequenciamento de DNA baseado em PCR, caracterizado pela capacidade de sintetizar grandes quantidades de DNA a partir de baixas concentrações, podendo ser realizado de forma eficaz e rápida (RODRIGUES *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019).

2.4. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Os métodos convencionais para diagnosticar a esporotricose, isto é, testes microbiológicos baseados na morfologia e/ou bioquímica dos microrganismos, são limitados à determinação apenas do gênero do agente etiológico. Neste sentido, ensaios baseados em abordagens moleculares se destacam por sua capacidade de definir em nível de espécie, podendo assim nortear a instituição de uma terapêutica adequada, bem como também é importante na caracterização da virulência entre as cepas (FREITAS *et al.*, 2015; ROSSOW *et al.*, 2020).

Tais metodologias destacam-se devido a sua capacidade de rápida identificação e alto rendimento, isso porque os ensaios se baseiam na identificação dos fungos por meio de marcadores genéticos, em detrimento de suas características fenotípicas. Embora a literatura descreva vários protocolos, o mais utilizado é o sequenciamento de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido de análise filogenética (ZHANG *et al.*, 2019; OROFINO-COSTA *et al.*, 2022).

O sequenciamento de DNA possibilita o estudo da diversidade genética e estrutura populacional durante surtos e epidemias, elucidando assim as rotas de transmissão e propagação de novos patógenos. A este respeito, o teste de PCR pode ser realizado usando várias técnicas, sendo as principais: PCR *fingerprinting*, Nested PCR, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP), *Rolling Circle Amplification* (RCA) e “*primers*” espécie-específicos, para a detecção de *Sporothrix* sp. (ZHANG *et al.*, 2019; OROFINO-COSTA *et al.*, 2022).

A análise filogenética por sua vez é realizada por meio da avaliação de um único marcador ou uma combinação de genes que codificam proteínas (quitina sintase, de genes que codificam proteínas (quitina sintase, β -tubulina e calmodulina). Estudos comparando a identificação fenotípica e a análise de seqüências do gene da calmodulina (CAL) a partir da PCR convencional demonstrou que este gene é um bom marcador na distinção entre espécies, uma vez que possibilitou a elucidação de um complexo de interesse clínico e a descoberta de três novas espécies (*Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*) (MARIMON *et al.*, 2007).

A PCR *fingerprinting* é uma alternativa dentro do conjunto de técnicas moleculares que também permite a identificação em nível de espécie de isolados clínicos e ambientais de forma rápida e reprodutível, a partir da impressão digital utilizando o primer universal T3B. Em casos positivos, a técnica produz padrões distintos de bandagem que variam de tamanho, permitindo a distinção precisa de todas as espécies do complexo *Sporothrix*. Apesar da técnica se mostrar menos onerosa, a metodologia exige o isolamento prévio da cepa (OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Os fungos também podem ser identificados por Nested PCR. Esta por sua vez é uma metodologia que detecta cepas de *Sporothrix* sp. a partir da sequência do gene 18S do RNA ribossômico como alvo. Hu e colaboradores aplicaram a metodologia em 10 cepas de fungos clínicos. Eles demonstraram uma sensibilidade 100 vezes maior em comparação com a PCR convencional, conseguindo resultados positivos com apenas uma UFC do microrganismo. Além disso, a Nested PCR apresenta altos índices de especificidade, sem reação cruzada com outros fungos e bactérias, apesar de identificar os microrganismos apenas a nível de gênero, não de espécie (HU *et al.*, 2003).

A técnica do RFLP tem sido útil para evidenciar a diversidade genética associada à distribuição geográfica de isolados de *Sporothrix* sp. Ela consiste no tratamento de DNA com enzima de restrição e em geral, os protocolos possuem como alvo a amplificação parcial do gene da calmodulina (CAL-RFLP) digerido com a enzima *HhaI*, então, são produzidos perfis eletroforéticos capazes de representar de forma individualizada as espécies clinicamente importantes. No entanto, o protocolo não permite a identificação de todos os isolados incluídos nesse complexo (RODRIGUES; DE HOOG; DE CARMARGO, 2014).

A amplificação em círculo rolante do inglês *Rolling Circle Amplification* (RCA) se destaca como um método de triagem de baixo custo que pode ser usado para identificar em nível de espécies as cepas clinicamente importantes de *Sporothrix*. Para isso a técnica utiliza sondas que avaliam o polimorfismo no gene que codifica a calmodulina, e com isso fazem distinção das espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. lurie*, *S. mexicana* e *S. pallida*. (RODRIGUES; DE HOOG; DE CARMARGO, 2015).

As diversas possibilidades de PCR, visando melhorar o diagnóstico molecular da esporotricose, inclui novos marcadores específicos baseados em

sequências gênicas de calmodulina. O ensaio é realizado com única rodada de PCR e quando positiva consegue identificar as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida* por meio de *primers* espécies-específicos. Embora o teste possua sensibilidade capaz de detectar até 10 fragmentos de DNA e genotipagem de forma rápida e com baixo custo, não houve identificação de todas as espécies do complexo (RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, 2015b).

Posteriormente, um ensaio de PCR multiplex em tempo real baseado no gene da calmodulina foi desenvolvido para melhorar a caracterização molecular de cepas de *Sporothrix*. Os testes foram realizados em espécimes clínicos e os resultados obtidos foram comparados com cultura e PCR espécie-específica. Os dados demonstraram alto nível de sensibilidade e especificidade, possibilitando a detecção e identificação de espécies clinicamente relevantes, além de maior rapidez e redução do volume amostral (ZHANG *et al.*,2019).

Diante desse cenário, os métodos de genotipagem disponíveis se destacam por seu poder diagnóstico, todavia a maioria dos ensaios atualmente disponíveis requer o isolamento da cepa em cultura. Esses ensaios que realizam avaliação molecular diretamente de amostras clínicas reduzem atrasos diagnósticos, logo, impactam no prognóstico do paciente e encurtam o tempo de internação (MAUBON *et al.*, 2022). Além disso, a distribuição geográfica, a virulência e a suscetibilidade aos agentes antifúngicos podem ser mais bem compreendidas (LOPES-BEZERRA *et al.*,2018).

2.5. NESTED PCR

No que diz respeito aos protocolos existente para a detecção de cepas de *Sporothrix* sp. por reação em cadeia da polimerase (PCR), a maioria dos testes exigem o isolamento prévio do fungo em meios de cultura, entretanto tal aspecto, de forma simultânea e/ou complementar pode contribuir para o atraso no diagnóstico (DOERN *et al.*,2019; OLIVEIRA *et al.*,2020).

Neste sentido, Nested PCR é um dos métodos de genotipagem que se pode destacar no âmbito da biologia molecular, devido a sua capacidade de obter resultados confiáveis, de forma rápida e eficiente (LUIZ *et al.*,2021). Isso se deve ao fato de que este teste é capaz de amplificar fragmentos de DNA a

partir de poucas unidades formadoras de colônias, mas também, diretamente da amostra clínica (HU *et al.*, 2003; LUIZ *et al.*, 2021).

A Nested PCR também chamada de PCR aninhada consiste em uma variante da Reação em Cadeia da Polimerase que envolve duas reações de amplificação sequenciais, cada uma usando um conjunto diferente de *primers*. Isso significa que o teste é feito em duas rodadas, a primeira etapa consiste em uma PCR convencional e o produto dessa amplificação é utilizado como molde para uma nova reação. Este tipo de ensaio é adequado para situações em que é necessária resposta com maior sensibilidade e especificidade (HU *et al.*, 2003).

Tais resultados são obtidos usando dois pares de *primers*. Isso permite que mais ciclos de reação sejam executados, resultando em maior sensibilidade. Além disso, a utilização de dois pares de *primers* diferentes proporciona aumento da especificidade em relação à PCR convencional, pois reduz a ligação inespecífica dos produtos gerados na primeira PCR (DA SILVA ARRUDA; DA SILVA FILHO; NETO, 2022).

No diagnóstico de esporotricose por meio de Nested PCR, Hu e colaboradores foram os primeiros a desenvolverem um ensaio capaz de detectar a sequência do gene 18S do RNA ribossômico de cepas do *S. schenckii*. Os ensaios foram realizados com 10 cepas de fungos clínicos. Os resultados demonstraram sensibilidade da Nested PCR 100 vezes maior quando comparada com a PCR de primeira rodada, sendo capaz de evidenciar resultados positivos com apenas uma UFC de *S. schenckii*. A especificidade foi comprovada quando não houve extração de DNA de outros fungos, bactérias e tecido normal da pele que foram testados (HU *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2010).

Embora a metodologia tenha apresentado resultados satisfatórios, o método foi realizado a partir de cepas isoladas em cultura, não sendo testado a partir de amostras clínicas. Diante dessa lacuna e da necessidade de elucidar a etiologia infecciosa de cinco casos de meningoencefalite crônica, que apresentaram exames imunológicos e microbiológicos negativos, Oliveira e colaboradores aprimoraram a Nested PCR desenvolvida por Hu e colaboradores (2003), com isso conseguiram detectar o fragmento de 152 bp sugerindo a presença do *Sporothrix sensu lato* em todos os cinco pacientes testados (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Com base nesses resultados, os autores afirmam que a Nested PCR é um método específico para a detecção de cepas de *Sporothrix sensu lato*. Além disso, destacam que a amplificação do fragmento do gene 18S do RNA ribossômico permite a identificação de todo o complexo *Sporothrix*, todavia, a definição em nível de espécie requer o desenvolvimento de novas estratégias moleculares (OLIVEIRA *et al.*,2020).

Luiz e colaboradores (2021) aplicaram o protocolo aprimorado de Hu em dez amostras de tecido de felinos com esporotricose. Após fixação em formalina, embebição em parafina e seccionamento em cortes 5 e 16 µm de espessura, as amostras foram divididas em dois grupos conforme o kit de extração de DNA utilizado. A extração química e cortes de 5 µm mostraram-se mais eficazes na extração de DNA fúngico. A Nested PCR revelou uma sensibilidade de 100% para controles positivos e 50% para os fragmentos de tecido dos felinos na detecção de *Sporothrix sensu lato* (LUIZ *et al.*,2021).

Na perspectiva de se obter resultados confiáveis, de forma rápida e eficiente, a Nested PCR destaca-se como um ensaio com grande potencial para aplicação diagnóstica na esporotricose humana e felina. Portanto, será importante validar a aplicação deste protocolo para detecção fúngica diretamente de amostras humanas proveniente de diversos sítios corpóreos.

3. PERGUNTA DA PESQUISA

Um novo protocolo molecular de Nested PCR baseado na detecção e identificação do gene 18S do RNA ribossômico do *Sporothrix* sp. diretamente de amostras clínicas (fragmento de tecido cutâneo, exsudato de lesão e secreção conjuntival), pode se constituir uma alternativa diagnóstica às metodologias padronizadas (exame direto e cultivo em meio de cultura) para a esporotricose?

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Aplicar um protocolo molecular de Nested PCR para a detecção e identificação rápida do *Sporothrix* sp. diretamente de amostras clínicas.

4.2. Objetivos específicos

- Diagnosticar a esporotricose humana, a partir de amostras clínicas de pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas, Recife, Brasil;
- Descrever as características clínicas e epidemiológicas dos pacientes envolvidos no estudo;
- Caracterizar os isolados clínicos baseado no sequenciamento parcial do gene da Calmodulina;
- Detectar *Sporothrix* sp. diretamente de amostras clínicas por meio da técnica da Nested PCR.

5. MÉTODOS

5.1. Desenho do estudo

Tratou-se de um estudo analítico, de caráter experimental, que teve como proposta aplicar um protocolo molecular capaz de diagnosticar os casos de esporotricose humana atendidos em um serviço de referência no estado de Pernambuco, no período de abril a setembro de 2023.

5.2. População alvo e área geográfica de abrangência

A população deste estudo foi composta por pacientes com lesões sugestivas de esporotricose, que foram atendidos no serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas (HC/EBSERH/UFPE).

O Serviço de Dermatologia do HC/UFPE atua com uma equipe multidisciplinar que atende mensalmente entre 850 e 1000 pacientes, além disso, a unidade possui um laboratório de micologia médica que desde 2017 contabiliza 700 casos de esporotricose humana diagnosticados. Neste sentido, o serviço oferece assistência especializada e acesso aos exames necessários, servindo como referência para o diagnóstico e acompanhamento de pacientes com afecções dermatológicas em Recife, Região Metropolitana e em todo o Estado de Pernambuco.

5.3. Amostragem: recrutamento e acompanhamento

A amostragem foi composta por 13 amostras clínicas oriundas de pacientes de ambos os sexos que obtiveram solicitação médica para diagnóstico micológico para esporotricose. Esse grupo de indivíduos foi captado por meio de demanda espontânea, seguindo o fluxo de atendimentos do ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas.

Após a consulta clínica os pacientes foram encaminhados para a coleta da amostra biológica e durante esse momento foi realizada uma entrevista para verificar se de acordo com os critérios de inclusão e exclusão estabelecidos, os mesmos estavam aptos a participar do estudo. Aqueles que preenchiam os requisitos foram convidados a participar da pesquisa e neste momento também foi esclarecido os objetivos e metodologia da mesma.

5.4. Critérios de inclusão e exclusão

5.4.1. Critérios de inclusão

Foram incluídos nesta pesquisa um grupo de pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia (HC/EBSERH/UFPE), diagnosticados com esporotricose e que concordaram em assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice A), ou que, nos casos em que o participante estava inapto ou incapacitado, seu responsável legal assinasse.

5.4.2. Critérios de exclusão

Não foram incluídos pacientes que estavam realizando terapia antifúngica nos quinze dias que antecederam à coleta do espécime clínico.

5.5. Definição das variáveis e coleta de dados

As variáveis analisadas foram: idade, gênero, atividade laboral, local de residência, tratamento medicamentoso prévio, presença de outros microrganismos, traumas cutâneos sofridos, contato com gatos na residência e realização de atividades com jardinagem ou solo na residência, trabalho ou lazer.

5.5.1. Categorização das variáveis

VARIÁVEIS	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO
Idade	Anos completos de vida no dia da entrevista de acordo com a data de nascimento.	Variável numérica contínua
Gênero	Referente ao gênero masculino ou feminino.	Variável dicotômica, categorizada em: - Masculino; - Feminino
Atividade laboral / Ocupação	Profissão exercida ou atividade principal.	Variável nominal, categorizadas em: -Trabalhador rural; - Veterinário; - Empregada doméstica; - Do lar; - Outros
Local de residência	Referente ao bairro da cidade em que mora.	Variável nominal
Presença de outros microrganismos	Caracterizada pela identificação / isolamento de outro microrganismo, exceto, <i>Sporothrix</i> sp.	Variável nominal
Contato com gatos na residência	Contato intradomiciliar com gatos, relatado pelo próprio paciente.	Variável dicotômica, categorizada em: -Sim -Não
Atividades com jardim ou solo na residência, trabalho ou lazer	Contato com matéria orgânica (plantas ou solo), relatado pelo próprio paciente.	Variável dicotômica, categorizada em: -Sim -Não

5.6. Métodos de coleta e processamento de dados

As informações foram obtidas a partir da análise dos prontuários, mas também, de dados oriundos dos livros de registros laboratoriais do respectivo serviço. Para isso, foi aplicado um questionário com informações pessoais, sociodemográficas e clínico-laboratoriais. Além disso, foram coletadas informações acerca da exposição ambiental a animais doentes, em especial felinos e manuseio com solo e vegetais (Apêndice B). A partir desta composição, as informações obtidas foram organizadas em planilhas e em seguida, analisadas.

5.7. Padronização das técnicas

5.7.1. Obtenção e processamento das amostras clínicas (diagnóstico micológico convencional)

As amostras clínicas foram obtidas de pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia (HC/EBSERH/UFPE). Os espécimes clínicos do fragmento de tecido cutâneo foram obtidos por meio de *punch* dermatológico de 4mm, bem como, as amostras de exsudato de pele lesionada e secreção conjuntival foram coletadas com *swabs* esterilizados pré-umedecidos com solução salina esterilizada.

Ambos os procedimentos foram utilizados para o diagnóstico laboratorial micológico convencional (exame direto e cultura). Após a obtenção das amostras, as lâminas foram confeccionadas e coradas com coloração panótica (VALERIANO *et al.*, 2020). Em seguida, foram semeadas/ inoculadas em duplicata na superfície do meio ágar Mycosel contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 25-30° por até 15 dias. Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas pela observação macro e micromorfologia (LACAZ *et al.*, 2002), além disso, foi realizado o sequenciamento parcial do gene calmodulina (CAL) (MARIMON *et al.*, 2007).

5.7.2. Identificação molecular dos isolados clínicos de *Sporothrix* sp.

A extração de DNA foi realizada com kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit. Resumidamente, as colônias fúngicas foram transferidas para tubo de extração de DNA contendo pérolas de vidro e foi adicionado 300 µL da

solução de lise nuclear, em seguida, os tubos foram agitados a 5.5m/s em FastPrep (BIO 101, Farmingdale, NewYork, USA) e incubados a 65° C por 15 minutos. Posteriormente, foi adicionado 100 µL da solução de precipitação de proteína com posterior agitação e centrifugação a 14.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo, que continha 400 µL de isopropanol. O novo tubo foi homogeneizado por inversão e submetido a e centrifugação a 14.000 RPM por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e, adicionou-se 400 µL de etanol 70% a temperatura ambiente e, novamente centrifugado. Após a centrifugação o tubo foi invertido para a completa eliminação do sobrenadante. O DNA extraído foi ressuspensão em 50µL de água Milli-Q autoclavada e refrigerado a 4 °C overnight. A quantificação de DNA foi realizada em Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

A amplificação da região genômica da calmodulina (CAL) foi realizada conforme descrito por Marimon (2007). As reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 20µL utilizando os primers senso CL1 (5'GA (GA) T (AT) CAA GGA GGC CTTCTC-3') e antisenso CL2A (5'-TTT TTG CATCATGAGTTGGAC-3'). A PCR foi realizada em termociclador Veriti™ Termociclador de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) seguindo os parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos, anelamento a 60° C por 45 segundos, e extensão a 72° C durante 1 minuto, com uma extensão final a 72° C por 10 minutos.

As sequências obtidas a partir do sequenciamento dos genes que codificam a CAL foram editadas no software BioEdit™, versão 7.2.6.1, e submetidas à pesquisa de sequências similares utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). Análises filogenéticas foram realizadas utilizando nossas sequências e sequências de referência. As sequências foram alinhadas usando a interface online MAFFT v.7 (disponível em <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>) e editadas com software MEGA V.11 (disponível em <https://www.megasoftware.net/>). *Grosmania sersens* (CBS 141.36) foi utilizada como grupo externo. A análise de Máxima Verossimilhança (ML) foi realizada com a matriz combinada dos genes usando o RAxML-HPC BlackBox v. 8.2.12 no CIPRES Science Portal (disponível em <https://www.phylo.org/portal2/login>). A análise de ML foi realizada com 1000

réplicas de bootstrap e valores iguais ou superiores a 70% de suporte de ML de bootstrap foram mostrados próximos aos nós. A árvore filogenética resultante foi visualizada usando o software FigTree ([//tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/)) e exportada para edição. As sequências obtidas neste estudo foram depositadas no banco de dados NCBI GenBank.

5.7.3. Extração e quantificação de DNA das amostras clínicas para diagnóstico molecular por Nested PCR

O protocolo de extração seguiu conforme descrito por Oliveira *et al.* (2020) adaptado. Foram maceradas em solução salina estéril as amostras de fragmento de tecido obtidos por meio de biópsia. Em seguida, 200 µl de cada uma das amostras contendo fragmento de tecido, exsudato da lesão e secreção conjuntival, foram centrifugadas por 5 minutos a 13.000 RPM para obtenção dos *pellets*. A extração de DNA foi realizada com o mini kit QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA extraído foi congelado a -30° C. A quantificação de DNA de todas as amostras foi realizada em termociclador Veriti™ Termociclador de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA).

5.7.4. Protocolo molecular de Nested PCR

O ensaio foi realizado no Laboratório de Taxonomia Bioquímica e Bioprospecção/Fiocruz-RJ. O protocolo foi realizado de acordo com o método baseado na amplificação do RNA ribossomal 18S previamente descrito por Luiz *et al.* (2022) adaptado. O DNA de *S. brasiliensis* extraído da cepa CBS 120339 (antiga IPEC 16490) foi utilizado em cada lote de PCR como controle positivo. A reação foi realizada com uma solução pronta para uso de PCR master mix 2X (Promega Corporation, Madison, EUA – Lot: 22332002). A mistura principal de PCR contém 50 unidades /mL de Taq DNA polimerase fornecida em um tampão de reação patenteado (pH 8,5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP e 3mM MgCl₂. Para um volume total de reação de 50 µL, as reações foram padronizadas para obter uma concentração final de 100 ng de DNA. A mistura reacional da primeira rodada de PCR consistiu em um 1-15 µL de molde de DNA, com concentrações finais de mistura mestre de PCR 1x e 1,0 µL de cada primer externo SS1 (5'-CTC, GTT, CGG, CAC, CTT, ACA CG-3') e

SS2 (5'-CGC, TGC, CAA, AGC, AAC, GCG, GG-3'). A mistura reacional da Nested PCR foi idêntica, exceto pelo 3 µl do primeiro produto da reação e o par de primers internos SS3 (5'-ACT CAC CAG GTC CAG ACA CGA TG-3') e SS4 (5'-CGC GGG CTA TTT AGC AGG TTA AG-3'). A reação de PCR foi realizada em tubos de polipropileno de parede fina de 0,5 mL em termociclador Veriti™ Termociclador de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) seguindo os parâmetros de: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, em seguida 40 ciclos de 1 minuto a 95°C de desnaturação, hibridização por 1 minuto a 68°C e extensão por 1 minuto a 72°C, seguido de 10 minutos a 72°C para extensão final. Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% p/v (Agarose Ultra Pure™, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA – Lote: 0000300647). O DNA foi corado com Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil – Lote:160.919BT) e os *amplicons* foram visualizados em um transiluminador LED K33-333 (KASVI, Paraná, Brasil).

5.8. Análise dos dados

Os dados referentes à obtenção das amostras clínicas foram analisados por meio de estatística descritiva, em que se verificou média, mediana, desvio padrão e distribuição de frequência.

5.9. Aspectos éticos

O projeto foi apresentado à Direção do serviço de Dermatologia (HC/EBSERH/UFPE) e ao Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos/Fiocruz-RJ para a obtenção das anuências (ANEXOS A e B). Além disso, a pesquisa recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) com Seres Humanos do Hospital das Clínicas (HC/EBSERH/UFPE) e está sob protocolo CAAE: 71720323.8.0000.8807 (APÊNDICE D), como também aprovação do CEP do Instituto Oswaldo Cruz e está sob protocolo CAAE: 71720323.8.3003.5248 (APÊNDICE E).

6. RESULTADOS

Este estudo avaliou a técnica molecular de Nested PCR para a detecção de *Sporothrix* sp. diretamente de amostras clínicas de fragmento de tecido cutâneo obtido por meio de biópsia, exsudato de lesão e secreção conjuntival de pacientes com diagnóstico laboratorial confirmado para esporotricose por meio do isolamento do fungo em meios de cultura. Foram incluídos 12 pacientes e utilizamos 13 amostras, sendo seis (46,2%; n=6/13) fragmentos de tecido cutâneo, cinco (41,7%; n=5/13) exsudato de lesão e duas (16,7%; n=2/13) de secreção conjuntival, selecionadas de acordo com o tipo de lesão apresentada por cada paciente. Foram incluídas duas amostras (fragmento de pele e exsudato) de um mesmo paciente.

Com relação a avaliação dos dados epidemiológicos, constatamos que a idade média dos pacientes foi de $44,5 \pm 16,2$ anos, com predomínio do sexo masculino (58,3%; n=7/12) diferente de alguns trabalhos que relatam o sexo feminino prevalecendo. A avaliação quanto ao local de residência mostrou que 75,0% (n=9/12) dos pacientes possuíam endereço em áreas urbanas da Região Metropolitana do Recife (RMR) (Tabela 1).

De acordo com dados de prontuários, nove (75,0%; n=9/12) pacientes afirmaram exercer alguma atividade laboral, mas não houve predileção absoluta por determinada ocupação, porém, apesar do predomínio de pacientes do sexo masculino, observa-se que 80,0% (n=4/5) das mulheres declararam desempenhar atividades do lar/diarista representando 33,0% (n=4/12) de toda frequência independente do sexo.

Em nove (75,0%; n=9/12) pacientes foi observado contato com gatos por meio de arranhadura ou mordedura. A esporotricose disseminada foi diagnosticada em 33,3% (n=4/12) dos pacientes e, não somente isso, mas também, 46,2% das lesões localizavam-se em membros superiores, independente da forma clínica. A esporotricose não apresentou um tipo de lesão predominante, porém lesões nodulares (n=2/13; 15,4%), ulceradas (n=3/13; 23,0%) ou ambas (n=3/13; 23,0%) foram frequentes.

Tabela 1: Descrição das características epidemiológicas e clínico-laboratoriais dos pacientes diagnósticos com esporotricose em um hospital de referência na cidade do Recife – PE.

IDADE	SEXO	LOCAL DE RESIDÊNCIA	OCUPAÇÃO	FORMA CLÍNICA	TOPOGRAFIA DA LESÃO	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	COMORBIDADES	TIPO DE AMOSTRA	EXAME DIRETO*	CULTURA	GENE CAL	NESTED PCR
55	Fem	Várzea, Recife	Diarista	Síndrome oculoglandular de Parinaud	Conjuntiva esquerda	Hiperemia conjuntival de aspecto granulomatoso	HAS	Secreção conjuntival	Negativo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
64	Masc	Sítio novo, Olinda	Ambulante	Esporotricose disseminada	Antebraço esquerdo	Placa infiltrativa eritematosa violácea	HAS	Fragmento de tecido	Negativo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
44	Fem	Alto do sol nascente, Olinda	Do lar	Esporotricose fixa	Malar	Lesão ulcerada com bordas eritematosas	HAS	Exsudato de lesão	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
37	Masc	Timbi, Camaragibe	Programador	Esporotricose fixa	Membro inferior direito	Nódulos dolorosos difusos	Não possui	Exsudato de lesão	Positivo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
48	Fem	Ponte dos Carvalhos, Cabo de Santo	Do lar	Esporotricose fixa	Antebraço direito	Lesão úlcero-infiltrada; Linfagite ascendente	Não possui	Fragmento de tecido	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
17	Masc	Curado, Jaboatão dos Guararapes	Não consta	Não consta	Mão direita	Não consta	Não consta	Fragmento de tecido	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
56	Masc	Prazeres, Jaboatão dos Guararapes	Não consta	Esporotricose disseminada	Saco lacrimal	Nódulo eritematoso exofítico exulcerado em	HIV	Exsudato de lesão	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
4	Fem	Jucá, Gravatá	Estudante	Síndrome oculoglandular de Parinaud	Conjuntiva esquerda	Lesão ulceronodular supurativa com	Não possui	Secreção conjuntival	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
45	Masc	Não consta	Motorista	Linfocutânea	Antebraço direito	Não consta	HAS	Fragmento de tecido	Não realizado	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
47	Masc	Sudene, Escada	Não consta	Esporotricose disseminada	Dorso	Não consta	HIV	Fragmento de tecido	Positivo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
33	Masc	Macaxeira, Recife	Motorista	Linfocutânea	Antebraço direito	Placa eritematosa com ulceração central	Não possui	Fragmento de tecido	Negativo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
33	Fem	Salgadinho, Olinda	Do lar	Esporotricose disseminada	Antebraço direito	Nódulos ulcerados difusos	Não possui	Fragmento de tecido	Positivo	Sporothrix sp.	S. brasiliensis	Sporothrix sensu lato
			Pescoço			Exsudato de lesão	Negativo			Não houve desenvolvimento fúngico	Não realizado	Sporothrix sensu lato

CÓD

HC100/
2023HC141/
2023HC201/
2023HC204/
2023HC212/
2023HC256//
2023HC237/
2023HC262/
2023HC264/
2023HC305/
2023HC312/
2023HC313/
2023

Nota: *O exame micológico direto positivo corresponde a visualização de células leveduriformes apresentando halo à coloração panóptica.

Sete (58,3%; n=7/12) pacientes declararam possuir alguma doença associada ou algum tipo de comorbidade, sendo elas: 57,1% (n=4/7) hipertensão arterial sistêmica (HAS) e 42,9% (n=3/7) o Vírus da imunodeficiência humana (HIV). Vale salientar que todos os pacientes com HIV, foram diagnosticados com esporotricose disseminada.

O exame direto foi realizado em sete amostras (53,8%; n=7/13), destas, a presença de células leveduriformes hialinas, globosas, ovais ou elípticas apresentando halo à coloração panóptica (Figura 1A) esteve presente em quatro amostras (57,1%; n=4/7). *Sporothrix* sp. foi recuperado em ágar mycosel em 12 (92,3%) das 13 amostras incluídas no estudo. As colônias inicialmente (Figura 1B) apresentaram coloração branca à creme e, após aproximadamente sete dias de crescimento, começaram a escurecer até adquirirem uma tonalidade enegrecida, associada à produção de melanina. A micromorfologia demonstrou hifas hialinas, septadas e ramificadas com conidióforo, terminando em vesícula denticulada expandida no ápice e com aspecto floral (Figura 1C). Apenas uma amostra (fragmento de pele), do paciente que teve duas amostras analisadas, foi positiva na cultura.



Figura 1: **A)** Exame micológico direto evidenciando células leveduriformes elípticas apresentando halo à coloração panóptica; **B)** *Sporothrix* sp. em ágar mycosel demonstrando colônias brancas e enrugadas que escureceram gradualmente até uma cor enegrecida; **C)** Micromorfologia com filamentos miceliais delgados, septados e conidióforos contendo conídios com arranjo floral em forma de “margaridas”.

A análise genotípica a partir do sequenciamento parcial do gene CAL realizada em 12 cepas clínicas de *Sporothrix* identificou 100% dos isolados como *Sporothrix brasiliensis* conforme mostrado na Figura 2 e resumido na Tabela 1.

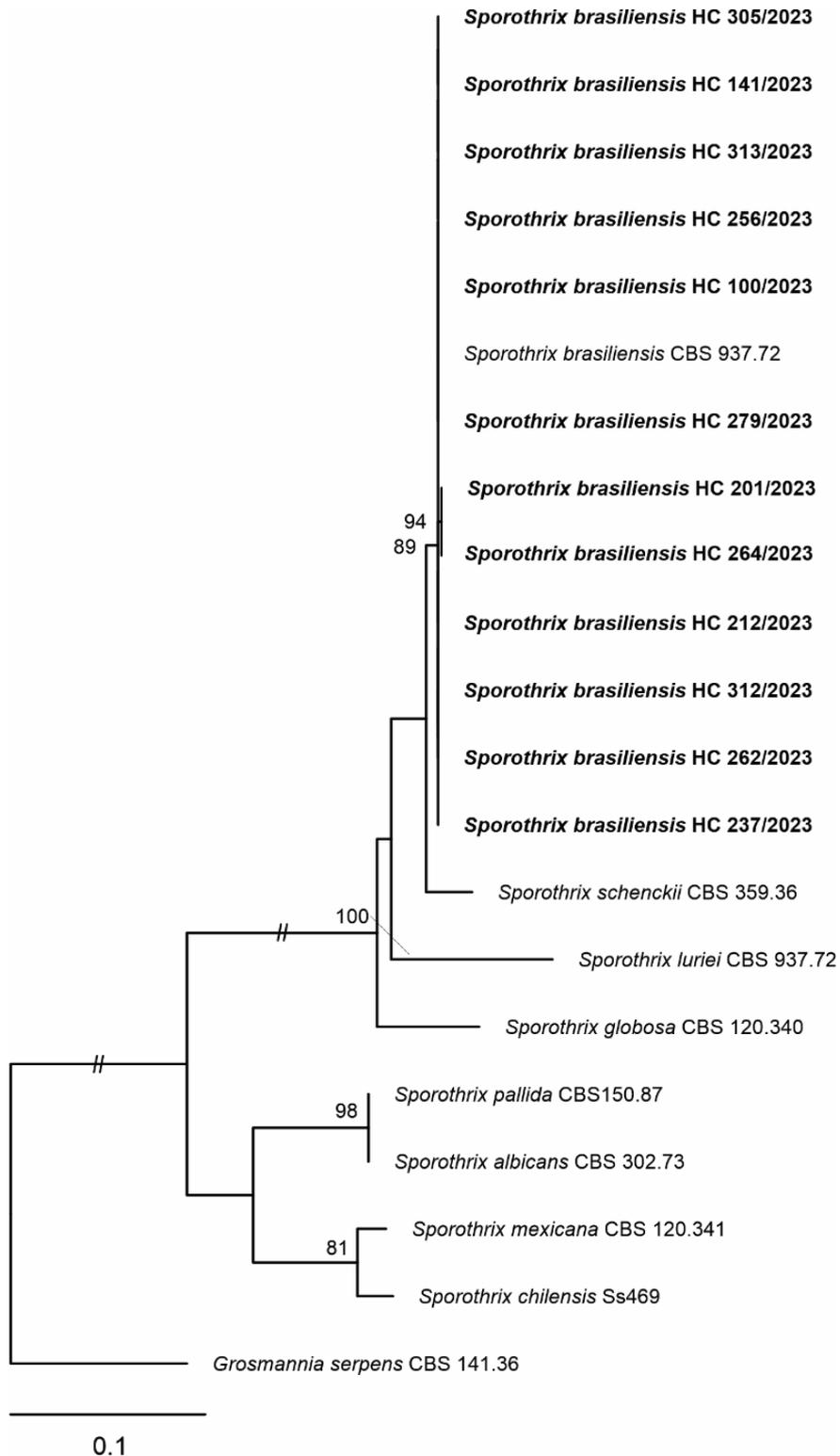


Figura 2: Análise filogenética dos isolados de *Sporothrix* sp. a partir do sequenciamento dos genes que codificam a calmodulina (CAL).

Este estudo avaliou a técnica molecular Nested PCR para a detecção de *Sporothrix* sp. diretamente de amostras clínicas de pacientes atendidos pela primeira vez em um centro de referência dermatológica no Nordeste do Brasil. O protocolo de extração de DNA e a metodologia de Nested PCR foram capazes de detectar a cepa CBS 120339 (antiga IPEC 16490), assim como um amplicon de 152 pb em 13 amostras clínicas de 12 pacientes testados (Figura 3), sugerindo a presença de *Sporothrix sensu lato* (Tabela 1). Nenhuma amplificação foi observada no controle negativo. A pureza do DNA foi determinada pela razão de absorvância entre 260nm e 280nm (A260/A280), sendo considerada de boa qualidade quando essa razão esteve entre 1,8 a 2,0.

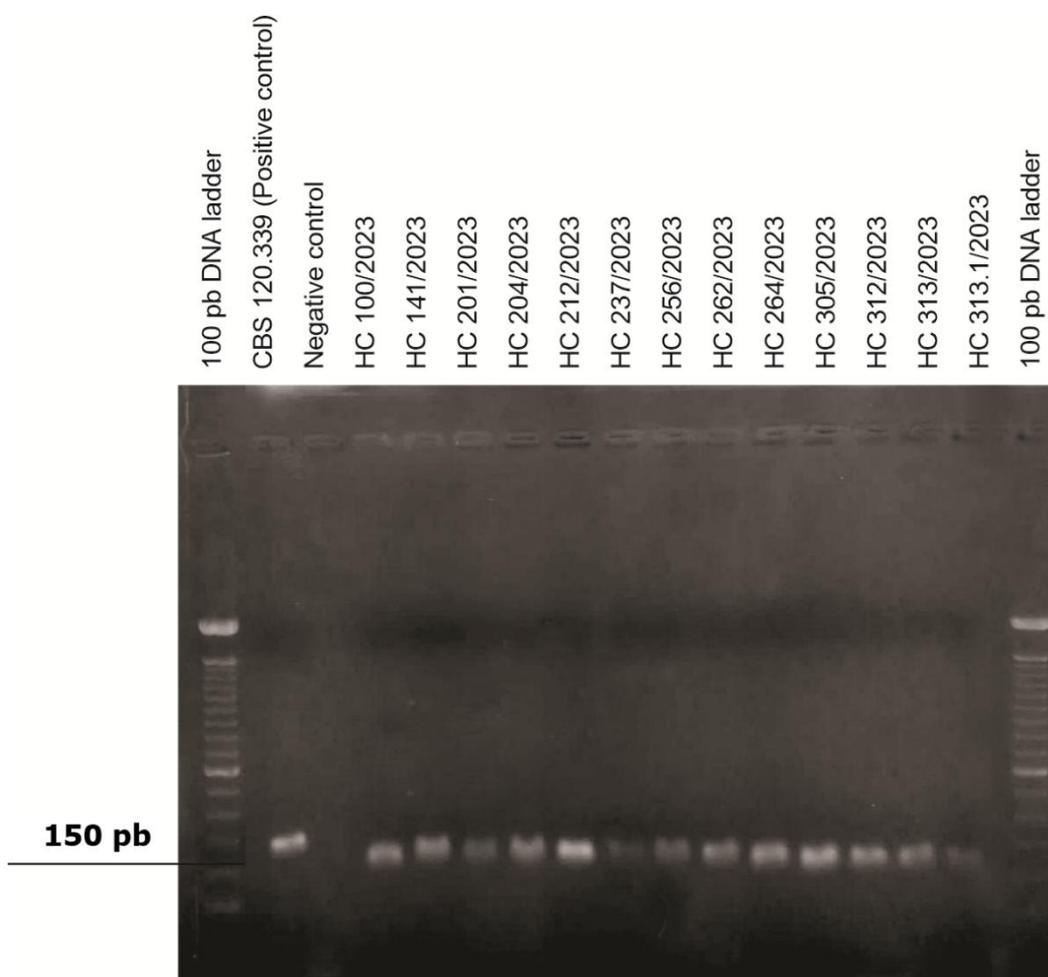


Figura 3: Produtos de Nested PCR em gel de agarose. Da esquerda para a direita 1: Marcador molecular DNA ladder 1 kb; 2: Controle positivo (cepa CBS 120339 (antiga IPEC 16490)); 3: Controle negativo; 4: HC100/2023; 5: HC141/2023; 6: HC201/2023; 7: HC204/2023; 8: HC212/2023; 9: HC237/2023; 10: HC256/2023; 11: HC262/2023; 12: HC264/2023; 13: HC305/2023; 14: HC312/2023; 15: HC313/2023 16: HC HC313.1/2023. O produto de PCR aninhado é um amplicon de 152pb.

É importante ressaltar que em um dos casos de esporotricose sistêmica obtivemos duas amostras clínicas, sendo uma de fragmento de tecido cutâneo (ID: HC313/2023) e outra de exsudado de pele (ID: HC313.1/2023). Na amostra HC313/2023 houve o isolamento de *Sporothrix* em ágar mycosel, em contrapartida o fungo não cresceu na amostra proveniente do exsudato de pele. Apesar disso, ambas as amostras foram positivas no protocolo de Nested PCR, conforme a Figura 3.

Com base nesses resultados, o protocolo de Nested PCR se mostra como uma alternativa diagnóstica capaz de proporcionar um diagnóstico rápido uma vez que pode ser aplicado diretamente em amostras clínicas, excluindo-se a necessidade de culturas demoradas. Como resultado, é possível um diagnóstico precoce e um tratamento confiável aos pacientes, especialmente em pacientes imunocomprometidos como os que fizeram parte da nossa amostra.

Por fim, destaca-se que outra vantagem da Nested PCR é a rapidez na identificação, uma vez que o protocolo é concluído em seis horas, o que reduz drasticamente o tempo de espera para o diagnóstico a partir da cultura. Além disso, nossos resultados mostraram que a Nested PCR demonstra eficiência mesmo em amostras desafiadoras, como exsudato e secreção conjuntival que podem estar sujeitas a alto índice de contaminação por outros microrganismos, pois não são provenientes de sítios esteireis. Como limitação do estudo, destacamos a falta de informação nos prontuários, o que pode comprometer uma análise precisa.

7. DISCUSSÃO

O diagnóstico micológico da esporotricose é desafiador, visto que as técnicas são demoradas, podendo levar 2 a 3 semanas para serem concluídas. Como consequência, o atraso no diagnóstico pode resultar em agravamento da doença e maior tempo de internação (MARIMON *et al.*, 2007; MAUBON *et al.*, 2022). Portanto, há necessidade de métodos mais rápidos para determinar a presença do fungo do que a cultura micológica. A partir disso, nosso estudo apresenta o ensaio de como uma estratégia capaz de oferecer um diagnóstico rápido, uma vez que o protocolo é concluído em seis horas e pode ser aplicado diretamente em amostras clínicas excluindo-se a necessidade de culturas demoradas.

A Nested PCR permite detectar a presença do fungo em curto período, com um protocolo que pode ser concluído em cerca de seis horas. Dessa forma, a incorporação dessa técnica proporciona maior rapidez e precisão na identificação da esporotricose, contribuindo para um manejo clínico mais eficiente. Com isso, é possível minimizar atrasos no início do tratamento, reduzindo conseqüentemente, o risco de infecções secundárias e prevenindo possíveis complicações decorrentes da progressão prolongada da doença (SCHECHTMAN *et al.*, 2022).

A respeito das vantagens da Nested PCR, os dados publicados mostram que a técnica permite a identificação de *Sporothrix* sp., a partir da cepa isolada em meio de cultura, de biópsia cutânea, tecido de camundongo e líquido cefalorraquidiano (HU *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2020). Considerando o variado espectro clínico da esporotricose e visando ampliar a aplicação desta técnica a diferentes tipos de amostras, incluímos em nossos experimentos fragmento de tecido, exsudato de pele e secreção conjuntival.

Orofino-costa e colaboradores (2022) relataram que amostras de pus e biópsias são as mais adequadas para o diagnóstico de esporotricose. Portanto, incluímos amostras de fragmento de tecido, exsudatos de pele e secreções conjuntivais em nossos experimentos (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). A decisão de incluir secreções conjuntivais se deve ao surgimento de casos de conjuntivite granulomatosa causada por *Sporothrix* sp. no Nordeste do Brasil. Além disso, até onde sabemos, a técnica de Nested PCR nunca foi usada

anteriormente para detectar DNA de *Sporothrix* sp. em uma amostra ocular (NETO *et al.*, 2023; SILVA-NETO *et al.*, 2023).

Em nosso estudo, foram incluídos 12 pacientes com idade média de 44 anos e predomínio do sexo masculino. Um estudo sobre as características epidemiológicas da expansão da esporotricose humana em Pernambuco, evidenciou idade média independente do sexo de 42,7. Do mesmo modo, um estudo realizado em pacientes com esporotricose no Rio Grande do Sul, 41,0% dos participantes tinham entre 25 a 60 anos e 54,0% eram do sexo masculino (DE MORAES *et al.*, 2023). Apesar da esporotricose acometer qualquer pessoa independentemente da idade, os adultos são mais acometidos devido às maiores exposições ocupacionais e zoonóticas. Contudo, em termos de sexo, a maioria dos estudos tem demonstrado que as mulheres estão mais envolvidas, pois em geral, lidam com a tarefa de cuidar dos animais domésticos (OROFINO-COSTA *et al.* 2017). Por isso, a discrepância em nosso estudo pode ter sido ocasionada pelo pequeno número de participantes.

Com relação ao endereço dos nossos participantes, a maioria residia na RMR reafirmando a mudança na distribuição da doença que antes era rural, mas agora se tornou uma doença urbana associada à transmissão zoonótica (ALMEIDA-SILVA *et al.*, 2022). Quanto a ocupação dos pacientes, nossos dados mostram que as mulheres responsáveis pelo trabalho domiciliar configuram-se como um grupo de risco. Isso porque é uma população com maior tempo de permanência no lar, conseqüentemente, tornam-se responsáveis pelos cuidados dos animais domésticos, logo, mais expostas a arranhaduras e mordeduras (OROFINO-COSTA *et al.* 2017).

Como consequência do maior contato entre os gatos e seus proprietários, houve um aumento da esporotricose zoonótica. Neste sentido, nossos dados sugerem que frequentemente a propagação do fungo ocorre por meio de arranhadura e/ou mordedura de animais contaminados. A transmissão zoonótica pelo contato com felinos é considerada a principal causa da esporotricose humana em Pernambuco, com 179 casos ocorridos entre 2017 a 2019 (SILVA *et al.* 2021). Porém, vale ressaltar que esta doença também pode ocorrer por implantação traumática decorrente de práticas de jardinagem, devido à presença de propágulos fúngicos no ambiente (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

Clinicamente, a esporotricose é uma micose multifacetada e tal diversidade tem sido atribuída ao modo de implantação do fungo, ao tamanho e profundidade do inóculo, à virulência da cepa e ao status imunológico do hospedeiro (SCHECHTMAN *et al.*, 2022). Diante disso, as manifestações clínicas variam desde lesões cutâneas até as formas mucosas, imunorreativas e disseminadas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). Em nosso estudo, 33,3% dos pacientes foram diagnosticados com esporotricose disseminada, enquanto aproximadamente 61% apresentaram nódulos e úlceras como os principais tipos de lesões. Esses achados demonstram a diversidade das manifestações clínicas da doença, o que reforça a importância de um diagnóstico ágil e preciso.

Corroborando essa variabilidade clínica, uma revisão da literatura sobre os sinais e sintomas de 178 casos humanos de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisas Evandro Chagas, no Rio de Janeiro, entre 1998 e 2001, revelou que 55,6% (n=45/178) dos pacientes apresentaram a forma clínica linfocutânea da esporotricose. Além disso, os autores destacam que as lesões manifestaram-se de diferentes formas, incluindo nódulos, tubérculos, pústulas, cistos, gomas, úlceras, lesões ulcerovegetantes, verrucosas e placas, podendo ou não estar associadas à linfangite. Esses dados reforçam a heterogeneidade da doença e a necessidade de abordagens diagnósticas sensíveis para uma identificação precoce (LOPES-BEZERRA, SCHUBACH, OROFINO-COSTA, 2006).

Em geral, a forma clínica disseminada está quase sempre associada a algum tipo de imunossupressão como, alcoolismo, ao uso de drogas ilícitas, ao uso de imunossupressores ou à imunodeficiência secundária, como o HIV/Aids (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). Acerca disso, o HIV esteve associado a todos os casos de esporotricose disseminada em nosso estudo. Da mesma forma, a coinfeção entre HIV e esporotricose tem se destacado no estado do Rio de Janeiro. Uma análise retrospectiva entre 1999 e 2015 identificou 75 hospitalizações por esporotricose, das quais, 38,7% (n=29/75) eram em pessoas vivendo com HIV/Aids (PVHA) (FALCÃO *et al.* 2020).

Além do HIV, outra condição clínica comum em nossos participantes foi a HAS. Nesse contexto, a hipertensão é considerada um fator de risco que aumenta a progressão da esporotricose, podendo dificultar o tratamento, resultando em pior prognóstico (RABELLO *et al.*, 2022). Quanto à localização das lesões, nossos resultados são consistentes com a maioria dos dados na

literatura, indicando que as lesões ocorrem principalmente nos membros superiores. Acredita-se que isso esteja relacionado a traumas causados por material vegetal e arranhões ou mordidas de gatos permitindo a implantação do fungo (BENVEGNÚ *et al.*, 2020).

O diagnóstico da esporotricose é realizado pela correlação entre dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais. Com relação aos métodos laboratoriais, o exame micológico direto é uma estratégia de baixa sensibilidade e especificidade para a esporotricose humana (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022). Por outro lado, a cultura de material tecidual e de exsudato para isolamento fúngico é o método padrão-ouro para diagnóstico da doença (RODRIGUES *et al.*, 2020).

Em meios de cultura como ágar Sabouraud dextrose e ágar Mycosel incubados à temperatura ambiente (25° a 30° C), as colônias de *Sporothrix* sp. são visíveis dentro de 3 a 6 dias em amostras de lesões cutâneas e em outros materiais extracutâneos entre 10 a 19 dias, no entanto, o tempo de crescimento pode variar dependendo da espécie envolvida (RODRIGUES *et al.*, 2020). Além disso, a frequência de agentes contaminantes provenientes da amostra clínica ou do ambiente e a baixa carga fúngica em amostras de determinados sítios corpóreos, podem inviabilizar a identificação do patógeno investigado (DOERN *et al.*, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Neste sentido, os métodos moleculares surgem como estratégia revolucionária para superar tais problemas e acelerar o diagnóstico da esporotricose. Em geral, a análise molecular inclui amplificação por PCR, seguida de sequenciamento de DNA (DE CARVALHO *et al.*, 2022). Este último é o método de referência para diferenciação de espécies, podendo também avaliar a diversidade genética e a estrutura populacional do fungo, auxiliando na identificação de rotas de transmissão e disseminação de agentes emergentes como o *S. brasiliensis* (OROFINO-COSTA *et al.*, 2022).

A amplificação de DNA é baseada na amplificação de um marcador universal como a região do espaçador interno transcrito (*Internal Transcribed Spacer* - ITS) ou em uma combinação de regiões codificadoras de proteínas. Estas por sua vez, servem para explorar a diversidade genética, sendo úteis na diferenciação entre as espécies, com base no sequenciamento parcial do gene calmodulina (CAL), β -tubulina (BT2), fator de alongamento de translação (EF-

1 α) e quitina sintase (CHS1) (DE CARVALHO *et al.*, 2022). Em nossos experimentos a avaliação filogenética por sequenciamento parcial do gene CAL reafirmou que *S. brasiliensis* é a cepa protagonista da epidemia de esporotricose transmitida por gatos (RODRIGUES *et al.*, 2022).

No que se refere a caracterização filogenética, a região entre os exons 3 e 5 do gene CAL é o marcador molecular mais utilizado para identificar espécies clinicamente relevantes do gênero *Sporothrix* (RODRIGUES *et al.*, 2022). Um exemplo disso é o estudo de Rodrigues e colaboradores (2014) aplicando sequenciamento parcial do gene CAL em uma RFLP-PCR, mostrando que após amplificação parcial do gene CAL, o amplicon é digerido com a enzima *HhaI*, resultando em cinco perfis de restrição distintos (espécie-específicos), representando todas as espécies de relevância clínica (RODRIGUES; DE HOOG G.S; DE CARMARGO 2014).

Portanto, o diagnóstico molecular da esporotricose complementa e substitui gradualmente os ensaios micológicos clássicos, pois fornecem resultados rápidos e precisos, são capazes de distinguir espécies, promovem programas de vigilância e permitem uma avaliação mais fidedigna da expansão do fungo. Apesar dos resultados vantajosos, vale ressaltar que poucos métodos permitem a detecção do DNA do *Sporothrix* diretamente de amostras clínicas ((HU *et al.*,2003; HAYASHI *et al.*, 2019; DE CARVALHO *et al.*, 2022).

Nesses casos, a Nested PCR se apresenta como estratégia promissora para investigação da esporotricose tendo em vista que é um método capaz de detectar DNA de *Sporothrix* a partir de culturas, mas também, em amostras biológicas (HU *et al.*,2003). Acerca disso, Hayashi e colaboradores (2019) aplicaram este ensaio para diagnóstico em nível de gênero em amostras de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina (FFPE) de pacientes com esporotricose cutânea confirmada pelo isolamento de *Sporothrix* em cultura. Como resultado, o valor diagnóstico da Nested PCR, apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,7% (HAYASHI *et al.*, 2019).

Recentemente, Luiz e colaboradores (2022) também aplicaram o mesmo protocolo de Nested PCR em amostras de tecidos FFPE de gatos com esporotricose, usando protocolo de extração de DNA térmica e química. A avaliação mostrou que a extração química utilizando cortes de parafina de 5 μ m foi mais eficiente para a extração de DNA do *Sporothrix*. Além disso, os autores

relataram que a Nested PCR apresentou sensibilidade de 50% e especificidade de 100%, tornando-se um método que pode ser utilizado para detecção do *Sporothrix* (LUIZ *et al.*,2021).

A principal vantagem desse ensaio é a sua capacidade em detectar fragmentos de DNA, a partir de poucas UFCs e diretamente de amostras biológicas. Um exemplo disso é o estudo de HU e colaboradores (2003) que mostrou alto grau de sensibilidade obtendo um limite de detecção de 40 fg de DNA a partir de cepas isoladas de cultura e em amostras biológicas (HU *et al.*, 2003). Nossos experimentos também sugerem alta sensibilidade, visto que a Nested PCR foi capaz de detectar *Sporothrix* em uma amostra de pele que não apresentou crescimento em cultura.

A ausência de crescimento de *Sporothrix* em cultura pode ser justificada pela baixa carga fúngica evidenciada através da quantificação de DNA. Da mesma forma, Oliveira e colaboradores (2020) utilizaram a Nested PCR para detectar *Sporothrix* em amostras de líquido cefalorraquidiano de pacientes em que não foi possível recuperar o fungo em meios de cultura. Após identificar o *Sporothrix sensu lato* nas amostras testadas, os autores afirmam que o método utilizado é uma nova abordagem para o diagnóstico da esporotricose, sendo capaz de proporcionar um tratamento precoce (OLIVEIRA *et al.*,2020).

Apesar dos resultados satisfatórios, é importante enfatizar que a amplificação de fragmento do gene 18S do rRNA por Nested PCR apresenta limitações como a incapacidade de distinguir entre espécies como visto em nossas amostras onde obteve-se a presença de *Sporothrix sensu lato*. Nesse sentido, a definição de espécies depende do desenvolvimento de novas estratégias moleculares, como o desenho de primers espécie-específico, que podem servir como alvos para novas pesquisas. Além disso, podem ocorrer resultados falsos positivos devido contaminação do amplicon (OLIVEIRA *et al.*,2020; DE CARVALHO *et al.*, 2022). Não somente isso, mas também, o tamanho limitado da amostra e a ausência de dados nos prontuários podem ter prejudicado a análise estatística.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mapeamento clínico-epidemiológico dos pacientes envolvidos na pesquisa evidenciou que os casos de esporotricose em Pernambuco apresentam características similares a de surtos descritos em outras regiões do país. Dentre os aspectos comuns, se destacam: maior acometimento de adultos, em virtude de traumas sofridos durante o cuidado dos animais domésticos, a associação da coinfeção da esporotricose e o HIV acarretando pior prognóstico, dentre outras.

O diagnóstico micológico a partir do isolamento de *Sporothrix* em meios de cultura oferecem resultados confiáveis, contudo, podem levar semanas para serem concluídos. Neste cenário otimizar os métodos diagnósticos para uma identificação mais rápida é primordial para um tratamento precoce.

Neste cenário os métodos moleculares complementam e estão gradualmente substituindo os ensaios micológicos tradicionais. Neste sentido, a análise molecular demonstrou que *S. brasiliensis* continua a ser principal espécie responsável pelos casos de esporotricose em Pernambuco, devido à transmissão zoonótica.

Em áreas hiperendêmicas como a América Latina, métodos diagnósticos rápidos e preciso, como a Nested PCR são cada vez mais necessários. Isto porque, oferecer um diagnóstico rápido e preciso, sobretudo, em regiões endêmicas permite uma resposta mais rápida das agências de saúde para controlar os surtos.

Além disso, o método apresentado neste estudo se destaca como uma ferramenta promissora para detecção de *Sporothrix* sp. diretamente em amostras clínicas, além disso, a metodologia pode ser aplicada em diversos materiais biológicos.

A partir disso, a implementação dessa técnica diretamente em amostras clínicas juntamente com um método que identifique em nível de espécie pode proporcionar um diagnóstico precoce e um tratamento confiável aos pacientes, sobretudo, em pacientes imunocomprometidos como os que fizeram parte da nossa amostra.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SILVA, F. *et al.* Beyond Domestic Cats: Environmental Detection of *Sporothrix brasiliensis* DNA in a Hyperendemic Area of Sporotrichosis in Rio de Janeiro State, Brazil. **Journal of fungi**, v. 8, n. 6, p. 1-11, 2022.
- BARROS, M.B.L.; ALMEIDA PAES R.; SCHUBACH, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clin Microbiol Rev.** v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.
- BENVEGNÚ, A.M. *et al.* Case series of sporotrichosis at a teaching hospital in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 53, p. e20190509, 2020.
- BERNARDES-ENGEMANN A.R. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Med Mycol.** v. 43 n. 6, p. 487-493, 2005.
- BONIFAZ A, TORIELLO C, ARAIZA J, RAMÍREZ-SOTO MC, TIRADO-SÁNCHEZ A (2018) Sporotrichin Skin Test for the Diagnosis of Sporotrichosis. *J Fungi (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/JOF4020055>
- CHAKRABARTI, A. *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Med Mycol**, v.53, n. 1 p. 3-14, 2015.
- CONCEICAO-SILVA, F.; MORGADO, F.N. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. **J Fungi (Basel)**. v. 4, n. 3 (89), 2018.
- COSTA RO, DE MESQUITA KC, DAMASCO PS, BERNARDES-ENGEMANN AR, DIAS CMP, SILVA IC, *et al.* Infectious arthritis as the single manifestation of sporotrichosis: serology from serum and synovial fluid samples as an aid to diagnosis. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25:54–6.
- COSTA, F.; MARTÍNEZ, C.; AZULAY, L. PLECT: enfermedades tropicales de manifestación verrucosa. **Rev. chil. Dermatol.** v. 34, n. 3, p. 89-94, 2018.
- DA SILVA ARRUDA, F.; DA SILVA FILHO, J.L.Q.; NETO, J.C.S. Principais técnicas de biologia molecular para detecção genotípica do Papiloma Vírus Humano (HPV): revisão da literatura. **Revista Multidisciplinar do Sertão**, v. 1, n. 2, p. 303-311, 2019.
- DE CAROLIS, E.; POSTERARO, B.; SANGUINETTI, M. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 297, 2022.

DE CARVALHO, J.A. *et al.* Trends in Molecular Diagnostics and Genotyping Tools Applied for Emerging *Sporothrix* Species. **J Fungi (Basel)**, v.8, n.8, p.809, 2022.

DE MEYER, E.M. *et al.* Taxonomy and Phylogeny of New Wood- and Soil-Inhabiting *Sporothrix* Species in the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* Complex. **Mycologia**. v.100, n.4, p. 647–661, 2008.

DE MORAES, P.C. *et al.* Clinical-epidemiological characteristics of Sporotrichosis cases in Rio Grande do Sul, Brazil: a 16-year study. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 6, n. 4, p.14568–14577, 2023.

DOERN, G. V. *et al.* Practical guidance for clinical microbiology laboratories: a comprehensive update on the problem of blood culture contamination and a discussion of methods for addressing the problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. e00009-19, 2019.

FALCÃO, E.M.M. *et al.* Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. **Med Mycol**. v. 58, n.1, p. 141-143, 2020.

FREITAS, D.F.S. *et al.* Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2015.

GÓES-NETO, A. *et al.* DNA extraction from frozen field collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p.19-32, 2005.

HAYASHI, S.; *et al.* Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. **Mycoses**, v. 62, p.1148–1153, 2019.

HEKTOEN, L.; PERKINS, C.F. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **J. Exp. Med.** v. 5, n. 1, p. 77–91, 1900.

HU S. *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **J Clin Microbiol**. v. 41, n. 4, p. 1414-1418, 2003.

LACAZ, C.S., *et al.* **Tratado de micologia médica**. 9. Ed., São Paulo: Sarvier, 2002. p. 1104.

LOPES-BEZERRA LM, SCHUBACH A, OROFINO-COSTA R. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 78 (2):293-298. 2006.

LOPES-BEZERRA, L. *et al.* Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.12, n. 3. 2018.

LUIZ, R.L.F. *et al.* Nested PCR for the Diagnosis of Feline Sporotrichosis From Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples Using Different DNA Extraction Protocols. **Front Vet Sci.** v. 5, n. 8, p. 755897, 2021.

LUTZ, A.; SPLENDORE, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. **Rev. Med.** v. 21, p. 433–450, 1907.

MAHAJAN, V.K. *et al.* Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. **Mycoses**, v. 48, n. 1, pp. 25–31, 2005.

MARIMON, R. *et al.* *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **J Clin Microbiol.** v. 45, n. 10, p. 3198-3206, 2007.

MAUBON, D. *et al.* Molecular Diagnosis of Two Major Implantation Mycoses: Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 4, p. 382, 2022.

MORRIS-JONES R. Sporotrichosis. **Clin Exp Dermatol.** v. 27, n. 6, p. 427-431, 2002.

NETO F.B.D.S. *et al.*. Dog-transmitted ocular sporotrichosis. **J Mycol Med.** 2023 Mar;33(1):101335. doi: 10.1016/j.mycmed.2022.101335.

OLIVEIRA, M. M. E. *et al.* A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: mycological, molecular, and virulence analyses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 144, p. 1-13, 2019.

OLIVEIRA, M.M.E. *et al.* Cerebrospinal fluid PCR: A new approach for the diagnosis of CNS sporotrichosis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 14, n. 7, p. e0008196, 2020.

OLIVEIRA, M.M.E. *et al.* Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Res Microbiol.** v.166, n. 2, p. 102-110, 2015.

OLIVEIRA, M.M.E. *et al.* Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS Microbiol Lett.** v. 362, n. 6, p. fnv027, 2015.

OROFINO-COSTA R. *et al.* Esporotricose humana: recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. **An Bras Dermatol.** v. 97, n. 6, p. 757-777, 2022.

OROFINO-COSTA R. *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **An Bras Dermatol.** v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. **Boletim Epidemiológico Esporotricose Humana | Nº 01/2021.** Recife, PE: Secretaria Estadual de Saúde, 2021. 3p.

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

RABELLO, V.B.S. *et al.* The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: a Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020. **Braz J Microbiol.** v. 53, n.1, p. 231-244, 2022.

RAMÍREZ-SOTO, M., *et al.* Ecological Determinants of Sporotrichosis Etiological Agents. **J. Fungi (Basel).** v. 4, n. 3 (95), 2018.

RODRIGUES, A.M *et al.* Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 78, n. 4, p. 383-387, 2014.

RODRIGUES, A.M. *et al.* Current Progress on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment of Sporotrichosis and Their Future Trends. **J Fungi (Basel).** v. 8, n. 8, p. 776, 2022.

RODRIGUES, A.M. *et al.* Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases.** v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015b.

RODRIGUES, A.M. *et al.* Rapid Identification of Emerging Human-Pathogenic *Sporothrix* Species with Rolling Circle Amplification. **Front Microbiol.** v .8, n. 6, p. 1385, 2015.

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

ROSSOW, J.A. *et al.* One Health Approach to Combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative Review of an Emerging Zoonotic Fungal Pathogen in South America. **Journal of Fungi,** v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

SCHECHTMAN, R.C. *et al.* Sporotrichosis: hyperendemic by zoonotic transmission, with atypical presentations, hypersensitivity reactions and greater severity. **Anais Brasileiros de Dermatologia.** v. 97, n. 1, p. 1-13, 2022.

SCHENCK B. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. **Bull Johns Hopkins Hosp.** v. 240, n. 93, p. 286-290, 1898.

SILVA NETO F, *et al.* Case Report: Ocular Sporotrichosis-A Seven-Case Series. **Am J Trop Med Hyg.** 2023 May 15;108(6):1109-1114. doi: 10.4269/ajtmh.22-0501.

SILVA, C.E. *et al.* Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. **Future Microbiol.** v. 16 p. 1371-1379, 2021

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 Rep.** v. 6, n. 10, p. 988-992, 2020.

XU, T.H. *et al.* Identification of *Sporothrix schenckii* of various mtDNA types by nested PCR assay. **Medical Mycology**, v. 48, n. 1, p. 161-165, 2010.

ZHANG, S. *et al.* Complete mitogenome mitogenome of the entomopathogenic fungus *Sporothrix insectorum* RCEF 264 and comparative mitogenomics in Ophiostomatales. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 103, n. 14, p. 5797-5809, 2019.

ZHANG, S. *et al.* Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. **PLoS Negl Trop Dis.** v.13, n. 2, p. e0007219, 2019.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Convidamos você ou a pessoa sob sua responsabilidade a participar como voluntário da pesquisa “IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA”, que está sob responsabilidade da pesquisadora **AMANDA GABRIELA DA SILVA** (Aluna de Mestrado no Departamento Medicina Tropical - Hospital das Clínicas - Térreo do HC/UFPE. Av. Prof. Moraes Rego - s/n. 50670-901 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 55670-901, celular (81) 98476-1427, email: amanda.gabrielasilva@ufpe.br), sob a orientação do Professor Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, email: reginaldo.limant@ufpe.br e coorientação do Professor Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira, email: manoel.marques@ioc.fiocruz.br

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

A pesquisa tem como objetivo aplicar um ensaio molecular para detecção e identificação rápida do fungo *Sporothrix* sp. diretamente a partir de amostras clínicas de fragmento de tecido ou secreção conjuntival através da técnica Nested PCR.

Ao participar da pesquisa, você ou a pessoa sob sua responsabilidade seguirá as seguintes etapas: 1) Será examinado pela equipe de dermatologistas do ambulatório de dermatologia do Hospital das Clínicas HC/EBSERH/UFPE; 2) Será encaminhado para a sala de coleta da amostra clínica, nesse momento será realizada uma entrevista para coleta de informações pessoais, sociodemográfica e clínicas, em seguida coleta do material; 3) Irá coletar amostras do fragmento de tecido da ferida cutânea através do punch dermatológico ou nos casos de acometimento ocular, será coletado secreção conjuntival. Este material será manipulado e caracterizado nas dependências do laboratório de micologia médica e posteriormente no Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro. Esta etapa é necessária para confirmar o diagnóstico e orientar o tratamento adequado para a doença.

Acerca dos riscos e desconfortos no momento da coleta, você poderá sentir desconforto durante o procedimento, todavia, serão adotados métodos que minimizem tais riscos. Além disso, o procedimento será realizado por profissionais qualificados e habilitados do centro hospitalar. Quanto a coleta de dados, você poderá se sentir constrangido (a) em prestar informações quanto à sua doença. No entanto, visando amenizar tal situação, este atendimento será realizado de forma individual e em

ambiente reservado. Além do mais, seus dados pessoais e de identificação serão conhecidos apenas pela equipe de pesquisa e serão guardados em sigilo. Caso você venha a sentir algo fora desses padrões, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências.

Dentre os benefícios diretos destacam-se: os indivíduos envolvidos na pesquisa serão beneficiados diretamente com o diagnóstico do seu agente infeccioso, o que direcionará a um tratamento rápido e eficaz. Quanto aos benefícios indiretos, os resultados desta pesquisa poderão contribuir para a elaboração de estratégias públicas de combate e prevenção dos casos de esporotricose, uma vez que os dados estatísticos obtidos nortearão na identificação das populações e fatores de riscos, a fim de combatê-los de maneira mais efetiva.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados serão transferidos para um dispositivo eletrônico local, sendo apagado todo e qualquer registro das plataformas virtuais, ambiente compartilhado ou “nuvem”, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período mínimo de cinco anos.

Após leitura e disponibilização das informações, caso concorde em participar do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via é para você e a outra é para o pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado (a) de forma alguma. Garantimos que você tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase do estudo. Ressaltamos que a possibilidade de se recusar a participar deste estudo, no início ou em qualquer momento da realização do mesmo, não causará nenhum dano ou interferência em seu atendimento e tratamento no setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Em caso de dúvida sobre os aspectos éticos desta pesquisa, você pode consultar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC/EBSERH/UFPE), situado na Avenida Prof. Moraes Rego ,1235, 3º Andar, Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil CEP: 50670-901, e-mail: cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br;

AMANDA GABRIELA DA SILVA

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu,

_____ ,
fui informado (a) dos objetivos e da relevância da pesquisa proposta, de como será minha participação ou a participação da pessoa sob minha responsabilidade, dos procedimentos, riscos e benefícios decorrentes deste estudo “IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA”, declaro meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que as informações na investigação sejam utilizadas para fins científicos, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter toda a oportunidade de conversar e esclarecer as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar da pesquisa como voluntário (a).

Recife, ____ de _____ de _____.

(Nome do participante ou responsável pelo participante da pesquisa)

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário (a) em participar da pesquisa. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – FICHA PARA COLETA DE DADOS**FICHA DE COLETA DE DADOS**

DATA: ___/___/___

FICHA N.O: .

NOME: .

N° DO PRONTUÁRIO: _____ IDADE: _____ SEXO: _____ PESO: .

DATA DE NASC.: ___/___/___

SERVIÇO DE PROCEDÊNCIA: .

NATURALIDADE: _____ CIDADE: _____ ESTADO: .

ENDEREÇO: .

FONES: _____

PROFISSÃO: _____ ESTADO CIVIL: _____

FICHA DE COLETA DE DADOS

FOTOS: () SIM () NÃO

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

1) IDADE _____ ANOS

2) DATA DE NASCIMENTO: ___/___/___

- 3) SEXO: () FEM () MASC
- 4) ESCOLARIDADE: _____
- 5) PROCEDÊNCIA: _____ (NOME DA CIDADE OU ESTADO)
() ÁREA RURAL () ÁREA URBANA
- 6) OCUPAÇÃO _____
- 7) ATIVIDADES EM AMBIENTE RURAL, PERIURBANO OU SILVESTRE, TRABALHO OU LAZER:
() SIM () NÃO
- 8) POSSUI GATOS NA RESIDÊNCIA?
() SIM () NÃO
- 9) TEVE CONTATO COM GATOS DOENTES (COM FERIDAS)
() SIM () NÃO
- 10) ATIVIDADES DE JARDINAGEM OU TERRA NA RESIDÊNCIA, TRABALHO OU LAZER?
() SIM () NÃO

DADOS CLÍNICOS

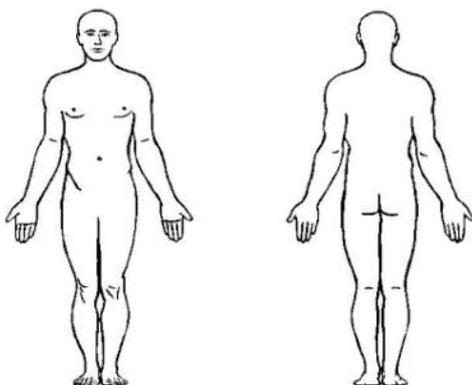
- 1) TEMPO DA LESÃO CUTÂNEA (ATÉ O DIAGNÓSTICO): _____
Data de início dos sintomas: ____/____/____

- 2) SÍTIO DA LESÃO PRIMÁRIA

() Face () Pescoço () MMSS () Abdome () MMII

Especificar: _____

- 3) TOPOGRAFIA DA LESÃO



DESCRIÇÃO:

4) HÁ LINFAGITE NODULAR OU LINFADENOPATIA REGIONAL?

SIM NÃO

5) ACOMETIMENTO DE MUCOSAS?

SIM NÃO

DESCRIÇÃO: _____

6) SINTOMAS SISTÊMICOS?

SIM NÃO

DESCRIÇÃO:

7) DOENÇAS ASSOCIADAS:

HIV

Hepatite B

Hepatite C

Etilismo

Outras condição imunossupressora: _____

8) COMORBIDADE

Cardiopatia

Nefropatia

Hepatopatia

HAS

DM

Outros: _____

DADOS QUANTO AO TRATAMENTO

() Itraconazol 100mg/dia () Iodeto de Potássio () Terbinafina ()
Anfotericina

() Outros:

DESCRIÇÃO: _____

Data do início da medicação:

DATA: ____/____/____

DATA: ____/____/____

DATA: ____/____/____

EXAMES COMPLEMENTARES

DATA	DESCRIÇÃO
	EXAME DIRETO
	CULTURA MICOLÓGICA
	HISTOPATOLÓGICO
	Nested PCR
	SÉRICOS

APÊNDICE C - TERMO DE COMPROMISSO E CONFIDENCIALIDADE

Título do projeto: Implementação do diagnóstico molecular por Nested PCR para esporotricose humana

Pesquisador responsável: Amanda Gabriela da Silva

Instituição/Departamento de origem do pesquisador: Universidade Federal de Pernambuco/Centro de Ciências Médicas

Telefone para contato: (81) 98476.1427

E-mail: amanda.gabrielasilva@ufpe.br

O pesquisador do projeto acima identificado assume o compromisso de:

- Garantir que a pesquisa só será iniciada após a avaliação e aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa envolvendo Seres Humanos e que os dados coletados serão armazenados pelo período mínimo de 5 anos após o término da pesquisa;
- Garantir que o acesso aos prontuários será realizado, exclusivamente, nas dependências do SAME com autorização do Setor, mesmo para os pesquisadores que possuem a senha do AGHUX (pesquisador interno), em conformidade ao Art.13 e seus parágrafos da Lei Geral de Proteção de Dados 13.853/2019.
- A senha do AGHUX é pessoal e intransferível, portanto, o pesquisador externo deve garantir que, jamais fará uso da senha de outrem para acesso aos prontuários.
- Preservar o sigilo e a privacidade dos voluntários, cujos dados serão estudados e divulgados apenas em eventos ou publicações científicas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificá-los;
- Garantir o sigilo relativo às propriedades intelectuais e patentes industriais, além do devido respeito à dignidade humana;
- Garantir que os benefícios resultantes do projeto retornem aos

participantes da pesquisa, seja em termos de retorno social, acesso aos procedimentos, produtos ou agentes da pesquisa;

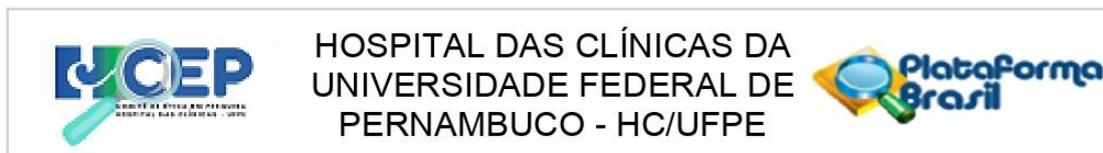
- Assegurar que os resultados da pesquisa serão anexados na Plataforma Brasil, sob a forma de Relatório Final da pesquisa;
- Reconhecer o HC/UFPE como detentor de direitos patrimoniais sob propriedade intelectual gerada no projeto acima citado e a ele relacionado, assegurando-lhe o direito de figurar como autor/inventor.
- Concordar com a porcentagem de participação a título de incentivo, prevista nas legislações em vigor, sobre dividendos oriundos da exploração da propriedade intelectual gerada.
- Indicar a vinculação ao HC/UFPE/Ebserh em todas as publicações de dados nele colhidas ou em trabalhos divulgados por qualquer outro meio, citando explicitamente o Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco/Ebserh.

Recife, 26 de maio de 2023

Amanda Gabriela

Amanda Gabriela da Silva

APÊNDICE D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (HC/UFPE)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA

Pesquisador: AMANDA GABRIELA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 5

CAAE: 71720323.8.0000.8807

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Medicina Tropical

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.639.734

Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda no projeto de pesquisa a ser conduzido pela mestrandia Amanda Gabriela da Silva, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, orientado pelo Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, coorientado pelo Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e terá como pesquisadora assistente Profa. Dra. Claudia Elise Ferraz Silva (HC-UFPE).

Conforme documento "JUSTIFICATIVA_EMENDA.docx, anexada a plataforma brasil 19/01/2024: "Eu Amanda Gabriela da Silva, responsável pelo projeto intitulado: "IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA", informo que a justificativa para a presente emenda é a alteração do CNPJ da instituição coparticipante da pesquisa. Anteriormente, constava o CNPJ: 33.781.055/0010-26 (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI / FIOCRUZ), contudo, o mesmo encaminhou a avaliação do projeto para o CEP do Instituto Oswaldo Cruz (CNPJ: 33.781.055/0012-98). Saliento que além disso, não houve demais alterações no projeto.

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2148520.pdf (23/12/2023). "Resumo: O diagnóstico padrão-ouro para esporotricose é o isolamento de Sporothrix sp. em meios de cultura, todavia, trata-se de um método demorado. Neste sentido, ensaios de Nested PCR têm se destacado como estratégia diagnóstica alternativa, devido à sua capacidade de

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO - HC/UFPE



Continuação do Parecer: 6.639.734

Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_RESPONSAB_NESTED_23_06_23.pdf	23/06/2023 01:34:57	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de concordância	ANUENCIA__GEP_23_06_23.pdf	23/06/2023 01:34:06	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_23_06.pdf	23/06/2023 01:23:20	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Orçamento	termo.pdf	26/05/2023 17:36:33	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Orçamento	Email_de_CNPq.pdf	26/05/2023 17:35:27	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Orçamento	DOC_FINANCIAMENTO_REGINALDO.pdf	26/05/2023 17:34:58	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	INTRUMENTO_COLETA_DE_DADOS.docx	25/05/2023 20:24:35	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_Nested_13_05_23.xlsx	25/05/2023 20:21:03	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lattes_Reginaldo.pdf	25/05/2023 20:20:34	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lattes_Manoel.pdf	25/05/2023 20:20:20	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lattes_Claudia.pdf	25/05/2023 20:20:07	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Lattes_Amanda_13_05_23.pdf	25/05/2023 20:19:54	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	VINCULO_PPG.pdf	25/05/2023 20:14:36	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

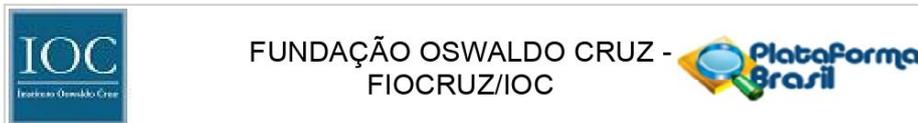
Não

RECIFE, 07 de Fevereiro de 2024

Assinado por:
Ana Caetano
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Professor Moraes Rego, 1235, Bloco C, 3º andar do prédio principal, Ala Norte, 1ª sala à esquerda do
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.670-901
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-3743 **E-mail:** cepsh.hc-ufpe@ebserh.gov.br

APÊNDICE E – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (IOC/Fiocruz)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA

Pesquisador: AMANDA GABRIELA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71720323.8.3003.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.657.858

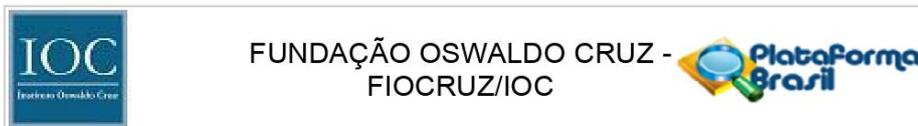
Apresentação do Projeto:

Trata-se de solicitação de emenda no projeto de pesquisa a ser conduzido pela mestranda Amanda Gabriela da Silva, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, orientado pelo Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical da UFPE, coorientado pelo Prof. Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira da Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e terá como pesquisadora assistente Profa. Dra. Claudia Elise Ferraz Silva (HC-UFPE).

Conforme documento "JUSTIFICATIVA_EMENDA.docx, anexada a Plataforma Brasil 22/01/2024, a pesquisadora Amanda Gabriela da Silva, responsável pelo projeto intitulado: "IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA, justifica que a presente emenda é a alteração do CNPJ da instituição coparticipante da pesquisa. Anteriormente, constava o CNPJ: 33.781.055/0010-26 (Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas - INI / FIOCRUZ), contudo, o mesmo encaminhou a avaliação do projeto para o CEP do Instituto Oswaldo Cruz (CNPJ: 33.781.055/0012-98). Saliento que, além disso, não houve demais alterações no projeto.

A esporotricose é uma infecção granulomatosa que apresenta o isolamento de *Sporothrix* sp. em meios de cultura como metodologia padrão-ouro para diagnóstico. Todavia, é um teste demorado, suscetível a contaminação e a depender da amostra biológica pode haver baixa carga fúngica (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011; OLIVEIRA et al., 2020). Em virtude da necessidade

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 - 7º andar, Campus Maré (antiga Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-361
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-1547 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 6.657.858

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	JUSTIFICATIVA_EMENDA.docx	22/01/2024 16:24:57	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_CEP_23_12_2023.docx	23/12/2023 18:14:32	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_NESTED_23_12_2023.pdf	23/12/2023 18:13:59	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_NESTED_23_12_2023.docx	23/12/2023 18:13:29	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_CEP_05_12_2023.docx	05/12/2023 19:12:14	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_NESTED_05_12_2023.pdf	05/12/2023 19:10:02	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_NESTED_05_12_2023.docx	05/12/2023 19:09:40	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NESTED_23_06_23.docx	23/06/2023 02:03:24	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_NESTED_23_06_23.pdf	23/06/2023 02:03:11	AMANDA GABRIELA DA SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 20 de Fevereiro de 2024

Assinado por:
Ximena Illarramendi
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Brasil 4036, sala 705 - 7º andar, Campus Maré (antiga Expansão)
Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-361
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-1547 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

ANEXO A – CARTA DE ANUÊNCIA DO SERVIÇO DE DERMATOLOGIA (HC/EBSERH/UFPE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES

CARTA DE ANUÊNCIA

Recife, 10 de junho de 2023.

Eu, Profª Dra. Maria de Fátima de Medeiros Brito, Chefe do Serviço de Dermatologia, declaro para os devidos fins que concordamos com a realização do projeto de pesquisa intitulado “**IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA**”, que será desenvolvido por Amanda Gabriela da Silva, par fins de dissertação no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical do CCM/UFPE, e orientado pelo Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Professor Adjunto da área de Medicina tropical, do Centro de Ciências Médicas, sob Regime de Dedicção Exclusiva, SIAPE 2036711 e coorientação do Professor Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da resolução 466/2012 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados dos participantes da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - UFPE-EBSERH
Dra. Fátima Brito
Dermatologista - CRM 10.329
Chefe do Serviço de Dermatologia

Profª Dra. Maria de Fátima de Medeiros Brito

ANEXO B – CARTA DE ANUÊNCIA DO LABORATÓRIO DE TAXONOMIA, BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO/Fiocruz-RJ



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FILIAL DA EMPRESA BRASILEIRA DE SERVIÇOS HOSPITALARES

CARTA DE ANUÊNCIA

Recife, 20 de junho de 2023.

Eu, Profª Dra. Aurea Maria Lage de Moraes, Chefe do Laboratório de Taxonomia, Bioquímica e Bioprospecção de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, declaro para os devidos fins que concordamos com a realização do projeto de pesquisa intitulado **“IMPLEMENTAÇÃO DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR POR NESTED PCR PARA ESPOROTRICOSE HUMANA”**, que será desenvolvido por Amanda Gabriela da Silva, par fins de dissertação no Programa de Pós-graduação *stricto sensu* em Medicina Tropical do CCM/UFPE, e orientado pelo Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Professor Adjunto da área de Medicina tropical, do Centro de Ciências Médicas, sob Regime de Dedicção Exclusiva, SIAPE 2036711 e coorientação do Professor Dr. Manoel Marques Evangelista de Oliveira.

Esta autorização está condicionada ao cumprimento do (a) pesquisador (a) aos requisitos da resolução 466/2012 e suas complementares, comprometendo-se a utilizar os dados dos participantes da pesquisa, exclusivamente para os fins científicos, mantendo o sigilo e garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades.

Documento assinado digitalmente
gov.br AUREA MARIA LAGE DE MORAES
Data: 20/06/2023 13:51:08-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Profª Dra. Aurea Maria Lage de Moraes

ARTIGO

IMPLEMENTATION OF MOLECULAR DIAGNOSIS FOR SPOROTRICHOSIS IN A REFERENCE CENTER IN BRAZIL

Amanda Gabriela da Silva^{1,2}, Arthur Felipe Cavalcanti de Matos², Bruna Rodrigues de Sousa^{1,2}, Claudia Elise Ferraz³, Raul Leal faria Luiz⁴, Rejane Pereira Neves^{1,5}, Reginaldo Gonçalves de Lima-Neto^{1,2,3*}, Manoel Marques Evangelista Oliveira⁴.

¹ Postgraduate Program in Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, Federal University Federal of Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil, 50740-570.

² Laboratory for Research and Diagnosis in Tropical Diseases, UFPE.

³ Reference Dermatological Service, Hospital das Clínicas, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil, 50670-901.

⁴ Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro- RJ, CEP 21045-360, Brazil.

*Correspondence: reginaldo.limant@ufpe.br; Tel.: +55-81-2126-8580; Fax: +55-81-2126-8580

ABSTRACT:

The gold standard diagnosis of sporotrichosis is the isolation of *Sporothrix* sp. in culture media, but this is a time-consuming test that is susceptible to contamination and can be affected by the fungal load. Molecular methods such as nested PCR are gaining more ground in the management of several infections as they are tools for the rapid and accurate identification of microorganisms from pure cultures or directly from biological samples. This study aimed to apply a nested PCR molecular protocol for the rapid detection of *Sporothrix* spp. directly from clinical samples. Thirteen samples—six from skin biopsies, five from skin exudates, and two from conjunctival secretions—were obtained from patients diagnosed with sporotrichosis due to *S. brasiliensis*. Calmodulin gene sequencing identified all the isolates as *S. brasiliensis*. Nested PCR was able to detect all the *Sporothrix* sensu lato directly from clinical samples as well as the CBS 120339 reference strain. The nested PCR protocol stands out as a diagnostic alternative, as it allows the identification of *Sporothrix* spp. directly from clinical samples without the need for fungal isolation.

Keywords:

Sporothrix; nested PCR; skin biopsy; skin exudate; ocular secretion

1. Introduction

Sporotrichosis is a fungal disease with a global distribution that affects humans and animals. Most cases result from the traumatic inoculation of *Sporothrix* spp. propagules into the host's skin tissue via animal or environmental transmission [1,2]. In Brazil, this infection has become a public health challenge due to the increase in its incidence in several states, especially in the northeastern region [1]. In the state of Pernambuco, Northeast Brazil, the fungus has been responsible for more than 900 cases in animals and 450 cases in humans over the last five years [3,4,5].

The current epidemic of sporotrichosis in Pernambuco is the result of the high stray cat population and poor sanitary conditions, which facilitate the spread of the fungus [4]. Up to now, the gold-standard diagnosis of sporotrichosis is the isolation of *Sporothrix* spp. from culture media. However, it is a time-consuming test that is

susceptible to contamination, and the low fungal load in certain samples can hinder the growth of the fungus [6].

Delay in diagnosing this mycosis can lead to complications for the patient, such as longer antifungal therapy and a worsening of the disease. Thus, the use of molecular techniques has been gaining ground in the management of sporotrichosis, as they are tests based on the amplification of DNA fragments and are therefore able to quickly provide reliable results [7,8].

Among these methodologies, the use of nested PCR has emerged as a tool for the rapid and accurate identification of microorganisms from a few colony-forming units (CFU) of pure cultures and from samples of tissue fragments [8,9]. Nested PCR is a molecular method that generally involves two sequential amplification reactions and is used in situations where it is necessary to increase the sensitivity and/or specificity of the PCR [9]. There are no standardized nested PCR protocols for microbial identification directly from wound exudate and body secretions.

This study aimed to apply a molecular nested PCR protocol for the rapid detection and identification of *Sporothrix* spp. directly from clinical samples from patients followed at a sporotrichosis reference center in Northeast Brazil.

2. Methods

2.1. Sample Collection and Classical Mycological Diagnosis

Thirteen clinical samples from 12 patients were collected depending on the type of lesion, including six fragments of skin tissue, five exudates from cutaneous skin lesions, and two samples from conjunctival secretions. Tissue fragments were obtained with a dermatological punch (4 mm), and the exudate and conjunctival secretion samples were collected with sterile swabs pre-moistened with 0.9% sterile saline solution. All cases of sporotrichosis were followed and treated at the Dermatology Reference Service at the Hospital das Clínicas at the Federal University of Pernambuco between April and September 2023. Only patients with a diagnosis confirmed by the isolation of *Sporothrix* spp. by mycological culture were included. The fungus was isolated by sowing it onto Mycosel agar in Petri dishes incubated at 25–30 °C for up to 15 days.

A fragment of skin tissue from a patient positive for *Leishmania* spp. was used to evaluate specificity and the occurrence of cross-reactions. In addition, the DNA of a type strain of *S. brasiliensis* CBS 120339 (formerly IPEC 16490), was included as a positive control. To monitor possible contamination, reaction mixtures without DNA were performed in the nested PCR as a negative control.

2.2. DNA Extraction and Quantification from Clinical Samples and Strains

The DNA extraction for clinical samples was performed as described by Oliveira et al. [6], with modifications. Samples obtained through biopsy were macerated in a sterile saline solution. Then, 200 µL of each sample containing tissue fragment, lesion exudate, or conjunctival secretion was centrifuged for 5 min at 11,800x g to obtain pellets. DNA extraction was carried out using the QIAamp® DNA mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. After extraction, the extracted DNA was frozen at –20 °C. The DNA concentration was evaluated by spectrophotometric measurement of the absorbance at the 260 nm wavelength (NanoDrop™ 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

DNA extraction from the strains was performed using the commercial Wizard® Genomic DNA Purification kit. Briefly, fungal colonies were transferred to a DNA extraction tube containing glass beads, and then 300 µL of nuclear lysis solution was added. Afterward, the tubes were shaken at 5.5 m/s in a FastPrep instrument (BIO 101, Farmingdale, New York, NY, USA) and incubated at 65 °C for 15 min. Next, 100 µL of the protein precipitation solution was added, and then the mixture was shaken and centrifuged at 13,600× *g* for 5 min. The supernatant obtained was transferred to a new tube containing 400 µL of isopropanol. The new tube was homogenized by inversion and centrifuged at 13,600× *g* for 3 min. The supernatant was discarded, and 400 µL of 70% ethanol at room temperature was added and the sample centrifuged again. After centrifugation, the tube was inverted to completely remove the supernatant. The extracted DNA was resuspended in 50 µL of autoclaved Milli-Q water. DNA quantification was carried out on a NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

2.3. Molecular Identification by Partial Sequencing of Calmodulin

Briefly, the amplification of the Calmodulin (CAL) genomic region was carried out as described by Lima-Neto et al. [10] using the CL1 sense (5'-GA (GA) T (AT) CAA GGA GGC CTTCTC-3') and CL2A antisense (5'-TT TTG CATCATGAGTTGGAC-3') primers. The PCR was carried out in a Veriti™ 96-well thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with annealing at 60 °C for 45 s. The amplicons were purified using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA).

The sequences obtained from the CAL gene sequencing were edited using the BioEdit™ software, version 7.2.6.1, and submitted to a search for similar sequences using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Phylogenetic analyses were carried out using our sequences and reference sequences. The sequences were aligned using the MAFFT v.7 online interface (available at <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>, and accessed on 28 February 2024) and edited with MEGA V.11 software (available at <https://www.megasoftware.net/>, accessed on 28 February 2024). *Grosmannia sersens* (CBS 141.36) was used as an outgroup.

2.4. Nested PCR for Clinical Samples

The assay was carried out according to the method based on the amplification of 18S ribosomal RNA previously described by Luiz et al. [8]. The reaction was carried out with a ready-to-use PCR master mix 2X solution (Promega Corporation, Madison, WI, USA—Lot: 22332002). A final concentration of 100 ng of DNA was used in a total reaction volume of 50 µL. In the first-round PCR, 10 µM concentrations of the outer primers SS1 (5'-CTCGTTTCGGCACCTTACACG-3') and SS2 (5'-CGCTGCCAAAGCAACGCGGG-3') were used. The second-round PCR (nested PCR) was identical to the first-round PCR, except that 3 µL of the first reaction product and the internal primer pair SS3 (5'-ACTCACCAGGTCCAGACACGATG-3') and SS4 (5'-CGCGGGCTATTTAGCAGGTTAAG-3') were used. The PCR reaction was carried out according to the following conditions: 95 °C for 5 min, followed by 40 cycles at 95 °C for 1 min, 68 °C for 1 min, and 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% *w/v* agarose gels, and DNA fragments were stained with Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brazil—Lot: 160.919BT). The amplicons were visualized on a K33-333 LED transilluminator (KASVI, Paraná, Brazil). Furthermore, the time taken to perform this technique was calculated.

2.5. Ethical Aspects

The research was approved by the Human Research Ethics Committee (CEP) of the Hospital das Clínicas (HC/EBSERH/UFPE) under protocol CAAE: 71720323.8.0000.8807, as well as by the CEP of the Oswaldo Cruz Institute under protocol CAAE: 71720323.8.3003.5248.

3. Results

Direct examination was performed on seven samples (53.8%; $n = 7/13$). Among these, the presence of globular, oval, or elliptical yeast-like cells showing a halo following panoptic staining (**Figure 1A**) was observed in four samples. *Sporothrix* spp. cultures (**Figure 1B**) showed thin and hyaline septate mycelia with delicate conidiophores, finishing at an expanded denticulate vesicle at the apex and bearing the floral aspect (**Figure 1C**); these were recovered from Mycosel agar in 12 (92.3%) of the 13 samples included in the study. Only one sample of a skin fragment, from the patient who had two samples analyzed, was positive in mycological culture. Genotypic analysis by partial sequencing of the CAL gene was carried out on 12 isolated clinical strains of *Sporothrix*, identifying 100% of the isolates as *Sporothrix brasiliensis*, as shown in **Figure 2** and summarized in **Table 1**.

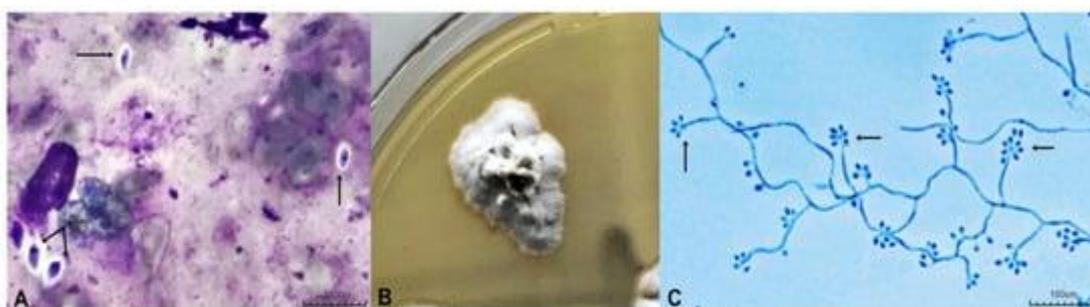


Figure 1. (A) Direct mycological examination showing yeast elliptical cells (arrows) with a panoptic halo; (B) *Sporothrix* spp. on Mycosel agar showing wrinkled, white colonies that gradually darkened to a blackish color; (C) Micromorphology, showing slender, septate mycelial filaments and conidiophores containing conidia with a “daisy-like” floral arrangement (arrow).

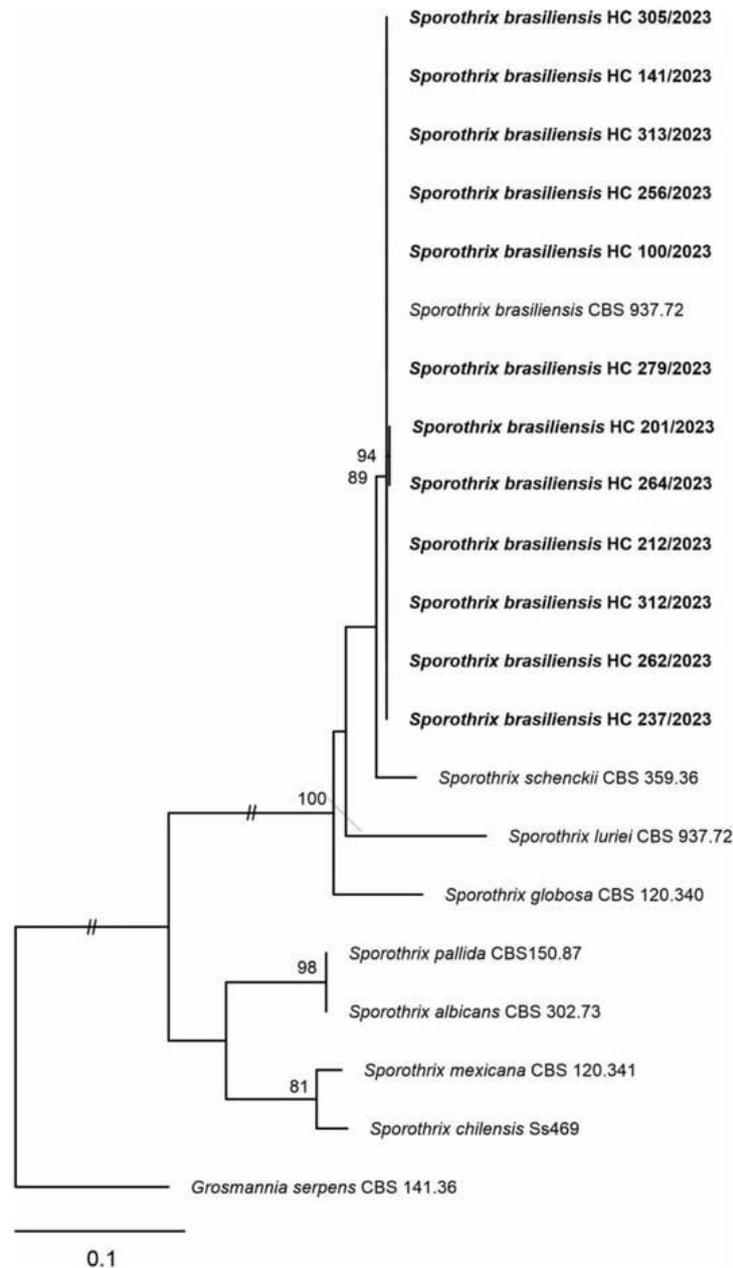


Figure 2. Phylogenetic tree of the genes encoding Calmodulin.

Table 1. Epidemiological and clinical laboratory findings of the patients diagnosed with sporotrichosis in a reference hospital in the state of Pernambuco, Brazil.

In this work, the molecular technique of nested PCR for the detection of *Sporothrix* spp. directly from clinical patient samples was evaluated for the first time in a dermatological reference center in the northeastern region of Brazil. The nested PCR methodology was able to detect the expected 152 bp fragment in all 13 clinical samples tested (**Figure 3**), suggesting the presence of *Sporothrix* sensu lato (**Table 1**). Given the absence of amplified product, no cross-reaction was observed in the nested PCR using the clinical sample of *Leishmania* spp. (**Figure 3**).

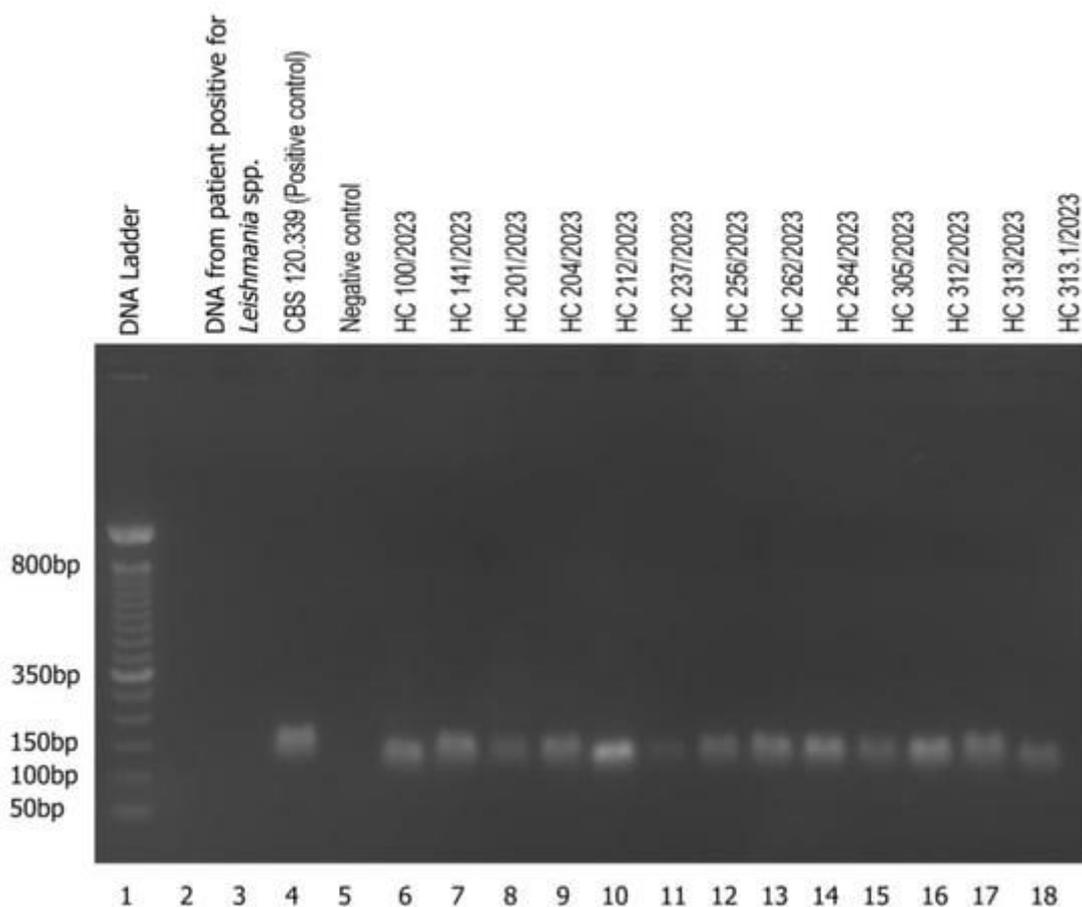


Figure 3. Nested PCR products on an agarose gel. From left to right: 1: Molecular marker DNA ladder, 50 bp (Invitrogen); 2: Empty well; 3: Cross-reaction evaluation with the *Leishmania* spp. sample; 4: Positive control (strain CBS 120339 (formerly IPEC 16490)); 5: PCR negative control (sterile water); 6: HC100/2023; 7: HC141/2023; 8: HC201/2023; 9: HC204/2023; 10: HC212/2023; 11: HC237/2023; 12: HC256/2023; 13: HC262/2023; 14: HC264/2023; 15: HC305/2023; 16: HC312/2023; 17: HC313/2023; 18: HC HC313. 1/2023. The nested PCR product is a 152 bp amplicon.

The time required to carry out the nested PCR protocol for each sample, from DNA extraction to the analysis of the PCR products, is described below: (1) DNA extraction = 20 min; (2) Quantification of DNA concentration and purity = 5 min; (3) DNA dilution = 5 min; (4) Preparation of the first PCR step = 10 min; (5) First PCR reaction = 135 min; (6) Preparation of the second PCR step = 10 min; (7) Second PCR reaction (Nested PCR) = 135 min; (8) Agarose gel electrophoresis = 120 min. The total procedure time was calculated to be 440 min (7.33 h).

The median age of the patients was 44.5 ± 16.2 years, with a predominance of males (58.3%; $n = 7/12$). Disseminated sporotrichosis was observed in 33.3% ($n = 4/12$) of the patients. Seven (58.3%; $n = 7/12$) patients reported having comorbidities, namely systemic arterial hypertension (SAH) in 57.1% ($n = 4/7$) and human immunodeficiency virus (HIV) in 42.9% ($n = 3/7$) of the patients. It is worth pointing out that all the patients with HIV developed the disseminated form of sporotrichosis. Contact with cats through scratching or biting was observed in nine (75.0%; $n = 9/12$) patients.

It is noteworthy that two clinical samples were obtained from one of the cases of disseminated sporotrichosis: one from a tissue fragment and the other from a skin

exudate. *Sporothrix* spp. was isolated from the tissue fragment by mycological culture, whereas the fungus from the skin exudate sample did not grow in culture. Despite this, both samples were positive in the nested PCR protocol, as shown in [Figure 3](#).

We assume that the nested PCR protocol applied presented 100% sensitivity due to the detection of *Sporothrix* DNA in all the samples, even in a culture-negative sample from a patient diagnosed with disseminated sporotrichosis. Considering that this protocol is capable of identifying the etiological agent as *Sporothrix* sensu lato, we also assume that it was 100% specific. However, the number of samples is small, and we cannot determine the accuracy.

Maximum likelihood (ML) analysis was carried out using RAxML-HPC BlackBox v. 8.2.12 on the CIPRES Science Portal (available at <https://www.phylo.org/portal2/login>, and accessed on 28 February 2024). The ML analysis was performed with 1000 bootstrap replicates, and values equal to or greater than 70% bootstrap ML support were shown next to the nodes. The resulting phylogenetic tree was visualized using the FigTree software version 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>, accessed on 28 February 2024) and exported for editing.

4. Discussion

The standard reference method for diagnosing sporotrichosis is the isolation and identification of *Sporothrix* spp. in culture [11]. However, this is a time-consuming technique, requiring a few weeks for complete fungal identification [12]. Therefore, it is necessary to develop tests that are faster than mycological culture to identify the fungus. [13].

In the present study, our findings using the nested PCR technique proved to be a rapid diagnostic strategy, as it can be applied directly to clinical samples. While for mycological culture, a period of seven to thirty days is necessary for the growth and identification of the fungus, the nested PCR technique presented here made it possible to reach a diagnosis in around 7 h. Importantly, nested amplification of the 18S rRNA gene fragment may detect all *Sporothrix* species of the *Sporothrix* complex. Reference methods for species recognition are based on DNA sequences harbored in genomic loci that encode proteins such as Calmodulin [14,15,16]. In our set of clinical samples, it was possible to identify the presence of a species of *Sporothrix* sensu lato, i.e., *Sporothrix brasiliensis*, which is endemic in Brazil. However, we should point out that the target gene and the technique applied here may be widely used in areas where other species are more prevalent.

Orofino-Costa and collaborators (2022) reported in Brazilian guidelines dedicated to sporotrichosis that purulent samples and biopsies are the most suitable for diagnosing sporotrichosis [17]. Therefore, we included samples of tissue fragments, skin exudates, and conjunctival secretions in our experiments. We decided to include conjunctival secretions due to the emergence of cases of granulomatous conjunctivitis caused by *Sporothrix* spp. in northeastern Brazil [18]. Furthermore, to our knowledge, the nested PCR technique has never previously been used to detect *Sporothrix* DNA in an ocular clinical sample.

In our study, patients had a median age of 44 years old and were predominantly male. Sporotrichosis can affect people of any age, but adults are more affected due to their greater occupational and zoonotic exposure. In relation to gender, some studies

have shown that women are more affected, as they are generally responsible for taking care of the cats at home and are more exposed to scratches and bites [4,11].

Clinically, sporotrichosis is a mycosis with manifestations ranging from skin lesions to disseminated forms. In general, the disseminated forms are related to some form of immunosuppression or secondary immunodeficiency, such as people living with HIV/AIDS. In this study, SAH was more common, but people living with HIV/AIDS were associated with three out of four cases of disseminated sporotrichosis, suggesting that one's immunological condition influences the prognosis of the infection [17]. Co-infection between HIV and sporotrichosis has also been described in Rio de Janeiro. A retrospective analysis between 1999 and 2015 identified 75 hospital admissions for sporotrichosis, of which 38.7% (n = 29/75) involved people living with HIV/AIDS [19].

Despite the advantages of being able to do so, it is worth highlighting that few methods allow the detection of *Sporothrix* DNA directly from clinical samples [8,9,20]. Accordingly, nested PCR is a promising strategy because it can detect *Sporothrix* DNA not only in cultures but also in biological samples [9]. Studies have demonstrated that this molecular methodology has been used for genus-level diagnosis in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue samples from patients with sporotrichosis and, more recently, in FFPE tissue samples from cats with sporotrichosis, showing a high level of sensitivity and specificity [8,20].

Our results suggest a high sensitivity of the method, since nested PCR was able to detect *Sporothrix* in a skin sample that did not show growth in culture. The absence of *Sporothrix* growth in culture can be explained by the low fungal load shown by DNA quantification. Similarly, other studies using nested PCR were able to detect *Sporothrix* in cerebrospinal fluid samples from patients even when it was not possible to recover the fungus from culture media. After identifying *Sporothrix sensu lato* in the tested samples, the authors stated that the method used is a new approach to diagnosing sporotrichosis and allows early treatment [6].

In hyperendemic areas such as Latin America, rapid and accurate diagnostic methods, such as the one presented in this study, are essentially necessary. This is because controlling sporotrichosis in these locations has become increasingly difficult. Thus, a fast and accurate diagnosis allows for a faster response from health agencies to control outbreaks [15]. However, to date, fast methodologies for the diagnosis of sporotrichosis, such as a point-of-care test, have not yet been developed.

5. Conclusions

In conclusion, our results suggest that the nested PCR protocol appears to be an alternative for the diagnosis of sporotrichosis that can be applied directly to clinical samples, eliminating the time-consuming isolation of the fungus by culturing. All positive clinical samples in the nested PCR showed the presence of *Sporothrix* species *sensu lato*. However, the identification of *Sporothrix* species directly from the DNA of the clinical sample depends on the development of new molecular strategies, especially in endemic areas with resource-limited settings, which can be the target of future studies. As a result, the early diagnosis and reliable treatment of patients are possible, especially in immunocompromised patients such as those in our sample.

References

- De Oliveira-Bento, A.; de Sena Costa, A.S.; Lima, S.L.; do Monte Alves, M.; de Azevedo Melo, A.S.; Rodrigues, A.M.; da Silva-Rocha, W.P.; Milan, E.P.; Chaves, G.M. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, 0009693.
- Mora-Montes, H.M. Special Issue “*Sporothrix* and Sporotrichosis 2.0”. *J. Fungi* **2022**, *8*, 821.
- França, H.E.P.; da Silva, K.C.T.; da Silva, K.E.; de Sousa, B.R.; Júnior, J.B.O. Situação epidemiológica da esporotricose humana no nordeste brasileiro. *Revista Eletrônica Estácio Recife.* **2022**, *8*, 1.
- Silva, C.E.; Valeriano, C.A.; Ferraz, C.E.; Neves, R.P.; Oliveira, M.M.; Silva, J.C.; Magalhães, V.; Lima-Neto, R.G. Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil. *Future Microbiol.* **2021**, *16*, 1371–1379.
- PENAMBUCO. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico Esporotricose Humana. N°01/2021. Available online: https://www.cievspe.com/_files/ugd/3293a8_7c6f315e94e04669adcf587b3c6ea944.pdf (accessed on 8 November 2023).
- Oliveira, M.M.E.; Muniz, M.d.M.; Almeida-Paes, R.; Zancope-Oliveira, R.M.; Freitas, A.D.; Lima, M.A.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Freitas, D.F.S. Cerebrospinal fluid PCR: A new approach for the diagnosis of CNS sporotrichosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2020**, *14*, e0008196.
- DE Carolis, E.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. *Pathogens* **2022**, *11*, 297.
- Luiz, R.L.F.; Menezes, R.C.; Pereira, S.A.; de Vasconcellos Carvalhaes de Oliveira, R.; Oliveira1, M.M.E. Nested PCR for the Diagnosis of Feline Sporotrichosis From Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples Using Different DNA Extraction Protocols. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *5*, 755897.
- Hu, S.; Chung, W.-H.; Hung, S.-I.; Ho, H.-C.; Wang, Z.-W.; Chen, C.-H.; Lu, S.-C.; Kuo, T.-T.; Hong, H.-S. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1414–1418.
- Lima-Neto, R.G.; Neta, M.S.; Valeriano, C.A.; Neves, R.P.; Lacerda, A.M.; Ferraz, C.E.; Inácio, C.P.; Le Pape, P.; Ourliac-Garnier, I.; Faria, A.R.; et al. Antifungal efficacy of imidazo[1,2-a]pyrazine-based thiosemicarbazones and thiazolidinediones against *Sporothrix* species. *Futur. Microbiol.* **2023**, *18*, 1225–1233.
- Orofino-Costa, R.; de Macedo, P.M.; Rodrigues, A.M.; Bernardes-Engemann, A.R. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An. Bras. de Dermatol.* **2017**, *92*, 606–620.
- Barros, M.B.; de Almeida Paes, R.; Schubach, A.O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2011**, *24*, 633–654.
- Maubon, D.; Garnaud, C.; Ramarozatovo, L.S.; Fahafahantsoa, R.R.; Cornet, M.; Rasamoelina, T. Molecular Diagnosis of Two Major Implantation Mycoses: Chromoblastomycosis and Sporotrichosis. *J. Fungi* **2022**, *8*, 382.
- Rodrigues, A.M.; de Hoog, G.S.; Camargo, Z.P. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004190.
- Zhang, M.; Li, F.; Li, R.; Gong, J.; Zhao, F. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex real-time PCR. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007219.
- Oliveira, M.M.E.; Almeida-Paes, R.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancope-Oliveira, R.M. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Rev. Iberoam. De Micol.* **2014**, *31*, 2–6.
- Orofino-Costa, R.; Freitasc, D.F.S.; Bernardes-Engemanna, A.R.; Rodriguesd, A.M.; Talharie, C.; Ferrazf, C.E.; Veasey, J.V.; Quintellac, L.; de Sousah, M.S.L.A.; Vettorato, R.; et al. Esporotricose humana: Recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. *An. Bras. Dermatol.* **2022**, *97*, 757–777.
- Neto, F.S.; Gadelha, C.; Silva, L.; Pazos, N.; Silva, A.; Silva, M.; Sousa, B.; Dulgheroff, A.C.B.; Guerra, F.; da Silveira, V.M.; et al. Case Report: Ocular Sporotrichosis—A Seven-Case Series. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2023**, *108*, 1109–1114.

19. Falcão, E.M.M.; Pires, M.C.D.S.; Andrade, H.B.; Gonçalves, M.L.C.; Almeida-Paes, R.; Valle, A.C.F.D.; Bastos, F.I.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Freitas, D.F.S. Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. *Med. Mycol.* **2019**, *58*, 141–143.
20. Hayashi, S.; Kaminaga, T.; Baba, A.; Koike, S.; Koike, M.; Kanno, M.; Ishikawa, S.; Tsukada, K.; Suzuki, T.; Hamasaki, Y.; et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. *Mycoses* **2019**, *62*, 1148–1153.