



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
ÁREA DE MEDICINA TROPICAL**

Tese de Doutorado

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE PACIENTES COM
ESPOROTRICOSE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

CYBELLE EMANUELE DA SILVA

RECIFE, 2021.

CYBELLE EMANUELE DA SILVA

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE PACIENTES COM
ESPOROTRICOSE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

Qualificação da tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Coorientação: Cláudia Elise Ferraz Silva.

RECIFE, 2021

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Silva, Cybelle Emanuele da.

Distribuição geográfica e caracterização de biomarcadores em fragmentos de tecidos de pacientes com Esporotricose por espectrometria de massas / Cybelle Emanuele da Silva. - Recife, 2024.

93f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), 2021.

Orientação: Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Coorientação: Cláudia Elise Ferraz Silva.

Inclui referências e apêndices.

1. diagnóstico; 2. esporotricose; 3. espectrometria de massas. I. Neto, Reginaldo Gonçalves de Lima. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CYBELLE EMANUELE DA SILVA

**DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E CARACTERIZAÇÃO DE
BIOMARCADORES EM FRAGMENTOS DE TECIDOS DE PACIENTES COM
ESPOROTRICOSE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS**

APROVADA EM

Banca Examinadora:

RECIFE, 2021

Dedico este trabalho aos meus pais que me permitiram trilhar o caminho da vida, aos meus familiares que são a base de tudo, a todos os meus amigos que através de palavras e ações me incentivaram a continuar e chegar até o fim. Ao meu grande amor, Jandiel, que sempre é minha fortaleza.

A estes dedico...

Agradecimentos

*Em particular, agradeço a **Jeová Deus** por me presentear com a dádiva da vida e com muitas bênçãos durante todos os anos de minha vida vividos, por todo apoio encontrado mediante orações e alimento espiritual providos.*

*À **Reginaldo Gonçalves**, que me acolheu como aluna, e permitiu que eu pudesse trilhar o caminho de conclusão do doutorado. Obrigada por toda orientação, paciência e perseverança.*

*Á **Cláudia Elise Ferraz** por toda disponibilidade e apoio, essenciais para que os objetivos do doutorado fossem alcançados.*

*Ao serviço de **Dermatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-UFPE)***

*A **Manoel Oliveira** por todo auxílio e atenção durante a elaboração e realização dos experimentos.*

*Aos meus colegas da **Micologia Médica** por todas as experiências vividas e dias de trabalho compartilhados.*

*Á **Jucieli**, que sempre é uma grande companheira e amiga, me socorrendo no laboratório quando eu mais precisava, com uma paciência enorme . Gratidão por todo apoio e por fazer os meus dias no laboratório mais felizes!*

*Á **Bruna**, com quem dividi muitos bons momentos de aprendizagem e trabalho, externo minha admiração por sua inteligência e disposição de ajudar sempre que necessário com uma boa vontade incrível. Muito Obrigada!*

*Á **Carlos**, por todo apoio e conhecimento repassado. Obrigada!*

*Aos meus pais **Roberto e Telma**, que nutro profundo amor, que são e foram essenciais para a minha formação tanto intelectual como pessoal. Sempre estando ao meu lado em tudo que idealizo e me comprometo a fazer, apoiando meus sonhos e fazendo com que cada conquista seja comemorada e às vezes algumas perdas sejam superadas. serei eternamente grata.*

*Á minha irmã **Gabrielle**, que como irmã mais velha é uma mãe para mim, agradeço todos os seus cuidados e preocupações prestados. A amo muitíssimo!*

*Aos meus familiares, em especial, minha avó **Vera**, minhas tias **Socorro** e **Márcia** que alegram todos os meus dias com seu amor, carinho e mimos.*

*Á **Sandra**, por sempre me ouvir e me acalmar com boas conversas e bons incentivos. De coração, agradeço!*

*Á **Priscila**, que se tornou uma grande companheira com quem posso contar além do âmbito acadêmico e com quem compartilho experiências de vida.*

*Ao meu esposo **Jandiel**, por me proporcionar um amor verdadeiro, estando ao meu lado nos momentos em que mais precisei, sendo meu porto seguro. Obrigada por alegrar e encher meus dias de amor e carinho.*

*À minha amiga e irmã do coração **Aline Pitt** pelos longos anos de amizade, companheirismo, aventuras, alegrias e tristezas compartilhadas. Por sempre disponibilizar do seu tempo para me ajudar, apoiar no que for preciso e por todas boas conversas que já tivemos.*

Á FACEPE pelo apoio financeiro prestado, que permitiu a realização do meu doutorado.

“Sabedoria é a coisa mais importante, então adquira sabedoria; E, além de tudo que você adquirir, adquira entendimento”

Provérbios 7:4

RESUMO

A esporotricose é uma micose ocasionada por implantação traumática, subaguda ou crônica, causada por fungos termodimórficos do complexo *Sporothrix spp.*, possuindo distribuição mundial, especialmente em áreas tropicais e subtropicais. A rota clássica da infecção fúngica ocorre através da inoculação do fungo presente no solo e em plantas. No Brasil, este padrão epidemiológico clássico prevaleceu até o início da década de 1990, entretanto, nos últimos anos, surtos da doença foram registrados sendo relacionados ao contato com felinos contaminados através de arranhadura ou mordedura. Desde então, os casos registrados de esporotricose aumentaram em todo o país e dados comprovam que o estado de Pernambuco, em especial, a região metropolitana, vem sendo afetada por esta micose, a qual se tornou uma doença de notificação compulsória em PE (Portaria nº 279/2015). Diante disso, é de grande importância o diagnóstico no estágio inicial da doença para um rápido e correto tratamento dos pacientes. O teste padrão ouro para diagnosticar a esporotricose é a cultura fúngica, porém, este método tradicional limita-se em relação ao tempo de espera e restringi-se a observação de características fenotípicas, não permitindo a correta diferenciação dos fungos que causam a doença. Neste sentido, com objetivo de sobrepor as deficiências comentadas acima, o presente trabalho visa a utilização da espectrometria de massas MALDI/TOF MS, uma técnica molecular promissora de identificação das espécies que compõem complexo *Sporothrix spp.* Com caráter inovador, a metodologia aplicada envolveu um protocolo de desnaturação e digestão enzimática a partir de fragmentos de tecido dos pacientes com análise proteômica direta. Os resultados obtidos referem-se a biomarcadores proteicos do hospedeiro e do fungo e com as análises realizadas chegou-se ao resultado promissor que as amostras estavam contaminadas, muito provavelmente, com *Sporothrix schenckii* de acordo com a correlação de Pearson. Sugere-se que tal abordagem poderá na prática clínica ser utilizada em conjunto com os métodos tradicionais existentes proporcionando maior robustez no diagnóstico da esporotricose. Em paralelo, realizou-se um estudo epidemiológico da esporotricose em Pernambuco com adição de dados de georreferenciamento. O cenário obtido demonstrou distribuição da esporotricose em diferentes municípios do estado, com alta concentração de casos na região metropolitana. Ao todo, 91,1% dos pacientes relataram contato prévio com gatos e destes 70,7% são do sexo feminino. Em relação ao nível de escolaridade, 46% relataram a conclusão do ensino médio e apenas 2% não eram alfabetizados. A principal manifestação clínica foi a linfocutânea, ocorrendo em 67% dos pacientes e a principal linha de escolha para o tratamento foi o itraconazol em 95,4%.

Palavras-Chaves: diagnóstico, esporotricose, epidemiologia, espectrometria de massas, georreferenciamento.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a mycosis caused by traumatic implantation, subacute or chronic, caused by thermotolerant fungi of the *Sporothrix* spp. complex, with worldwide distribution, especially in tropical and subtropical areas. The classic route of fungal infection occurs through the inoculation of the fungus present in the soil and on plants. In Brazil, this classic epidemiological pattern prevailed until the beginning of the 1990s, however, in recent years, outbreaks of the disease have been reported, being related to contact with felines contaminated through scratches or bites. Since then, registered cases of sporotrichosis have increased across the country and data prove that the state of Pernambuco, in particular the metropolitan region, has been affected by this mycosis, which has become a compulsory notification disease in PE (Ordinance No. 279/2015). Therefore, the diagnosis in the initial stage of the disease is of great importance for a quick and correct treatment of patients. The gold standard test for diagnosing sporotrichosis is fungal culture, however, this traditional method is limited in relation to the waiting time and is restricted to the observation of phenotypic characteristics, not allowing the correct differentiation of the fungi that cause the disease. In this sense, in order to overcome the deficiencies mentioned above, the present work aims to use MALDI/TOF MS mass spectrometry, a promising molecular technique for identifying the species that make up the *Sporothrix* spp. With an innovative character, the applied methodology involved a denaturation and enzymatic digestion protocol from tissue fragments from patients with direct proteomic analysis. The results obtained refer to protein biomarkers of the host and the fungus, and with the analyzes carried out, it was possible to obtain a promising result that the samples were very likely contaminated with *Sporothrix schenckii* according to Pearson correlation. It is suggested that such an approach could be used in clinical practice in conjunction with existing traditional methods, providing greater robustness in the diagnosis of sporotrichosis. In parallel, an epidemiological study of sporotrichosis in Pernambuco was carried out with the addition of georeferencing data. The normalized scenario distribution of sporotrichosis in different municipalities in the state, with a high concentration of cases in the metropolitan region. In all, 91.1% of the patients reported previous contact with cats and of these 70.7% are female. Regarding the level of education, 46% reported completing high school and only 2% were not literate. The main clinical manifestation was lymphocutaneous, occurring in 67% of patients and the main line of choice for the treatment was itraconazole for 95.4%.

Key-words: diagnosis, epidemiology, georeferencing, mass spectrometry, sporotrichosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Manifestações clínicas da esporotricose cutânea (a) linfocutânea; (b) lesão cutânea fixa; (c) ulcerações; (d) lesão oro-labial e; (e) lesão na mucosa ocular. _____ 21

Figura 2: Características microscópicas do complexo *Sporothrix schenckii* isolado em meio de cultura a) Fase filamentosa apresentando conídios e conidióforos b) Fase leveduriforme apresentando células hialinas, globosas e formas gemulantes. Micrografias (região inferior da figura) com um aumento de 400x _____ 23

Figura 3: Esporotricose Felina em a) lesões faciais e em b) ulceração no nariz. _____ 29

Figura 4: Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do MALDI-TOF/MS para identificação de fungos e bactérias. A incidência do laser no analito/matriz promove a formação de íons que serão acelerados em um tubo a vácuo e separados de acordo com a relação massa/carga durante seu tempo de voo. _____ 30

Figura 5: Representação espacial da distribuição mundial da esporotricose.-----
_____ 33

Tabela 1: Distribuição geográfica global das espécies do complexo *Sporothrix schenckii* _____ 32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BHI ágar	Brain Heart Infusion Ágar
Bt2	Tubulina
CAL	Calmodulina
CHS 1	Quitina Quinase 1
D-AMB	Anfotericina B Desoxicolato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-RAPD	Random-Amplified Polymorphic
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent
EUA	Estados Unidos da América
GMS	Impregnação pela prata de Grocott
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IK	Iodeto de Potássio
IPEC	Instituto de Pesquisa Evandro Chagas
KOH	Hidróxido de Potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization -Time-of-Flight
NAOH	Hidróxido de Sódio
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP	PCR-Restriction Fragment Length
RJ	Rio de Janeiro
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVO GERAL	15
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 ESPOROTRICOSE E SUA HISTÓRIA	16
3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TAXONOMIA	18
3.3 ASPECTOS CLÍNICOS	20
3.3.1 MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS	21
3.3.2 MANIFESTAÇÕES EXTRACUTÂNEAS	22
3.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	23
3.4.1 EXAME DIRETO E CULTURA.....	23
3.4.2 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	25
3.4.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO.....	26
3.4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR.....	27
3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF	30
3.6 EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE	33
3.7 ESPOROTRICOSE EM GATOS E CÃES.....	39
CAPÍTULO I	63
CAPÍTULO II	80
4- Conclusão	93

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix*, que possui ampla distribuição em todo mundo, em especial, em áreas tropicais e subtropicais (Schubach et al., 2008). Por mais de um século, o agente etiológico *Sporothrix schenckii* era considerado uma única espécie capaz de provocar a doença. Entretanto, a utilização de ferramentas moleculares, em conjunto com estudos fenotípicos, demonstrou que *S. schenckii* consistia em um grupo de espécies crípticas filogeneticamente relacionadas (Lopes-Bezerra et al., 2006; Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008). Atualmente, o complexo *Sporothrix* divide-se em clado clínico e clado ambiental. O clado clínico inclui principalmente patógenos humanos como *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa* e *S. luriei* (Orofino-Costa et al., 2017). Caracteristicamente, os fungos do gênero *Sporothrix* apresentam dimorfismo de acordo com a temperatura, observa-se uma fase filamentosa a 25-28°C e uma leveduriforme a 35-37°C, ambas infectantes (Zhang et al., 2012; Sil e Adianopoulos, 2015).

O processo infeccioso da esporotricose envolve a implantação fúngica subaguda ou crônica, sendo as principais formas clínicas da doença a cutânea, linfocutânea, cutânea disseminada e menos comumente relatada, a extracutânea (Bonifaz et al., 2017). A rota clássica de inoculação do fungo ocorre através do manuseio do solo, plantas e matéria em decomposição, sendo a esporotricose conhecida, por conta disso, como “doença do jardineiro”. (Barros et al., 2011).

Entretanto, em 1998, com caráter endêmico no Rio de Janeiro, Brasil, ocorreram grandes mudanças no perfil clássico de transmissão da esporotricose. A transmissão zoonótica por gatos (*Felis catus*) domésticos passou a ser registrada com aumento abrupto e contínuo do número de casos no decorrer do tempo (Mora-Montes et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). Desde

então, foram notificados 4.517 casos em humanos até 2015 e 4.916 gatos foram diagnosticados até 2017. Os humanos passaram a ser infectados através da arranhadura ou mordedura do gato e ao terem contato com o exsudato de lesões cutâneas de um gato infectado (Gremião et al., 2015; Gremião et al., 2020; Sanchotene et al., 2015; Rodrigues et al., 2020; Rossow et al., 2020). Acredita-se que a interação social dos gatos com os humanos e ao mesmo tempo com outros animais, plantas e solo contribuíram para a ocorrência do surto (Barros et al., 2004). Além disso, a disseminação da doença é também relacionada a condições socioeconômicas precárias em conjunto com a deficiência no acesso aos serviços de saúde, (Schubach et al., 2005; Schubach et al., 2008).

No cenário atual, a esporotricose está em um processo de expansão para outras regiões do território brasileiro, em especial, a região nordeste. A migração dos gatos com os seus proprietários é relatada como um fator que contribui para o registro da doença em várias localidades (Gremião et al., 2017). Historicamente, casos isolados da esporotricose no Nordeste do Brasil eram relatados na literatura (Filgueira, 2009; Nunes et al., 2011; Araújo et al., 2016). Os primeiros relatos de esporotricose que demonstraram a expansão da doença foram de um surto de esporotricose felina ocorrido na região metropolitana do Recife e em paralelo a ocorrência do primeiro caso de transmissão zoonótica da esporotricose em Pernambuco (PE) (Silva et al., 2019; Lacerda-Filho et al., 2019). Em adição, outros casos foram relatados partindo de pacientes atendidos em um hospital público do estado de Pernambuco (PE) (Lima et al., 2020; Valeriano et al., 2020)

Dessa forma, um dos pilares importantes a ser colocado em prática para pacientes acometidos com esporotricose é um rápido diagnóstico para que se possa conduzir a terapêutica o mais ágil possível. O diagnóstico da esporotricose pode ser realizado por meio de achados clínicos, epidemiológicos e dados laboratoriais (De Lima Barros et al., 2011). O exame

padrão ouro para identificação do *Sporothrix spp.* é o isolamento fúngico através de cultura em meio específico, análise de perfil bioquímico e observação de características fenotípicas. Fragmentos de tecido e a secreção seropurulenta são as principais amostras coletadas para obtenção do fungo (Orofino et al., 2017). Em até 10 dias, a liberação do resultado para o paciente torna-se possível, entretanto, as análises taxonômicas tradicionais não permitem a identificação da espécie fúngica (Kurosawa et al., 1968; Rodrigues et al., 2015).

Métodos alternativos surgiram objetivando a identificação do fungo de maneira mais precisa auxiliando e/ou sobrepondo as limitações do exame padrão ouro. As análises de técnicas moleculares baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e proteômica ganharam espaço trazendo novas perspectivas. Em destaque, a tecnologia de espectrometria de massas através de *matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight* (MALDI-TOF MS) é uma ferramenta proteômica que permite a classificação e diferenciação de microrganismos, e em micologia sua aplicação já se tornou efetiva na identificação de vários táxons fúngicos (Santos et al., 2011; Lima-Neto et al., 2014; Pereira et al., 2014;). Recentemente, Oliveira e colaboradores desenvolveram um novo protocolo utilizando MALDI-TOF MS de identificação de espécies de *Sporothrix spp.*, sendo um estudo pioneiro na elaboração de uma biblioteca proteômica para as espécies descritas no complexo. A pesquisa partiu de isolados obtidos e caracterizados por método tradicional através do prévio isolamento fúngico em meio de cultura (Oliveira et al., 2015). Dessa forma, a técnica de MALDI-TOF MS demonstrou-se como uma ferramenta promissora para identificação de espécimes fúngicos de *Sporothrix spp.* na rotina clínica pela sua rapidez e praticidade (Matos et al., 2020; Gómez-Velásquez et al., 2021). Com caráter inovador, a presente pesquisa traz a possibilidade de identificação fúngica diretamente da amostra clínica, sem o prévio isolamento tradicional em meio de cultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi introduzir a técnica de espectrometria de massas por MALDI-TOF

MS como alternativa ao método tradicional de identificação de *Sporothrix spp.*, em casos de esporotricose de Pernambuco, utilizando fragmentos de tecidos obtidos por biópsia. Justifica-se a abordagem, pois observa-se um crescente aumento na incidência de casos de esporotricose humana no Estado de Pernambuco e o diagnóstico rápido e preciso implicaria em tratamento ágil e oportuno para os pacientes. Em conjunto, foi realizado um levantamento de distribuição espacial dos casos diagnosticados e acompanhados por este serviço, trazendo aspectos clínicos e epidemiológicos para uma análise abrangente da distribuição da esporotricose no Estado de Pernambuco.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expansão geográfica da esporotricose e analisar a distribuição de proteínas em fragmentos de tecidos de pacientes com esporotricose.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a distribuição espacial da esporotricose no estado de Pernambuco e caracterizar a epidemiologia e sciodemografia dos casos;
- Propor um protocolo de extração de biomarcadores protéicos diretamente de fragmentos de pele que possam ser utilizados para diagnosticar a esporotricose;
- Analisar a distribuição de proteínas em fragmentos de pele de pacientes com esporotricose por MALDI-TOF MS;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ESPOROTRICOSE E SUA HISTÓRIA

A esporotricose é uma micose endêmica causada por fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* que vem ganhando importância devido ao aumento de sua incidência e prevalência em todo o mundo, ao reconhecimento de um complexo de espécies, a sua ecologia, distribuição e características epidemiológicas distintas (Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008; Mora-Montes et al., 2015; Chakrabartiet al., 2015).

Sporothrix schenckii foi isolado pela primeira vez por um estudante de medicina do Johns Hopkins Hospital (Baltimore, MD, EUA), Benjamin Schenk, no ano de 1886. Um paciente do sexo masculino com 36 anos de idade apresentava lesões na mão direita e braço. O fungo isolado do abscesso do paciente foi identificado pelo micologista Erwin Smith como pertencente ao gênero *Sporotrichum* (Schenk., 1898). O segundo caso foi descrito em 1900 por Hektoen e Perkins (Chicago, IL, EUA). Tratava-se de um jovem que se feriu com a batida de um martelo em seu dedo e sua lesão regrediu espontaneamente sem a necessidade de intervenções terapêuticas. Nessa ocasião, Hektoen e Perkins, isolaram, identificaram e classificaram o agente etiológico da esporotricose como *Sporothrix schenckii* (Hekton & Perkins., 1900). Com o passar do tempo esse fungo foi erroneamente mantido no gênero *Sporotrichum* que compreende fungos basidiomicetos que não são patogênicos e nem termodimórficos. Foi apenas em 1968, que Mariat e co-autores, sugeriram que existia uma relação de *S. schenckii* com o gênero *Ophiostoma* (Ascomicota), indicando *Ophiostoma stenoceras* como o seu teleomorfo (Mariat et al 1968, Nicot e Mariat, 1973) e em 1970, Taylor sugeriu que *S. schenckii* seria o anamorfo de *O. stenoceras* (Taylor., 1970). E desde então muitas pesquisas foram realizadas estabelecendo diferenças e similaridades entre *S. schenckii* e *O. stenoceras*, deixando a dúvida se a relação entre as espécies

poderia ser contraditória. Recentemente análises filogenéticas amenizaram tal dúvida mostrando que *S. schenckii* e *O. stenoceras* estão intimamente relacionados (De Beer et al., 2003)

Em relação ao histórico de infecção por *S. schenckii* no Brasil, em 1907, foi relatado o primeiro caso de contaminação animal ocorrida de maneira natural, em ratos por Lutz e Splendore (Lutz & Splendore., 1907).Entretanto, durante muitos anos a esporotricose ficou conhecida como a doença do jardineiro devido aos casos de infecção estarem relacionados com o manuseio do solo, plantas e matéria orgânica (Singhai-Monil et al., 2012; De Carvalho et al., 2014).

O caso de contaminação através de animal ressurgiu no século XX, precisamente no ano de 1998, quando o relato de uma nova via de transmissão animal da esporotricose no estado do Rio de Janeiro, Brasil foi registrado. Gatos (*Felix catus*) portadores da esporotricose atuam na cadeia epidemiológica como agentes transmissores da doença em humanos, ocorrendo em pouco tempo um crescimento exponencial no número de casos registrados de indivíduos contaminados com *Sporothrix spp.* (Lopes-Bezerra et al., 2018). Acredita-se que houve uma migração da doença dos ratos para os gatos, visto que gatos são os principais predadores dos ratos, hipótese esta corroborada com propostas de alguns pesquisadores que sugerem a ingestão de *Sporothrix sp* como uma das vias de transmissão para se adquirir a infecção (Lutz & Splendore., 1907; Manhart et al., 1970; Matter et al., 1984; al-Tawfiq et al.,1998).

Por último, é interessante destacar o descobrimento realizado por Marimon e colaboradores onde descreveram que *S. schenckii* não é uma única espécie e sim complexo de espécies patogênicas. Estudos posteriores evidenciaram que, dentro do complexo, cada espécie destaca-se por possuir características e distribuição geográfica distintas (Marimon et al., 2007; Marimon et al., 2008; Chakrabarti et al., 2015)

3.2 AGENTE ETIOLÓGICO E TAXONOMIA

Os agentes etiológicos da esporotricose pertencem ao gênero *Sporothrix*. Esse microrganismo pertence ao reino Fungi, é heterotrófico, não apresenta mobilidade própria, e sua parede celular é rígida, quitinosa sendo composta de β -glucanos alcalinos e insolúveis e um peptídeo ramnomanana (Previato et al., 1979; Lopes-Bezerra et al., 2006; Ruiz-Baca, et al 2011). *S. schenckii* é um fungo hialino, contudo, produz melanina como fator protetor contra mecanismos de defesa celulares do hospedeiro (fagocitose, destruição macrofágica e por proteínas extracelulares) (Gómez et al., 2003; Lopes-Bezerra et al 2018; Oliveira et al., 2019).

Em relação ao seu habitat natural, sabe-se que pode ser a vegetação, o solo e madeira em decomposição e que *S. schenckii* é um fungo termodimórfico, filamentosos a 25° C e leveduriforme a 37° C, ambos os estados possuindo diferenças morfológicas. Em seu estado filamentosos em vida saprofítica ou em cultivo a 25° C, o fungo apresenta-se com hifas hialinas delicadas, septadas e ramificadas. Os conídios unicelulares sendo de dois tipos: o primeiro possuindo variação na sua coloração passando de hialino a marrom e ovóides podendo ser visualizados na porção apical de conidióforos e o segundo, os conídios demáceos, grandes, ovóides, com parede celular espessa, podendo ser observados em toda a extensão das hifas (St-Germain & Summerbell., 1996). Em parasitismo ou cultivado em meio de cultura especiais a 37°C, observa-se como levedura unicelular, globosa, ovalada lembrando um formato de charuto. Por último, diversos brotamentos podem ser visualizados nesse estado leveduriforme (Chandler et al., 1980).

Desde seu descobrimento em 1898 por Benjamin Schenck, a posição taxonômica de *Sporothrix* não era bem definida. Durante muito tempo esse fungo foi incluído no gênero *Sporotrichum* devido à classificação dada pelo micologista Erwin Smith. Dois anos após a sua identificação e classificação,

Hektoen e Perkins (1900), nomearam o gênero *Sporothrix* (Hektoen e Perkins, 1900; Beurm e Gougerot, 1911) Estudos posteriores mostraram que *Sporothrix* não compartilhava características com os basidiomicotas. Por exemplo, sequências de DNA ribossomal confirmaram que *S. schenckii* está filogeneticamente associado ao *Ophiostoma stenoceras*, um ascomicota cosmopolita e não patogênico, e desde então, *Sporothrix* é um dos gêneros anamórficos associado ao gênero *Ophiostoma*. (Berbeer e Taylor, 1992; Summerbell et al., 1992; de Beer et al., 2003; Zipfel et al., 2006). A classificação dada por Guarro, em 1999, definiu *S. schenckii* como pertencente à divisão Ascomycota, classe Pyrenomycetes, ordem Ophiostomales e família Ophiostomataceae (Guarro et al. 1999). Contudo, a classificação atual posiciona o gênero *Sporothrix* na classe Sordariomycetes (Hyde., 2020).

Ainda não se tem conhecimento de alguma forma de reprodução sexuada para *S. schenckii*. Evidências indiretas da análise molecular da região 18S do RNA ribossomal sugeriam que *Ophiostoma stenoceras* representaria sua forma sexual. Porém, análises aprofundadas fenotípicas e genotípicas demonstraram diferenças básicas entre as duas espécies. *Ophiostoma stenoceras* não produz conídios demáceos e *S. schenckii* não produz peritécio como acontece com *O. stenoceras* em ágar batata dextrose (BDA), ágar malte, ágar mycosel e ágar fubá. Entretanto, um estágio sexual dentro do gênero *Ophiostoma* não foi descartado (Dixon et al., 1991; Chakrabarti et al., 2015).

As espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* e que se relacionam com a esporotricose estão divididas em dois clados, o clado clínico que inclui *S. schenckii* stricto sensu, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* e o clado ambiental composto por vários outros complexos, *S. candida*, *S. inflata*, *S. gossypina*, *S. stenoceras* e *S. pallida*, sendo esse último responsável por conter espécies envolvidas em casos de esporotricose (Orofino-Costa et al., 2017).

No Brasil, *Sporothrix brasiliensis* é a espécie prevalente. Análises filogenéticas realizadas por Rodrigues e colaboradores (2013), partindo-se de amostras coletadas de felinos em diferentes regiões do país, demonstraram que *S. brasiliensis* foi identificado em 96,9 % dos gatos. Ademais, o genótipo de *Sporothrix* encontrado nos gatos é idêntico ao de *S. brasiliensis* de amostras humanas, confirmando a rota de transmissão de gatos para humanos (Rodrigues et al., 2013). *Sporothrix brasiliensis* possui resistência térmica a 39 °C que pode ser um importante mecanismo de adaptação aos gatos e uma possível explicação do sucesso da infecção desta espécie em detrimento das outras do complexo durante surtos da doença no Brasil (Boechat et al., 2018). Entretanto, vários outros fatores podem ter contribuído para o surgimento da esporotricose por *S. brasiliensis*, como por exemplo, o grande aumento na população de gatos em áreas urbanas com constante crescimento populacional, gatos como meio de controle de roedores em conjunto com seus aspectos comportamentais (lamber, coçar etc) e ainda falta de resistência natural dos hospedeiros (Rodrigues et al., 2020). *Sporothrix brasiliensis* é altamente virulento em modelos animais, sendo associado as formas clínicas mais graves e atípicas da esporotricose e descrito como menos susceptível ao itraconazol, tanto em estudos clínicos quanto em modelos animais (Castro et al., 2013; Fernandes et al., 2013; Freitas et al., 2015; Clavijo-Giraldo et al., 2016).

3.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Geralmente a esporotricose manifesta-se de forma cutânea e extracutânea, sendo a primeira mais frequente (Orofino et al., 2017). Os sítios de infecção mais afetados são os membros superiores (45%), depois os membros inferiores (18-23%) e em menor incidência o tronco (14-21%) (Arena et al., 2018).

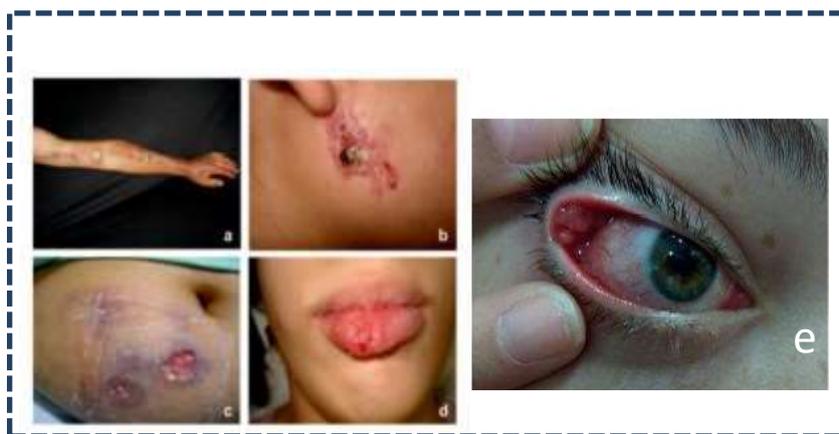
3.3.1 MANIFESTAÇÕES CUTÂNEAS

A esporotricose se manifesta clinicamente de diferentes maneiras, que são as formas linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada e a extracutânea. Acometimento osteoarticular, pulmonar, neurológico e mucoso são característicos da forma extracutânea (**Figura 1**). As manifestações cutâneas surgem geralmente após algum trauma na epiderme. (De Lima Barros et al., 2011; Soares et al., 2019). Em 70-80% dos casos ocorre a forma linfocutânea, que caracteriza-se inicialmente pela presença de nódulos gomosos e flutuantes ascendentes na região dos membros, mãos e braços que podem ulcerar-se com a evolução da doença. Também são relatados casos de lesões ulceradas e granulomatosas em regiões mucocutâneas que abrangem a boca, conjuntiva, faringe, cordas vocais, nariz e seios (Veja-Memije et al., 2018; Lacerda-Filho et al., 2020). Embora qualquer mucosa possa ser afetada pela esporotricose, a membrana ocular é mais susceptível e, quando o ducto lacrimal é afetado pode deixar sequelas. Uveíte, conjuntivite, episclerite, coroidite, lesão retrobulbar são comuns em pacientes com lesões oculares. A lesão retrobulbar é frequentemente associada à disseminação hematogênica e/ou a lesões anteriores com uma prévia inoculação do fungo. O acometimento simultâneo da mucosa ocular e dos linfonodos resulta na Síndrome de Parinaud (Sena et al 1988; Curi et al., 2003).

A forma cutânea fixa aparece em 20-30% dos casos e se manifesta clinicamente como uma única lesão ou algumas poucas localizadas no sítio de inoculação do fungo. Muitas vezes são lesões ulceradas com bordas eritematosas, podendo se apresentar de maneira vegetante tuberosa, verrucosa e sem a disseminação linfática (Almeida et al., 2009). A forma cutânea fixa é retratada como sendo comum em crianças (Tlougan et al., 2009). A forma cutânea disseminada é rara, geralmente ocorrendo em pacientes imunocomprometidos. Caracteriza-se por apresentar lesões

cutâneas difusas devido ao processo de disseminação hematogênica (Mahajan et al., 2015).

Figura 1: Manifestações clínicas da esporotricose cutânea (a) linfocutânea; (b) lesão cutânea fixa; (c) ulcerações; (d) lesão oro-labial e; (e) lesão na mucosa ocular.



Fonte: Chakrabarti et al. (2015); Orofino-Costa et al. (2007).

É interessante destacar que o perfil da doença no Brasil apresenta um quadro clínico distinto, que em alguns casos, envolve apresentações imunorreativas, que são ulcerações grandes e bem definidas denominadas eritema nodoso, eritema multiforme e, ainda, síndrome de Sweet e artrite reativa (Mahajan, 2014; Orofino, 2017).

3.3.2 MANIFESTAÇÕES EXTRACUTÂNEAS

Em relação aos aspectos clínicos das manifestações extracutâneas sabe-se que, na maioria dos casos, envolve ossos e articulações e que são raros os pacientes acometidos dessa forma. Acometimento pulmonar (agudo ou crônico), do sistema nervoso central (*S. brasiliensis* possui neurotropismo) e de todos os órgãos pode ocorrer e caracteriza uma esporotricose sistêmica que pode progredir para sepse e ser fatal. É aceitável que a contaminação das vias respiratórias possa ocorrer através da inalação dos propágulos do fungo ou também por meio da disseminação via circulação sanguínea (Lázaro et al.,

2008; Orofino-Costa et al., 2017; Queiroz-Telles et al., 2019). Recentemente, Do Monte Alves (2020) relatou um caso relevante de esporotricose extracutânea por inalação de conídios de *Sporothrix brasiliensis* com consequente inoculação pulmonar. A paciente imunocompetente de 50 anos de idade não possuía histórico de trauma cutâneo, entretanto, em seu ambiente de trabalho mantinha contato com gatos de rua que alimentava quando, após o almoço, cochilava em uma sala fechada com os felinos. Após 25 dias de internação e evolução para esporotricose sistêmica, a paciente apresentou sepse e veio a óbito (Do Monte Alves et al., 2020).

A esporotricose sistêmica é considerada uma infecção grave e oportunista, sendo os pacientes imunossuprimidos, tais como diabéticos, pacientes transplantados, infectados com HIV, indivíduos em terapia com corticoides, pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), leucemia os principais afetados e alcoolistas (Al-Tawfiq & Wools, 1998).

3.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

3.4.1 EXAME DIRETO E CULTURA

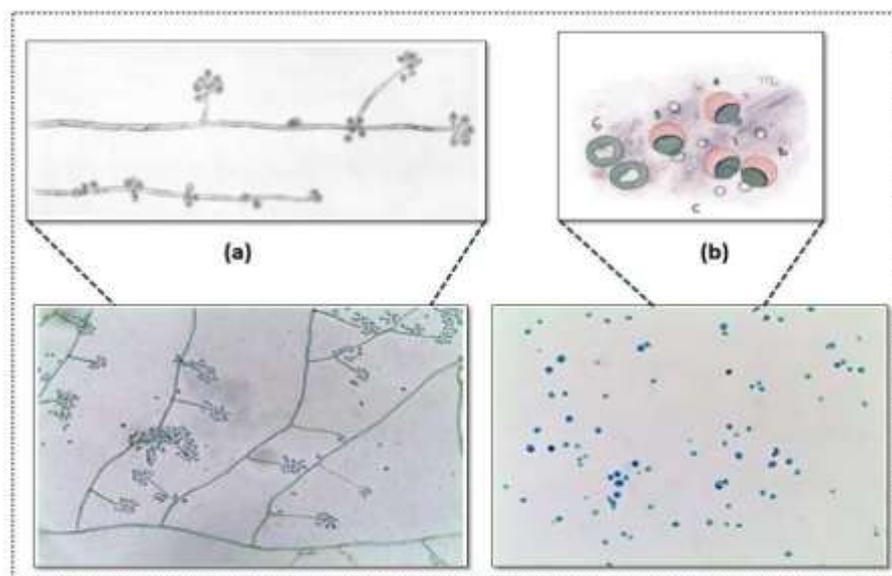
O exame micológico direto é um dos métodos laboratoriais que pode ser utilizado para compor o diagnóstico da esporotricose. A amostra biológica é previamente tratada com uma solução de hidróxido de potássio (KOH) 10% v.v ou com hidróxido de sódio (NaOH) 4% v.v sendo depois visualizada no microscópio óptico. Porém, é raro o sucesso na observação dos elementos leveduriformes do complexo *S. schenckii*, pois em amostras clínicas essas células são raras e pequenas (Reed et al., 1993). Se o material colhido do paciente for secreção, pode-se realizar a preparação de esfregaços e “imprint”, e quando forem fragmento de tecido fragmento de tecido, pode-se utilizar o corante Giemsa ou Panótico para proporcionar uma melhor visualização das formas leveduriformes infectantes (Morris-Jones, 2002). Nesse caso, as células

leveduriformes do fungo podem ser vistas em formato de charutos e/ou navetas com a presença de um halo claro (Bazzi, 2016).

O diagnóstico laboratorial considerado padrão ouro para a esporotricose é o isolamento de *Sporothrix* spp. através da cultura micológica. Geralmente, as amostras são obtidas de lesões cutâneas (pus, exsudatos) ou o médico solicitará uma biópsia da região afetada. Outras amostras biológicas, a depender do quadro clínico, como escarro, líquido sinovial e líquido cefalorraquidiano (LCR) podem ser obtidas e, se apropriado, utilizadas para realização da cultura e/ou esfregaço. O material obtido é semeado e deixado à temperatura ambiente para permitir o crescimento do agente etiológico (Kwon-Chung et al., 1992; Kauffman et al., 2007; Arenas et al., 2018). O meio de cultura utilizado é o ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol com o objetivo de evitar contaminação bacteriana, e em alguns laboratórios adiciona-se também a cicloheximida para diminuir o risco de contaminação por fungos saprófitos. Nessas condições, o tempo de crescimento fúngico é em torno de 5 até 10 dias (Pappas et al., 2000).

As características macroscópicas do crescimento fúngico em cultura são a presença de estruturas filamentosas em colônia, hialinas e de aspecto úmido, podendo apresentar coloração escura que gradativamente aumenta ou permanecer hialina. Nesta fase, indica-se a observação das estruturas microscópicas com a realização de microcultivo em lâmina para microscopia, com o intuito de observar o conidióforo e conídios característicos do complexo *S. schenckii*. Os conídios podem ser hialinos a marrom em disposição floral ou de margaridas, dotados de uma fina parede com conidióforo delicado do tipo simpodial localizado ao longo das hifas (**Figura 2 (a)**) (Dixon et al., 1991).

Figura 2: Características microscópicas do complexo *Sporothrix schenckii* isolado em meio de cultura a) Fase filamentosa apresentando conídios e conidióforos b) Fase leveduriforme apresentando células hialinas, globosas e formas gemulantes. Micrografias (região inferior da figura) com um aumento de 400x.



Fonte: Lawless et al (1930); Oliveira et al. (2012).

Uma vez observada tais características e para uma definitiva identificação do complexo *S. schenckii* é aconselhável a realização do teste de termo-conversão em BHI ágar (Brain Heart Infusion Ágar) para a fase leveduriforme. O fungo passará a apresentar-se com um aspecto cremoso e com coloração bege-amarelada, não há a formação de conídios, pois o fungo nessa fase se reproduz por brotamento, logo, observa-se microscopicamente estruturas leveduriformes (**Figura 2 (b)**) (Oliveira et al., 2012). Uma vez que os achados da cultura são característicos do complexo *S.schenckii* o diagnóstico laboratorial é confirmatório para esporotricose.

3.4.2 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

No método histopatológico, as estruturas fúngicas são raramente visíveis e por isso são utilizadas técnicas de coloração que envolve o uso de ácido

periódico de Schiff (PAS) e, impregnação por prata pelo método de Grocott (GMS). Coloração histopatológica convencional com hematoxilina e eosina (HE), não é indicada por ser notoriamente difícil a visualização de células leveduriformes. Os três principais achados à histopatologia que se correlacionam com a esporotricose são: 1) Corpos asteróides, que são estruturas fúngicas cercadas por projeções de eosinófilos; 2) Leveduras com forma redonda, oval ou em formato de charuto e 3) Hifas que são raramente observadas (Bickley et al., 1985; Bazziet al., 2016). A eficácia de achados histopatológicos para detecção de estruturas somáticas de *Sporothrix* spp. é considerada controversa. Alguns estudos demonstram que as estruturas fúngicas estão presentes em pequenas quantidades nas lesões e as pesquisas pelo fungo, ocasionalmente, é dada como negativa (Quintella et al, 2011).

3.4.3 DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Testes sorológicos são utilizados para diagnosticar esporotricose extracutânea, que pode atingir o sistema nervoso central (SNC), pulmões e ossos, e por isso se torna difícil a obtenção de espécimes clínicos para análises micológicas (Roberts et al, 1971; Lopes-Bezerra et al., 2006; Almeida-Paes et al., 2007).

Os métodos sorológicos utilizados para o diagnóstico da esporotricose incluem técnicas de imunoprecipitação (imunodifusão dupla e imunoeletroforese), de fixação do complemento, soroaglutinação do látex, imunofluorescência direta, e ELISA (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Blumer et al., 1973; De Albornoz et al., 1984). É necessário destacar que a técnica ELISA surgiu sobrepondo à sensibilidade e especificidade dos outros testes, dados comprovam que com o uso de ELISA a sensibilidade aumentou para 97% e a especificidade para 89%. Apesar disso, reação cruzada com portadores de Leishmaniose tegumentar americana e de paracoccidioidomicose pode ocorrer (Oliveira et al., 2014).

Um estudo realizado por Lopes-Bezerra (1997) encontrou uma subfração, nomeada de SsCBF, de peptidoramnomanana capaz de se ligar à concanavalina-A da parede celular de *S.schenckii*. Logo, Penha e Bezerra (2000) utilizaram tal conhecimento para detectar anticorpos por um teste de ELISA que demonstrou 100% de sensibilidade e um baixo índice de reação cruzada. Outras pesquisas foram realizadas e os índices de sensibilidade e especificidade são mantidos altos, mas pelo fato de que há a existência de reação cruzada com outras infecções, o teste ELISA não é cotado para ser inserido na rotina clínica de diagnóstico (Lopes-Bezerra et al., 2006; Rudramurthy et al., 2017).

3.4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Técnicas moleculares de diagnóstico baseadas na detecção direta de DNA são utilizadas para que, a partir de um espécime clínico, seja possível a identificação a nível de espécie do complexo *Sporothrix spp.* (Chakrabartiet al., 2017).

O diagnóstico molecular baseia-se na amplificação de sequências gênicas do fungo a partir da reação em cadeia da polimerase (PCR) e desde seu surgimento é um método considerado poderoso no diagnóstico de micoses invasivas (extracutâneas). Kano e colaboradores (2001), descreveram a primeira PCR que possibilitou a identificação de *Sporothrix spp.* utilizando iniciadores para o gene codificador da quitina sintase 1 (CHS 1). Durante o estudo foi detectado 10 picogramas (pg) de DNA genômico de *Sporothrix spp.* Depois de alguns anos a técnica passou a ser utilizada para o diagnóstico molecular da esporotricose (Kano et al., 2005).

Quase que paralelamente, Hu e colaboradores (2003) aplicaram uma modificação da técnica convencional de PCR para o diagnóstico molecular da esporotricose. A técnica denominada *nested* PCR (do inglês Nested polymerase chain reaction) foi aplicada utilizando dois pares de primers

SS1/SS2 e SS3/SS4 para amplificação do fragmento de 152 pb da região do gene 18S rRNA. Através dessa técnica, os autores do estudo conseguiram detectar DNA de *Sporothrix spp.* em tecido animal infectado (Gato) e em pacientes com esporotricose já confirmada através do isolamento fúngico em cultura e/ou em testes histopatológicos. A técnica mostrou uma alta sensibilidade e especificidade, trazendo à tona a idéia do seu uso na rotina de diagnóstico da esporotricose. (Hu et al., 2003). Xu e colaboradores (2010) testaram a técnica para avaliar sua eficácia frente a diferentes tipos de mtRNA conhecidos, comprovando que *nested PCR* é eficiente para diferenciar todos os isolados de mtDNA e também na detecção de um fragmento de 152 pb do DNA de *S. schenckii* diretamente de espécimes clínicos (Xu et al., 2010).

O descobrimento de estratégias moleculares que permitiram a identificação de espécies do gênero *Sporothrix* tornou-se importante para elucidação das diferenças exibidas entre as espécies distintas no que se refere à distribuição geográfica, virulência, patogenicidade e suscetibilidade a sensibilidade aos antifúngicos (Chakrabarti et al., 2017). Marimon e colaboradores (2006), baseando-se em estudos anteriores que sugeriam que existiam diferentes linhagens genéticas dentro de *Sporothrix spp.*, foram os pioneiros a realizarem pesquisas para comprovação se essa variação era devido a uma divergência de espécies ou a uma diversidade intraespecífica. Análises moleculares foram realizadas utilizando os genes CHS, tubulina (Bt2) e calmodulina (CAL) e os resultados obtidos demonstraram a existência de três grandes clados (Brasil, Europa e África / alguns países da América do Sul). A conclusão mais lógica foi que *Sporothrix spp.* parecia ser um complexo de espécies, com algumas prevalecendo em diferentes regiões geográficas. O conhecimento de que a completa elucidação das espécies levaria a um padrão clínico específico para cada uma e diferentes respostas a terapêutica era hipotetizado (Marimon et al., 2006). Em 2007, um novo estudo foi realizado mas, desta vez, características fenotípicas foram inclusas na análise em conjunto com o gene calmodulina (CAL) e os respectivos primers CL1 e CL2.

De maneira significativa, concluiu-se que os achados moleculares e fenotípicos se correlacionavam, o que permitiu, o descobrimento de três novas espécies, duas das quais estavam relacionadas a infecções humanas descritas como *S. brasiliensis* e *S. globosa* (Marimon et al., 2007). Por último, em 2008 e utilizando o mesmo padrão de análise descobriu-se mais uma espécie, *Sporothrix luriei*, que viria a compor o complexo *Sporothrix schenckii* (Marimon et al., 2008). Com o constante avanço na pesquisa, Liu X e colaboradores (2013) realizaram uma PCR com amostra clínica de biópsia para avaliação do primer codificador para o gene CHS, S2R2. Dentre os 30 fragmentos de tecido utilizados no ensaio, conseguiu-se identificar *Sporothrix* spp. em 25 destas, com boa reprodutibilidade, alta taxa de confiabilidade (96%) e com diagnóstico em 6 horas (Liu X et al., 2013). A questão da identificação a nível de espécie não era possível, entretanto, Oliveira e colaboradores (2012), utilizaram a técnica de PCR-Fingerprint e o primer universal T3B, conseguindo distinguir as espécies *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, a partir de 35 isolados clínicos

Alguns anos a frente e com a inserção de um painel com novos primers, utilizou-se um ensaio de amplificação gênica em uma única etapa (single-round PCR) que também permitiu a identificação das espécies do complexo *Sporothrix*, *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. pallida*. O ensaio conseguiu identificar entre 1 até 10 pg de DNA genômico dependendo da espécie, e os resultados obtidos demonstraram concordância com a sequência do gene calmodulina, já considerado padrão ouro na identificação de espécies de *Sporothrix* sp. (Rodrigues et al., 2015). Por último, recentemente a PCR em tempo real (RT-PCR) foi útil para identificar espécies de *Sporothrix* e diferencia-las de espécies de Leishmaniose (Rodriguez-Brito et al., 2015).

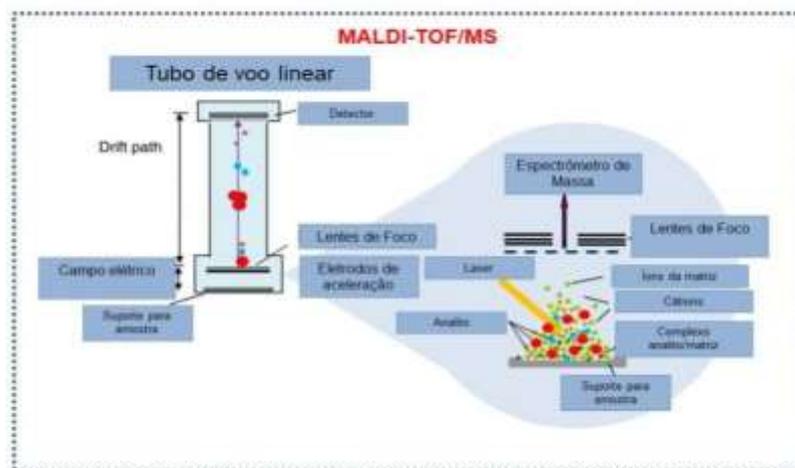
Como a técnica de PCR possui um custo elevado, não sendo tão viável na rotina laboratorial, algumas outras técnicas alternativas são empregadas, pode-se citar: I) A amplificação do DNA polimórfico (do inglês random-amplified

polymorphic DNA-RAPD); II) AFLP (do inglês amplified fragment length polymorphism) III) RFLP (do inglês PCR-restriction fragment length polymorphism) IV) PCR-Fingerprint (Mesa-Arango et al., 2002;Watanabe et al., 2004; Neira et al., 2005; Maria et al., 2008; Rodrigues et al., 2014)

3.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR MALDI-TOF

A espectrometria de massas baseada na ionização e dessorção a laser assistida por matriz acoplada a um analisador de massas do tipo tempo-de-voe (do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization -Time-of-Flight-MALDI-TOF MS*) há muito vem sendo utilizada em pesquisas e identificação de microrganismos (**Figura 4**). Este método físico-químico está cada vez mais inserido em laboratórios de diagnóstico microbiológico, sendo muito útil no processo de classificação e identificação de fungos e bactérias. Durante a análise, espectros de massas de um determinado organismo são obtidos e comparados com espectros de referência de cepas conhecidas possibilitando a classificação e identificação do patógeno com robustez e rapidez, quando comparada com os métodos tradicionais (Cherkaoui et al. 2010, Angeletti, 2016).

Figura 4: Ilustração esquemática do princípio de funcionamento do MALDI-TOFMS para identificação de fungos e bactérias. A incidência do laser no analito/matriz promove a formação de íons que serão acelerados em um tubo a vácuo e separados de acordo com a relação massa/carga durante seu tempo de voo.



Fonte: Adaptado de Wieser et al (2011).

Inicialmente, as primeiras tentativas de identificar microrganismos utilizando a espectrometria de massas aconteceram em 1975, mas os experimentos realizados obtiveram resultados irreprodutíveis (Anhalt e Fenselau, 1975). Apenas com o advento da tecnologia MALDI-TOF MS, em 1980, que macromoléculas, incluindo, proteínas ribossômicas, puderam ser analisadas com eficiência (Hillenkamp et al., 1990). Apesar da tecnologia MALDI-TOF MS ter surgido como uma estratégia de ionização suave para analisar grandes moléculas, posteriormente passou a ser também utilizada para moléculas menores (peptídeos). A preparação para a análise inclui o uso de uma matriz, sensível ao laser, que será misturada com o analito de interesse (microrganismo). Após a secagem da solução matriz/analito, as amostras são colocadas no sistema de vácuo do espectrômetro de massas. Durante o procedimento, a matriz absorve energia e posteriormente volatiliza ou sofre decomposição sobre a irradiação do laser e, transferindo parte da energia ao analito, o qual é liberado em forma de íons carregados, em uma fase gasosa. Os íons liberados são analisados e separados no analisador do tempo

de voo (TOF). Para isso, esses íons são submetidos a uma diferença de potencial, geralmente a 20KV, que promove sua aceleração através do analisador do tempo de voo. A separação ocorre de acordo com o tempo de voo de cada íon, onde os que possuem uma maior massa viajarão mais lentamente do que aqueles com massas menores (Kussmann et al., 1997; Aebersold et al., 2003; Kicman et al., 2007).

No campo da micologia, a espectrometria de massas vem sendo aplicada, permitindo a obtenção de espectros individuais de táxons fúngico. Destaque-se, a notável reprodutibilidade da técnica norteada pela análise de proteínas entre 2.000 e 20.000 Dáltons, com o possível uso de proteínas ribossomais como importantes biomarcadores durante o processo de análise. Em relação a sua utilização para identificação de *Sporothrix* spp., os sistemas MALDI comercialmente disponíveis não possuem uma base de dados que permita diferenciar as espécies que compõem o complexo, mas pesquisas recentes reuniram esforços para geração de dados espectrais para identificação de isolados clínicos de *Sporothrix*. Como resultado, Oliveira e colaboradores (2015) conseguiram utilizar o MALDI-TOF MS para distinção de cepas de *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. pallida*, permitindo a identificação de todos os isolados em nível de espécie. Recentemente, um caso clínico suspeito de esporotricose, com apresentação clínica de uma lesão infiltrativa subconjuntival no olho direito foi confirmado utilizando-se a técnica MALDI-TOF MS. Os espectros obtidos possuíam picos iônicos referentes ao perfil de massa molecular de *S. brasiliensis* (Oliveira et al., 2015; Matos et al., 2020). A técnica MALDI-TOF MS é uma ferramenta promissora para a identificação de fungos na rotina laboratorial, com a implementação e validação de base de dados internos e o uso de procedimentos padronizados, poderá se obter resultados comparáveis aos do sequenciamento gênico (Gómez-Velásquez et al., 2021)

3.6 EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE

A esporotricose é uma infecção micótica subcutânea que possui maior prevalência em áreas tropicais e subtropicais, regiões com alto índice de umidade (80 a 95%) (Crothers et al., 2009; DuangKaew et al., 2019). Sendo considerada endêmica na América Latina (Díaz, 1989; Da Rosa et al., 2005; Schubach et al., 2008). A partir do descobrimento que *S. schenckii* é um complexo de espécies, se passou a ter o entendimento que todas possuem diferenças significativas em sua distribuição geográfica (**Figura 5**), nas suas características bioquímicas, no seu grau de virulência, no padrão de manifestação da doença e na resposta à terapêutica (Mahajan, 2014).

O complexo de espécies fúngicas causadoras da esporotricose compreende quatro espécies de importância clínica: I) *S. brasiliensis*; II) *S. globosa*, III) *S. luriei* e IV) *S. schenckii* sensu stricto, originalmente descrita por Hekton & Perkins, 1900 e duas de importância ambiental: I) *S. mexicana* e II) *S. pallida* (Marimon et al 2007; Marimon et al 2008; de Meyer et al 2008; Romeo et al., 2011). Todas diferem em relação a sua localização no globo terrestre (**Tabela 1**).

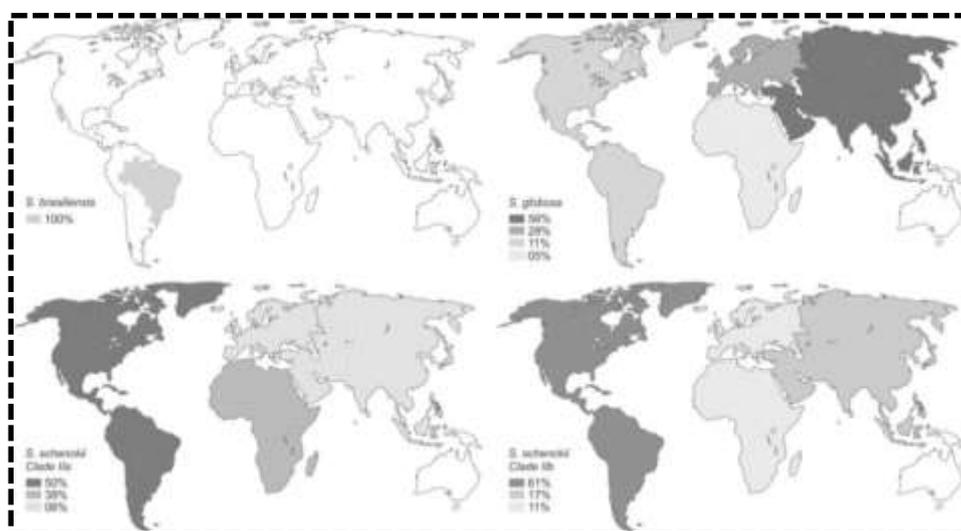
Tabela 1: Distribuição global das espécies do complexo *Sporothrix schenckii*.

Espécie	Distribuição Geográfica
<i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i>	Américas, Ásia, África e Europa
<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Brasil
<i>Sporothrix globosa</i>	Europa, Estados Unidos, América do Sul e Ásia
<i>Sporothrix luriei</i>	África, Brasil, Índia e Itália
<i>Sporothrix chilensis</i>	Chile e Brasil
<i>Sporothrix mexicana</i>	Austrália, México e Portugal

Fonte: Chakrabarti et al. (2015).

Com o estudo da incidência da esporotricose em todo o mundo percebe-se que essa micose ocorreu em diferentes épocas, países e continentes. O primeiro caso de esporotricose surgiu em 1886 e foi descrito para a comunidade científica por Benjamin Schenck, em 1889. Desde então, a esporotricose é relatada em diversas regiões geográficas (Dixon et al., 1991; Marimon et al., 2006; Verma et al., 2012; Zhou et al., 2014).

Figura 5: Representação espacial da distribuição mundial da esporotricose.



Fonte: Chakrabarti et al (2015).

Na Europa, particularmente em Paris, o primeiro caso ocorreu sete anos após o primeiro relato de Benjamin Schenck. Apenas nove anos depois, Beurmann e o seu colaborador, Henri Gougerot, compilaram um artigo detalhado sobre 200 indivíduos diagnosticados com esporotricose, uma quantidade considerada expressiva em um tempo relativamente curto desde o primeiro caso descrito no continente Europeu (Carlos e Zeppone, 2015). Entretanto, no período compreendido entre 1914 até 1918, inexplicavelmente, a esporotricose desapareceu em quase toda a Europa. Atualmente, os registros de casos são limitados à Itália e Espanha. (Alberici et al., 1989; Lopes-Bezerra e Nascimento, 2012). Na Itália foram identificados nichos ecológicos de *Sporothrix* spp. na região sul e no Mediterrâneo. Torna-se notório isto quando

se observa o número de indivíduos acometidos, no período entre 1962-1992, um total de 58 casos foram registados, sendo a maioria (42 casos) do sul da Itália. Em 2008, foi publicado um caso de paciente com 64 anos, em Vibo Valentia (região Sul), imunocompetente, que apresentava vários nódulos ulcerativos na região dos membros superiores. Nesse mesmo período, um primeiro caso de esporotricose em Calabria (região Sul) foi registrado e por último, um relato foi publicado para descrever esporotricose nasal canina (Barile et al., 1993; Carfachia et al., 2007; Criseu et al., 2008). Em relação a outros locais na Europa, há registro de esporotricose em Portugal e também na província de Barcelona, no Mediterrâneo (Ventin et al., 1987; Dias et al., 2011; Chakabarti et al., 2015).

Na África, a esporotricose é relatada devido ao amplo exercício da atividade mineradora na região, local em que muitos trabalhadores sofrem lesões na pele que se tornam porta de entrada para espécies do complexo *S. schenckii*. Ademais, nas minas de ouro, existem condições ideais de temperatura e umidade para o desenvolvimento fúngico. O primeiro caso de esporotricose na África ocorreu em 1914 e, ao longo dos anos, um pequeno surto relacionado com a mineração foi relatado em 1927 (McCarty et al., 2014). É importante destacar que existe registro de uma maior incidência de esporotricose sem estar relacionada com a mineração, por exemplo, entre 1959-1961, casos foram relatados em Pretoria e estavam interligados com o manuseio de matéria orgânica contaminada. Em anos posteriores, algumas províncias e as localidades de Zimbabwe, Nigéria, Sudão e África do Sul registraram a ocorrência de esporotricose. O estudo sobre a epidemiologia da esporotricose na África ainda é insuficiente, a carência de laboratórios de micologia limitam o mapeamento fidedigno em todo o continente (Ross et al., 1968; Gumaa, 1978; Jacyk et al., 1981).

No continente asiático, a esporotricose possui maior incidência na China, no Japão e na Índia. Os casos relatados envolvem indivíduos que praticam

atividades de horticultura e agricultura (Kikuchi et al., 2006; Moussaet al., 2017). Acredita-se que fatores ecológicos promovam o crescimento e a viabilidade de *S. schenckii* nessas regiões, entretanto, em outras partes da Ásia que compartilham as mesmas condições ambientais a esporotricose é raramente mencionada (Kwangsukstithet al., 1990; Quintal et al., 2000; Chakrabartiet al., 2011).

Na China, a esporotricose foi pela primeira vez relatada em 1916 por Xinde Diao, mas o isolamento do fungo apenas foi realizado em 1951 por Guoliang Yang (Wu, 1991; Chakrabartiet al., 2015). Desde então, diversos estudos ecológicos foram realizados e descreveram a presença generalizada de *S. schenckii* na natureza em diferentes regiões da China (Jinet al., 1994; Jiang et al., 2001; Tian et al., 2004; Ji Q et al., 2010). Em maior parte das províncias da China a esporotricose é descrita, mas Jilin (Nordeste da China), é notoriamente a província mais afetada. Um levantamento epidemiológico recente, envolvendo o estudo de casos de esporotricose em crianças de 0 a 14 anos, demonstrou que nos últimos anos as crianças da província de Jilin foram fortemente afetadas. Ao todo foram 704 crianças diagnosticadas com esta micose entre os anos de 2010 até 2016, e ficou claro para os pesquisadores que a manifestação da doença ocorria mais em temperaturas frias e que possivelmente está atrelada ao manuseio de matéria orgânica contaminada, com uma maior probabilidade para pés de milho em decomposição que são utilizados para fazer fogo nesta região (Yao et al., 2019). Estudos moleculares indicaram que *S. globosa* é a espécie mais prevalente em todo o território chinês (Yu et al., 2013; Liu et al., 2014).

No Japão, os primeiros relatos de esporotricose surgiram antes do fim da segunda guerra mundial e após a mesma, no período de 1946-1982, foram registrados 2.500 casos (Fukushiro, 1984). A esporotricose, no cenário atual, é rara no Japão. Estudos epidemiológicos realizados pela Sociedade Japonesa de Micologia Médica comprovam a baixa incidência de esporotricose no país,

dentre 8.717 casos de dermatomicoses no ano de 2006, apenas quatro foram causados por *Sporothrix* spp. (Nishimoto, 2006). Ainda não se tem clareza sobre o que resultou nessa expressiva diminuição de casos, entretanto, a mudança na prática do trabalho rural é uma das hipóteses.

Na Índia, o primeiro caso surgiu em 1932 e até os tempos atuais a esporotricose ocorre em toda a Índia, mas especialmente na região de Kangra, no estado de Himachal Pradesh, é considerada uma micose endêmica. Como em toda a Ásia a via de contaminação é o manuseio de matéria orgânica contendo o fungo como o solo e caule de milho (Ghosh, 1932). O tipo clínico mais comum de esporotricose na Índia é a linfocutânea e assim como em outras partes do continente asiático os isolados são na grande maioria identificados como *S. globosa* (Padhye et al., 1992; Bhutia et al., 2011).

No continente americano, a esporotricose ocorre nos Estados Unidos da América (EUA), na América Latina, com áreas endêmicas no Brasil, México, Costa Rica, Uruguai e na Guatemala. Historicamente, a principal via de contaminação da esporotricose nesses países, assim como em outras partes do mundo, se relacionava com algum modo de inoculação do fungo através do manuseio de matéria orgânica vegetal em decomposição (Sampaio et al., 1954; da Rosa et al., 2005). Casos de transmissão zoonótica sempre foram mencionados como eventos isolados e pequenos surtos que envolviam gatos e tatus (Conti-Diaz et al., 1980; Dunstan et al., 1986; Marques et al., 1993). No Uruguai, por exemplo, ocorreu um número considerável de casos associados à manipulação das tocas dos tatus e arranhões infligidos por eles em humanos (Conti-Diaz et al., 1980). Em relação aos felinos, desde 1980, os gatos tem incitado a atenção no processo de transmissão da esporotricose para humanos, quer sejam, veterinários, cuidadores ou proprietários dos animais (Davis et al., 1996). Em 1982, Read e Sperling, relataram um pequeno surto envolvendo cinco pessoas expostas a um gato com esporotricose (Read et al., 1982). Entretanto, epidemias envolvendo um grande número de pessoas e uma

grande amplitude geográfica não existiam e eram consideradas raras. Até então, a contaminação ainda ocorria principalmente por meio de fontes ambientais (Brown et al., 1947; Dixon et al., 1991). É o que deixa claro a literatura, onde os registros até então existentes de outra via de transmissão, como no caso da zoonótica, eram apenas de pequenos surtos com rápido controle e baixíssima proliferação. Com destaque, para o relato documentado no Brasil, em São Paulo (SP) de quatro gatos e três humanos que foram diagnosticados com esporotricose (Marques et al., 1993).

Esse cenário começou a mudar quando no Brasil, especificamente no Estado do Rio de Janeiro (RJ), ocorreu um grande surto de esporotricose transmitida para humanos via arranhadura ou mordedura de gatos no ano de 1998. No período compreendido entre 1987-1997, antes do grande surto, apenas 13 casos de esporotricose humana foram registrados pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), RJ. Apenas dois desses pacientes, um em 1991 e o outro em 1997, relataram que suas lesões surgiram em locais que foram anteriormente arranhados por gatos (Barros et al., 2001). Essa incidência logo mudaria no primeiro ano do surto em 1998, quando nove casos de esporotricose humana foram observados, dos quais, três reportaram arranhadura de gato e apresentaram lesões cutâneas. Desde então, de 1998 até 2004, cresceu vertiginosamente o número de indivíduos afetados, incidindo em 759 humanos, 1.503 gatos suspeitos e 64 gatos diagnosticados com esporotricose pelo IEC (Schubach et al., 2008). Tornando a cidade do Rio de Janeiro o centro de uma epidemia de esporotricose. O isolamento de *S. schenckii* das lesões cutâneas e dos fragmentos das unhas dos gatos trouxe à tona a hipótese de transmissão zoonótica através da mordedura ou arranhadura dos felinos (Schubach et al., 2001; Oliveira et al., 2019).

No cenário atual, existem mais de 5.000 casos de esporotricose registrados, fazendo com que essa micose esteja entre as principais causas infecciosas de hospitalização e mortalidade no Rio de Janeiro (RJ). Pacientes

portadores de HIV apresentam-se como indivíduos com maior risco de evoluir à óbito. (Freitas et al., 2012; Rodrigues et al., 2020).

Em relação a outras localidades do território brasileiro, observa-se um processo de expansão geográfica da doença. Na região nordeste, por exemplo, a esporotricose era relatada em casos pontuais (Filgueira, 2009; Nunes et al., 2011; Araújo et al., 2016). Entretanto, no estado de Pernambuco, Silva (2019), registrou um surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife e, paralelamente, Lacerda-Filho (2019) retratou o primeiro caso de transmissão zoonótica na região. Um paciente jovem com prévio contato com gato, apresentou um caso atípico de esporotricose ocular. Desde então, outros casos são retratados na literatura, como por exemplo, 4 pacientes com esporotricose transmitida por gatos, que apresentaram uma manifestação clínica mais grave, a esporotricose disseminada (Valeriano et al., 2020). Ainda, um quadro de apresentação clínica distinto, onde 10 pacientes foram diagnosticados com síndrome de sweet foi descrito (Lima et al., 2020). Recentemente, Bento (2021), retratou a propagação da esporotricose no estado do Rio Grande do Norte. No período compreendido entre outubro de 2016 a dezembro de 2019, 122 pacientes foram diagnosticados com esporotricose, dentre estes, 115 relataram contato prévio com gatos. Diante do exposto, a esporotricose configura-se como uma doença tropical negligenciada e de incidência crescente no Brasil (Bento et al., 2021).

3.7 ESPOROTRICOSE EM GATOS E CÃES

Nos últimos anos, a rota clássica de contaminação da esporotricose sofreu mudanças. O surto registrado no Rio de Janeiro, trouxe para o cenário epidemiológico uma nova rota de contaminação através de animais, com destaque para os felinos. De acordo com o Instituto Evandro Chagas (IPEC)/ Fundação Oswaldo Cruz, entre 1998, início do surto, até 2011, um total de 3.804 gatos foram contaminados. A esporotricose em gatos é relatada em

outras partes do globo terrestre, entretanto, nenhum surto como o ocorrido no Brasil havia acontecido. A manifestação clínica da esporotricose em gatos é ampla e pode variar entre formas subclínicas até progressão para múltiplas lesões cutâneas, podendo se tornar sistêmicas. No geral, gatos machos, adultos, não castrados são os mais afetados, as principais regiões acometidas pela esporotricose são a cabeça (nariz), geralmente com múltiplas lesões (**Fig 3**). As lesões cutâneas múltiplas são características e envolvem a mucosa do trato respiratório do animal. O tratamento da esporotricose felina é longo e de difícil continuidade, requerendo persistência por parte dos proprietário e/ou cuidadores (Gremião et al., 2015). Infelizmente, nem todos os gatos repondem bem a terapêutica.

Figura 3: Esporotricose felina em a) lesões faciais e em b) ulceração no nariz.



Fonte: Gremião et al (2015).

A esporotricose felina foi pela primeira vez relatada em 1971 por Werner e colaboradores (Werner et al., 1971). Estudos posteriores foram realizados na Califórnia, um grupo de diferentes espécies de mamíferos diagnosticados com esporotricose foram avaliados, dos 23 casos, 14 eram gatos. Sem dúvida, fica claro, que os gatos são comumente os mais afetados (Crothers et al., 2009).

Ainda, durante o grande surto ocorrido no Brasil, os cães apareceram entre os animais afetados, mesmo que em menor quantidade quando comparado com os gatos. Entre 1998 até 2014, 244 cães foram diagnosticados

com esporotricose no Rio de Janeiro. Entretanto, a transmissão zoonótica através dos cães não foi relatada durante o surto no Rio de Janeiro. Os cães apresentam uma baixa carga fúngica nas suas lesões, isso pode explicar o fato de não serem considerados transmissores da esporotricose para humanos (Montenegro et al., 2014; Gremião et al., 2017). E em cerca de 80 % dos casos, os cães foram infectados por entrarem em contato com gatos contaminados. A forma cutânea é a mais frequentemente descrita em cães, úlceras e/ou nódulos na cabeça, orelha pescoço, costas e toráx são os sinais clínicos encontrados. Sinais extracutâneos com envolvimento de sintomas respiratórios (espirros, dispneias e corrimento nasal) também podem ser observados. Por último, na maioria dos casos, encontra-se a manifestação da linfadenite (Viana et al., 2018).

4-BIBLIOGRAFIA

Aebersold, R. et al.. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, 2003.v.422, n. 6928, p. 198-207.

Alberici, F. et al. Sporothrix schenckii var luriei as the cause of sporotrichosis in Italy. **European journal of epidemiology**,1989. v. 5, n. 2, p. 173-177.

Alchorne, M. et al. Inquérito epidemiológico com esporotriquina em Mogi das Cruzes-SP. **An. bras. dermatol**,1990. v. 65, n. 5a, supl, p. 45-48S.

Almeida, H. et al. Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Rev. Inst. Med. Trop**, 2009. v. 51, n.4, p. 237–238.

Almeida-Paes, R. et al. Use of mycelial-phase Sporothrix schenckii exoantigens in an enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of sporotrichosis by antibody detection. **Clinical and Vaccine Immunology**, 2007. v. 14, n. 3, p. 244-249.

Al-Tawfiq JA, Wools KK. Disseminated sporotrichosis and Sporothrix schenckii fungemia as the initial presentation immunodeficiency virus infection. **Clin Infect Dis**, 1998. v. 26, n. 6 , p. 1403-1406.

Andrianopoulos. Thermally dimorphic human fungal pathogens—polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 2015. v. 5, n. 8, p. a019794.

Angeletti, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, 2017. v. 138, p. 20-29.

Anhalt, J. P.; Fenselau, C. Identification of bacteria using mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 1975. v. 47, n. 2, p. 219-225.

Araujo, A.K. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. **Pubvet**, 2016. v. 10, p. 795-872.

Arenas, R. et al. Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. **J. Fungi**, 2018. v. 4, n. 2, p. 62.

Barile, F. et al. Cutaneous sporotrichosis in the period 1978–1992 in the province of Bari, Apulia, Southern Italy. **Mycoses**, 1993. v. 36, n. 5-6, p. 181-185.

Barros, M. et al. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases**, 2004. v. 38, n. 4, p. 529-535.

Barros, M. et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2001. v. 96, n. 6, p. 777-779.

BAZZI, T. et al. Características clínico-epidemiológicas, histomorfológicas e histoquímicas da esporotricose felina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2016. v. 36, n. 4, p. 303-311.

Berbee, ML, Taylor, JW. 18S ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*. **Exp Mycol**, 1992. v.16, n. 1, p. 87-91.

Bhutia, P. et al. A case series and review of sporotrichosis in Sikkim. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 2011. v. 5, n. 8, p. 603-608.

Bickley, L. et al. Fixed cutaneous sporotrichosis: unusual histopathology following intralesional corticosteroid administration. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 1985. v. 12, n. 6, p. 1007-1012.

Blumer, S. et al. Comparative evaluation of five serological methods for the diagnosis of sporotrichosis. **Appl. Environ. Microbiol**, 1973. v. 26, n. 1, p. 4-8.

Boechat, J. et al. Feline sporotrichosis: associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018. v. 113, n. 3, p. 185-196.

Brown, R. et al. Sporotrichosis infection on Mines of the Witwatersrand. **J Cutan Med Surg**, 1947. v. 4, n. 1, p. 51-54.

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

Carlos, I. (Ed). Sporotrichosis: new developments and future prospects. **Springer**, 2015.

Carmichael JW. Chrysosporium and some other aleuriosporic hypomyces. **Canad J Bot**, 1962. v. 40, n. 8, p. 1137–1173.

Castro, R. et al. Differences in cell morphometry, cell wall topography and Gp70 expression correlate with the virulence of *Sporothrix brasiliensis* clinical isolates. **PLoS One**, 2013. v. 8, n. 10, p. e75656.

Chakrabarti A. et al. Global epidemiology of sporotrichosis. **Med Mycol**, 2015. v. 53, n. 1, p. 3–14.

Chakrabarti, A. et al. Endemic fungal infections in the Asia-Pacific region. **Medical Mycology**, 2011. v. 49, n. 4, p. 337-344..

Chandler F. et al. A Colour Atlas and Textbook of Histopathology of Mycotic Diseases. **Wolfe Medical Publications Ltd**, 1980.

Cherkaoui, A. et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. **Journal of clinical microbiology**, 2010. v. 48, n. 4, p. 1169-1175.

Clara G. et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Medical Mycology**, 2008. v. 46, n. 2, p. 141-151.

Conti-Diaz, et al. Sporotrichosis in Uruguay: epidemiologic and clinical aspects. In: **Anon.: Proceedings of the fifth International Conference on the Mycoses. Superficial, cutaneous and subcutaneous infections. Caracas, Venezuela, 27-30 April 1980.** Pan American Health Organization., 1980. p. 312-321.

Costa, R. et al. Sporotrichosis in pregnancy: case reports of 5 patients in a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Anais brasileiros de dermatologia**, 2011. v. 86, n. 5, p. 995-998.

Criseo, G. et al. Lymphocutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient: a case report from extreme southern Italy. **Mycopathologia**, 2008. v. 166, n. 3, p. 159-162.

Crothers, SL. et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987–2007). **Veterinary dermatology**, 2009. v. 20, n. 4, p. 249-259.

Curi, AL. et al. Retinal granuloma caused by *Sporothrix schenckii*. **Am J Ophthalmol**, 2003. v. 136, n.1 p. 205-207.

Da Rosa, A. et al. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2005. v. 52, n. 3, p. 451-459.

Davies, C. Deep mycotic infections in cats. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 1996. v. 32, n. 5, p. 380-391..

De Albornoz, et al. Application of immunoprecipitation techniques to the diagnosis of cutaneous and extracutaneous forms of sporotrichosis. **Mycopathologia**, 1984. v. 85, n. 3, p. 177-183.

De Ávila A. et al. Experimental cutaneous sporotrichosis: in vivo evaluation of itraconazole and terbinafine. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2009. v. 42, n. 6, p 706-710.

De Beer ZW., et al. Phylogeny of the *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, v. 95, n. 3, p. 434–441.

De Oliveira Bento, A. et al. A disseminação da esporotricose transmitida por gatos por *Sporothrix brasiliensis* no Brasil em direção à região Nordeste. **PLoS Neglected Tropical Diseases** , 2021. v. 15, n. 8, p. e0009693.

DE OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista et al. Rapid identification of *Sporothrix* species by T3B fingerprinting. **Journal of clinical microbiology**, 2012, v. 50, n. 6, p. 2159-2162.

De Carvalho A. et al. Sporotrichosis with bone involvement: an alert to an occupational disease. **Case Reports in Dermatology**, 2014. v. 6, n. 1, p. 114-118.

De Hoog, et al. Atlas of clinical fungi. **Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)**, 2000.

De Lima Barros, MB. et al. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical microbiology reviews**, 2011. v. 24, n. 4, p. 633-654.

De Lima Barros, MB. et al. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole—study of 645 patients. **Clinical Infectious Diseases**, 2011. v. 52, n. 12, p. e200-e206.

De Meyer, M. et al. Taxonomy and phylogeny of new wood-and soil-inhabiting *Sporothrix* species in the *Ophiostoma stenoceras*-*Sporothrix schenckii* complex. **Mycologia**, 2008. v. 100, n. 4, p. 647-661.

De Sousa, E. et al. Fatores que influenciam os testes de suscetibilidade de drogas antifúngicas: uma revisão crítica do documento M27-A4 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Jornal Brasileiro de Microbiologia** , 2020. p. 1-10.

Dias, N. et al. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal. **Emerging infectious diseases**, 2011. v. 17, n. 10, p. 1975.

Díaz, IAC. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, 1989. v. 108, n. 2, p. 113-116.

Dixon, DM. et al. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest US epidemic of sporotrichosis. **Journal of clinical microbiology**, 1991. v. 29, n. 6, p. 1106-1113.

Do Monte Alves, et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2020. v. 14, n. 5, p. e0008141.

Duangkaew, L. et al. Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. **Medical mycology case reports**, 2019. v. 23, p. 46-49.

Dunstan, RW. et al. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 1986. v. 15, n. 1, p. 37-45.

Escudie A, Gaxotte P. Adaptation de *Ceratocystis stenoceras* (Robak) C. Moreau a la vie parasitaire chez l'animal Etude de la souche sauvage et des mutants pathogenes. Comparaison avec *Sporothrix schenckii* Hektoen et Perkins. **Rev Mycol**, 197. v 36, p. 3-25.

Fernandes, GF et al. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. **Virulence**, 2013. v. 4, n. 3, p. 241-249.

Figueira K.D. Esporotricose na espécie canina: Relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciênc. Anim. Bras**, 2009. v. 10, n. 2, p. 673-677.

Francesconi, G. et al. Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2009. v. 23, n. 11, p. 1273-1276.

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

Freitas, DF et al. Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Sabouraudia**, 2012. v. 50, n. 2, p. 170-178.

Fukushiro, R. Epidemiology and ecology of sporotrichosis in Japan. **Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie**, 1984. v. 257, n. 2, p. 228-233.

Ghosh.L.M. An unusual case of sporotrichosis. **Indian Med Gaz** 1932. v. 67, p. 570.

Gómez, BL. et al. Melanin and fungi. **Current opinion in infectious diseases**, 2003. v. 16, n. 2, p. 91-96.

Gómez-Velásquez, J.C. et al. MALDI-TOF MS: Fundamentos e uma abordagem prática para a identificação de fungos filamentosos clinicamente relevantes. **Curr Fungal Infect Rep**, 2021. p. 1-9.

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

Gremião, et al. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. **Medical mycology**, 2015. v. 53, n. 1, p. 15-21.

Gremião, et al. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. **PLoS Pathogens**, 2017. v. 13, n. 1., p. e1006077.

Gumaa, S. A. Sporotrichosis in Sudan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 1978. v. 72, n. 6, p. 637-640.

Hekton L., Perkins CF. Refractory subcutaneous abscess caused by *Sporothrix schenckii*: a new pathogenic fungus. **J Exp Med**, 1900. v. 5, p 77-89.

Hadrich, I. A. Epidemiologia da susceptibilidade antifúngica: Revisão da literatura. **Journal de mycologie medicale** , 2018. v. 28, n. 3, p. 574-584.

Hillenkamp, F. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. v. 193, p. 280-295.

Howard DH. Dimorphism of *Sporotrichum schenckii*. **J Bacteriol**, 1961. v. 81, p 464–469.

Ishida, K. et al. Efficacy of a poly-aggregated formulation of amphotericin B in treating systemic sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Medical Mycology**, 2018. v. 56, n. 3, p. 288-296.

Itoh, et al. Survey of 200 cases of sporotrichosis. **Dermatology**, 1986. v. 172, n. 4, p. 209-213.

Jacyk, W.K. et al. Deep mycoses in West Africa: a report of 13 cases and review of the Nigerian literature. **Journal of the National Medical Association**, 1981. v. 73, n. 3, p. 251.

Ji Q. et al. The ecologic features of *Sporothrix schenckii* and dematiaceous fungi in Jinwan district of Zhuhai City in Guangdong Province. **Diag Ther J Dermatovenereology**, 2010. v.17, n. 1, p. 28–30.

Jiang, C. et al. Study on ecology of *Sporotrichum schenckii* and dematiaceous fungi in Ulan Hot. **Journal of clinical Dermatology-Nanjing-**, 2001. v. 30, n. 4, p. 223-224.

JIN, X. Isolation of *Sporothrix* from reed and soil. **Chinese Journal of Dermatology**, 1994. n. 05.

Kano, R. et al. Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene. **Mycoses**, 2001. v. 44, n. 7-8, p. 261-265.

Kano, R. et al. Molecular diagnosis of feline sporotrichosis. 2005.

Kauffman, C.A. et al. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, 2007. v. 45, n. 10, p. 1255-1265.

Kicman, A.T. An introduction to mass spectrometry based proteomics—detection and characterization of gonadotropins and related molecules. **Molecular and cellular endocrinology**, 2007. v. 260, p. 212-227.

Kikuchi, I. et al. Usefulness of itraconazole for sporotrichosis in Japan: study of three cases and literature comparison of therapeutic effects before and after

release on the market. **European Journal of Dermatology**, 2006. v. 16, n. 1, p. 42-47.

Kurosawa, A. et al. Endoftalmite por *Sporothrix schenckii* em paciente com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. **Arquivos de oftalmologia**, 1988. v. 106, n. 3, pág. 376-380.

Kussmann, M. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. **Journal of Mass Spectrometry**, 1997. v. 32, n. 6, p. 593-601.

Kwangsukstith, C. et al. Cutaneous sporotrichosis in Thailand: first reported case. **Mycoses**, v. 33, n. 11-12, p. 513-518, 1990.

Kwon-Chung, K. Medical mycology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 1992. v. 34, n. 6, p. 504-504.

Lacerda et al. High-virulence cat-transmitted ocular sporotrichosis. **Mycopathologia**, 2019. v. 184, n. 4, p. 547-549.

Lawless, TK. The Diagnosis of Sporotrichosis. **Archives of Dermatology**, 1930. v. 22, n.3, p. 381.

Lázaro, AP. et al. Esporotricose pulmonar: relato de caso. **Pulmão RJ**, 2008. v. 17, n. 2-4, p. 101-104.

Lima I.M.F. et al. Case Report: Sweet Syndrome in Patients with Sporotrichosis: A 10-Case Series. **Am.J.Trop.Med. Hyg**, 2020. n. 103, v. 6, p. 2533-2538.

Liu, T.T. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, 2014. v. 15, n. 1, p. 100-108.

Liu, X. et al. Rapid identification of *Sporothrix schenckii* in biopsy tissue by PCR. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2013. v. 27, n. 12, p. 1491-1497.

Lopes-Bezerra, et al. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 2006. v. 78, n. 2, p. 293-308.

Lutz A., Splendore A. About a mycosis observed in men and rats. **Rev Med Sao Paulo**, 1907. v. 21, p. 433-450.

Manhart JW, et al. Articular and cutaneous sporotricho- In summary, the optimal therapy for disseminated sporotrichosis. **JAMA**, 1970. v.214, p. 365-367.

Mariat F. Adaptation de *Ceratocystis* a la vie parasitaire chez l'animal-Etude de l'acquisition d'un pouvoir pathogene comparable a celui de *Sporothrix schenckii*. **Sabouraud**, 1971. v 9, n. 3, p.191-205.

Marimon, R. et al. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2006. v. 44, n. 9, p. 3251-3256.

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

Marimon, R. et al. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. **Sabouraudia**, 2008. v. 46, n. 6, p. 621-625.

Marimon, R. et al. Suscetibilidades antifúngicas in vitro de cinco espécies de Sporothrix. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** , 2008. v. 52, n. 2, p. 732-734.

Marques, S. A. et al. Esporotricose do gato doméstico (Felis catus): transmissão humana. **Revista do instituto de Medicina tropical de São Paulo**, 1993. v. 35, n. 4, p. 327-330.

Marques-Melo E.H. et al. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de alagoas. **Revista Bahiana Saúde Públ**, 2014.v. 38, n.2, p. 490-498

Matos, A.M.F. et al. Identification by MALDI-TOF MS of Sporothrix Brasiliensis isolated from a subconjunctival infiltrative lesion in an immunocompetent patient. **Microorganisms**, 2020. v. 8, n. 1, p. 22.

Matter SE, et al. . Immune deficiency presenting as disseminated sporotrichosis **J Okla State Med Assoc**, 1984. v.77, p.114–117.

Mccarty, T.P. The evolving epidemiology of sporotrichosis. **Current Fungal Infection Reports**, 2014. v. 8, n. 4, p. 255-26.

Mesa-arango, et al. Phenotyping and genotyping of Sporothrix schenckii isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. **Journal of clinical microbiology**, 2002. v. 40, n. 8, p. 3004-3011.

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

Mora-Montes, H.M. et al. Current progress in the biology of members of the *Sporothrix schenckii* complex following the genomic era. **FEMS Yeast Res.** 2015. v. 15, n. 6.

Morris-Jones R. Sporotrichosis. **Clin Exp Dermatology**, 2002.v. 27, p.427-431.

Moussa, T. et al. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. **Journal of medical microbiology**, 2017. v. 66, n. 5, p. 560-569.

Neyra, E. et al. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of clinical microbiology**, 2005. v. 43, n. 3, p. 1348-1352.

Nishimoto, K. An epidemiological survey of dermatomycoses in Japan, 2002. **Japanese journal of medical mycology**, 2006. v. 47, n. 2, p. 103-111.

Nunes G.D.L et al. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** 2011.v.14, n. 2, p.157-161.

Oliveira, J. C. Tópicos em micologia médica. **Rio de Janeiro**, 2012. v. 3.

OLIVEIRA, Daniele C. et al. Susceptibilidades antifúngicas de *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis* e *S. luriei* do complexo *S. schenckii* identificado no Brasil. **Jornal de microbiologia clínica** , 2011. v. 49, n. 8, pág. 3047-3049.

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**, 2019. v. 114.

Oliveira, M.M.E. et al. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. **Revista iberoamericana de micologia**, 2014. v. 31, n. 1, p. 2-6.

OLIVEIRA, Manoel Marques E. et al. A case of sporotrichosis caused by different *Sporothrix brasiliensis* strains: mycological, molecular, and virulence analyses. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2019. v. 114, e190260.

Orofino Costa, RC. et al. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogeny, laboratory and clinical-therapeutics. **An Bras Dermatol** 2017. v. 92, n.5, p. 606-620.

Padhye, AA. et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. **Journal of clinical microbiology**, 1992. v. 30, n. 9, p. 2492-2494.

PAPPAS, P. et al. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical infectious diseases**, 2000. v. 30, n. 1, p. 65-70.

Pereira, L. et al. The use of MALDI-TOF ICMS as an alternative tool for *Trichophyton rubrum* identification and typing. **Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica**, 2014. v. 32, n. 1, p. 11-17.

Previato, J. et al. Soluble and insoluble glucans from different cell types of the human pathogen *Sporothrix schenckii*. **Experimental Mycology**, 1979. v. 3, n. 1, p. 92-105.

Queiroz-Telles, F. et al. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi**, 2019. v. 5, n. 1, p. 8.

Quintal, D. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. **Journal of cutaneous medicine and surgery**, 2000. v. 4, n. 1, p. 51-54.

Quintella, L.P. et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: a series of 119 consecutive cases. **Journal of cutaneous pathology**, 2011. v. 38, n. 1, p. 25-32.

Read, S. Feline sporotrichosis: transmission to man. **Archives of dermatology**, 1982. v. 118, n. 6, p. 429-431.

Rippon, JW. et al. **Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**, 1982.

Roberts, G.D. Larsh, H.W. The serologic diagnosis of extracutaneous sporotrichosis. **American journal of clinical pathology**, 1971. v. 56, n. 5, p. 597-600.

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

Rodrigues, A.M. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**, 2016. v. 12, n. 7, p. e1005638.

Rodrigues, A.M. et al. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 2014. v. 78, n. 4, p. 383-387.

Rodríguez-Brito, S. et al. Differential identification of *Sporothrix* spp. and *Leishmania* spp. by conventional PCR and qPCR in multiplex format. **Medical mycology**, 2015. v. 53, n. 1, p. 22-27.

Ross, M. et al. Deep fungal infections in Rhodesia—a 10-year survey of histological material. **Central African Journal of Medicine**, 1978. v. 24, n. 12, p. 262-267.

Rossow, J. A. et al. A one health approach to combatting *Sporothrix brasiliensis*: Narrative review of an emerging zoonotic fungal pathogen in south america. **Journal of Fungi**, 2020. v. 6, n. 4, p. 1–27.

Rudramurthy, S.M. et al. Sporotrichosis: Update on diagnostic techniques. **Current Fungal Infection Reports**, 2017. v. 11, n. 3, p. 134-140.

Ruiz-Baca, Estela et al. 2D-immunoblotting analysis of *Sporothrix schenckii* cell wall. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2011. v. 106, n. 2, p. 248-250.

Sampaio, S.A.P. et al. Clinical aspects of sporotrichosis in Sao Paulo—analysis of 235 cases. **Rev Hosp Clin Fac Med**, 1954. v. 9, p. 391–402.

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

Santos, C. et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight intact cell mass spectrometry to detect emerging pathogenic *Candida* species. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 2011. v. 71, n. 3, p. 304-308.

Schenck BR. Refractory subcutaneous abscess caused by a fungus possibly related to the the *Sporotricha*. **Bull Johns Hopkins Hosp**, 1898. v.9, p. 286-290.

Schneidau, J.D. Cutaneous hypersensitivity to sporotrichin in Louisiana. **JAMA**, 1964. v. 188, n. 4, p. 371-373.

Schubach, A. et al. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging infectious diseases**, 2005. v. 11, n. 12, p. 1952.

Schubach, A. et al. Epidemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, 2008. v. 21, n. 2, p. 129-133.

Schubach, T.M.P. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical mycology**, 2001. v. 39, n. 1, p. 147-149.

Sena CM, et al. Uveíte anterior granulomatosa causada por *Sporothrix schenckii*. **Rev Bras Oftalmol**. 1995. v. 54, n. 12, p. 27-30.

Silva, G.M. et al. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2018. v. 38, p. 1767-1771.

Singhai, M. et al. Primary pulmonary sporotrichosis in a sub-Himalayan patient. **Journal of laboratory physicians**, 2012. v. 4, n. 1, p. 48.

Soares, J.R. et al. Esporotricose Cutânea Disseminada por Transmissão Zoonótica em Paciente Imunocompetente. **Journal of the Portuguese Society of Dermatology and Venereology**, 2019. v. 77, n. 4, p. 363-367.

Song, Y. et al. Efficacy and safety of itraconazole pulses vs. continuous regimen in cutaneous sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2011. v. 25, n. 3, p. 302-305.

Sterling, J. et al. Potassium iodide in dermatology: a 19th century drug for the 21st century—uses, pharmacology, adverse effects, and

contraindications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2000. v. 43, n. 4, p. 691-697.

St-Germain G, Summerbell R. Identifying filamentous fungi. In: A clinical laboratory handbook. **California: Star Publishing Company**, 1996.

Summerbell RC, et al. Medically important *Sporothrix* species and related Ophiostomatoid fungi. **Ceratocystis and Ophiostoma: taxonomy, ecology and pathogenicity. Minnesota: APS Press**, 1993. p 185–192.

Taylor JJ.. A comparison of some *Ceratocystis* species with *Sporothrix schenckii*. **Mycopath Mycol Appl**, 1970. v. 42, n. 3, p. 233- 240.

Tian, Y. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* and dematiaceous fungi. **Journal of Jilin University (Medicine Edition)**, 2004. v. 30, n. 3, p. 360-361,365.

Tlougan, B. E. et al. Neonatal sporotrichosis. **Pediatr. Dermatol**, 2009. v. 26, n. 5, p. 563–565.

Valeriano, C.A.T. et al. Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile?. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2020. v. 14, n. 3, p. e0008151.

Valeriano, C.A.T. et al. Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: Case in the northeast of Brazil. **JAAD Case Reports**, 2020. n.6, v.10, p. 988-992.

Ventin, M. et al. A significant geographical area for the study of the epidemiological and ecological aspect of Mediterranean sporotrichosis. **Mycopathologia**, 1987. v. 99, n. 1, p. 41-43.

Verma, S. et al. Sporotrichosis in sub-himalayan India. **PLoS neglected tropical diseases**, 2012. v. 6, n. 6, p. e1673.

Viana, P.G. et al. Successful treatment of canine sporotrichosis with terbinafine: Case reports and literature review. **Mycopathologia**, 2018. v. 183, n. 2, p. 471-478.

Waller, S. B. et al. Resistência antifúngica em espécies de Sporothrix: uma visão geral. **Jornal Brasileiro de Microbiologia** , 2021. v. 52, p. 73-80,.

Watanabe, S. et al. RFLP analysis of the internal transcribed spacer regions of *Sporothrix schenckii*. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, 2004. v. 45, n. 3, p. 165-175.

Werner, R.E. et al. Sporotrichosis in a cat. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 1971.v. 159, n. 4, p. 407-412.

Wu, S. X. Sporotrichosis in China. **Chin J Zoonoses**, 1991, v. 7, p. 53-54.

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

Yao, L. et al. Pediatric Sporotrichosis in Jilin Province of China (2010–2016): a Retrospective Study of 704 Cases. **Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society**, 2019. v. 9, n. 3, p. 342-348.

YU, X. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. **Mycopathologia**, 2013, v. 176, n. 1-2, p. 67-74.

Zhang, Z. et al. Protein profiling of the dimorphic pathogenic fungus, *Sporothrix schenckii*. **Mycopathologia**, 2012. v. 173, n. 1, p. 1-11.

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

ZIPFEL, R.D. et al. As filogenias multigênicas definem *Ceratocystiopsis* e *Grosmannia* distintas de *Ophiostoma*. **Studies in mycology** , 2006. v. 55, p. 75-97.

CAPÍTULO I

Short Communication

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Epidemiological features and geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil

Cybelle Emanuele Silva¹, Carlos Alberto Tibúrcio Valeriano², Cláudia Elise Ferraz^{3,4}, Rejane Pereira Neves², Manoel Marques Evangelista Oliveira⁵, Júlio Castro Alves de Lima e Silva⁶, Vera Magalhães^{3,4} & Reginaldo Gonçalves de Lima Neto^{*,1,2,3,4} 

¹Postgraduate Program in Biotechnology, Center for Biosciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brazil. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

²Postgraduate Program in Fungal Biology, Center for Biosciences, UFPE, Pernambuco, Brazil

³Hospital of Clinics, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, UFPE, Pernambuco, Brazil

⁵Laboratory of Taxonomy, Biochemistry & Bioprospecting of Fungi, Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, 21040-900.

⁶Clinical Research Platform, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

*Author for correspondence: Tel.: +5581991479644; reginaldo.limant@ufpe.br; reginaldo.limaneto@pq.cnpq.br



Aim: Cases of sporotrichosis are emerging in several states of Brazil, especially in the southeast. Recently, sporotrichosis has been reported in the state of Pernambuco in the northeastern region. Therefore, the goal of this study was to shed new light on sporotrichosis regarding the geographical distribution of human cases, and provide an overview of sporotrichosis associated with zoonotic transmission. **Patients & Methods:** From March 2017 to November 2019, 179 patients were diagnosed with sporotrichosis. Georeferencing analysis, spatial distribution, and epidemiological features of all cases were described. **Results:** Our data show the dynamics of accelerated transmission of sporotrichosis across urban and coastal areas of the state of Pernambuco. **Conclusion:** There is a need to decentralize health services and implement One Health approaches to this emerging disease.

Keywords: *Sporothrix*, georeferencing, epidemiology, socio-economic conditions.

Introduction:

Sporotrichosis is a disease with global distribution and high incidence in tropical and subtropical areas [1][2][3]. Currently, it is considered endemic in Latin America and Asia [4][5], and causes cutaneous (fixed, lymphocutaneous, and disseminated), and extracutaneous (ocular, pulmonary, neurological, osteo-articular, and immunoreactive) infections of bydimorphic fungus of *Sporothrix* genus. Usually, the infection consists of suppurating subcutaneous nodules located near lymphatic channels. In some cases, it can spread to other organs and promote disseminated infection [6].

The fungal agent *Sporothrix schenckii* was considered a single species until 2007 when Marimon and coworkers described three new cryptic species: (I) *Sporothrix brasiliensis*; (II) *S. globosa*, e (III) *S. mexicana* [7]. Since then, some studies have proposed a taxonomic revision, and three more species associated with clinical cases have been reported: *Sporothrix pallida*, *Sporothrix chilensis* [8][9], and *Sporothrix luriei* [10]. *Sporothrix schenckii* (sensu stricto), *S. brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. luriei* make up the pathogenic clade of the genus *Sporothrix* [11][12].

Sporotrichosis was a mycosis known as rose gardeners disease because pathogen inoculation occurred mainly through contaminated soil and plants, such as in the case of rose thorn wounds [13]. However, the scenario has changed from small to large outbreaks due to zoonotic transmission [11][14]. Primarily, in Rio de Janeiro (RJ), Brazil, more than 5,000 cases of animal contamination with zoonotic transmission have been registered since 1998. This transmission is spread from contaminated cats to humans through scratching or biting, contact with secretions from ulcerated lesions, and through feline respiratory secretions during coughing and sneezing, and the most prevalent species is the *S. brasiliensis* [15][16].

A more recent sporotrichosis endemic area in Brazil is the northeast region, in particular the state of Pernambuco (PE), and this area is associated with zoonotic transmission, which has been officially reported since becoming a mandatory notification in 2015 [17][18][19][20]. Nevertheless, few states in Brazil require compulsory notification of this disease at the moment [20]. Unfortunately, the expansion of sporotrichosis involves precarious sanitary and social conditions all over the country. Furthermore, high reproductive rates of felines facilitate the spread of the fungus even more. According to the last national health survey carried out by the Brazilian Institute for Geography and Statistics (IBGE, Ministry of Economy, Brazil), the northeast region has about 7,384,110 cats, being the region of Brazil with the highest number of felines. In Pernambuco there are 927,127 cats. We believe that these numbers are another justification for the increase in human sporotrichosis in our state [21].

The early 21st century was very important for the study of sporotrichosis because global epidemiological data were described [1][4][11][14][16][20][22][23][24]. An outbreak of feline

sporotrichosis in northeastern Brazil was reported for the first time in 2018 [17]. However, there are no studies that describe the human sporotrichosis profile and epidemiological data in this region[18][19]. Therefore, in this article we shed new light on sporotrichosis in Pernambuco (PE) regarding the geographical distribution of human cases, and provide an overview of sporotrichosis with zoonotic transmission in the state of PE. Geoprocessing tools were used for the sporotrichosis geo-epidemiology study and obtained from geoprocess maps.

Materials & Methods

Ethics statements

This research was submitted to the Human Research Ethics Committee of the Center for Health Sciences at the Federal University of Pernambuco (UFPE, Brazil) under protocol CAAE 70369117.5.0000.5208, and received approval under protocol number 071133/2017. Moreover, it is in accordance with the Helsinki declaration.

Design and site of study

This is a retrospective and descriptive study with data collection from medical records and laboratory reports over 31 months. The study took place at the Hospital of Clinics (HC/UFPE) in the city of Recife, State of Pernambuco, northeastern Brazil. HC/UFPE is the teaching hospital of the Federal University of Pernambuco and has 418 beds. Analysis was performed by outpatient data access from patients attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, from March 1st, 2017 to November 30th, 2019. The Dermatological Service attends patients from all over the state of Pernambuco with a flow of between 900 and 1,000 patients per month. The patients were diagnosed with sporotrichosis by association between clinical features and laboratorial data, such as direct microscopic examination, fungal culture on Mycosel agar, and histopathological analyses.

The state of Pernambuco, Brazil, covers an area of 98,068,021 km², with an estimated population of 9,473,266 inhabitants (**Figure 1**). Its urbanization rate corresponds to 80,17% of the whole population, so the majority of citizens, around 7,052,210 million people, live in urban areas. Pernambuco concentrates 35% of the gross domestic product (GDP) of the northeastern region. This wealth is distributed between 185 municipalities. The metropolitan region of the state capital, Recife, is composed of 15 cities, namely Abreu e Lima, Araçoiaba, Cabo de Santo Agostinho, Camaragibe, Goiana, Igarassu, Ilha de Itamaracá, Ipojuca, Itapissuma, Jaboatão dos Guararapes, Moreno, Olinda, Paulista, São Lourenço da Mata and Recife, which, being the capital, enjoys the most socio-economic development in the state. Pernambuco's climate is humid tropical in the coastal areas and semi-arid in the countryside. Its Human Development Index (IDH) is 0.673, considered medium in the total IDH range when compared with other states of Brazil. However, its Gini Index is 0.62 and demonstrates the high vulnerability and inequality of the population. Residents of the state are 48.1% male and 51.9% female, and 70% are in the age group between 15 and 64 years old. The data were obtained from the Brazilian Institute for Geography and Statistics (IBGE)[21].

Georeferencing spatial analysis

Individual addresses of patients with clinically proven sporotrichosis were obtained from medical records and used for georeferencing analysis. Free Google Earth Pro software was applied for the identification of latitude and longitude parameters. Afterwards, the Latlong online geographic tool (www.latlong.net) was used for inserting coordinates of each patient's address in a shapefile of Pernambuco. Digital localization was displayed on a map and marker point centers were exhibited for locations. This shapefile is used in Geographic Information System (GIS) environments. The map showed absolute frequency of cases in the municipalities of Pernambuco.

Statistics Data

The tables describe qualitative variables, and statistical data was performed using absolute and relative frequencies. Quantitative variables were performed using mean and standard deviation. The calculation regarding the increase in cases was carried out using a simple mathematical rule of three, with March 1st, 2017 as a starting point. Data were obtained from medical records at the Dermatological Service of the Hospital of Clinics of Pernambuco, Brazil.

Results

The expansion and growth trend of sporotrichosis in Pernambuco between March 1st, 2017 and November 30th, 2019 is shown in **Table 1** and **Figure 2** respectively. During this time the Dermatological Service at the HC/UFPE reported 179 cases confirmed by fungal culture. In 2018 an increase of 163% in the number of sporotrichosis cases compared to 2017 occurred. The increase was more discreet in 2019, reaching 33.33% in comparison with 2017.

Georeferencing study from these data was carried out to contribute to the understanding of geographical sporotrichosis expansion and zoonotic transmission, as shown in **Figure 3**. It can be seen that municipalities of the metropolitan region of the state capital and their coastal areas host the largest number of sporotrichosis cases. The main urban areas affected were the cities of Recife with 46.4% (83/179) of the patients notified, and Olinda with 17.3% (31/179), as summarized in **Table 2**.

Regarding education, our data are confirmed by IBGE, where 45.8% (82/179) of patients affected by sporotrichosis finished high school (**Table 3**). Only 11.7% (21/179) of the patients had a first degree, and we believe that this percentage is related to the fact that healthcare is carried out by the Brazilian Public Health System, namely SUS, and is sought more by low-income people.

In our study, we found that most patients (91.1%; 163/179) diagnosed with sporotrichosis had previous contact with sick cats through scratching or biting (**Table 3**). Regarding gender and age, males represented 29.05% (52/179) of our patients, females 70.95% (127/179), both with an average age of 42.7 years (**Table 3**).

Sixty-six per cent (119/179) of sporotrichosis patients attended in the Dermatological Service at the HC/UFPE were diagnosed with lymphocutaneous form, with an average time of 5.5 weeks for seeking medical and therapeutic assistance, as shown in **Table 3**. The fixed form was the second most reported form with 29% (52/179) of cases, and consisted of a single lesion without spreading through lymphatic channels. The disseminated form was the least reported in our patients, with only 4.4% (8/179). In accordance with current guidelines most patients received itraconazole (94.97%; 170/179). The antifungal drugs used are summarized in Table 3. All the patients recovered and were discharged.

Discussion

Reported cases of feline sporotrichosis and human outbreaks related to zoonotic transmission were described for the first time in Brazil during 1998 [14][22][23][24]. Since then, geographical expansion of sporotrichosis has occurred in the whole country [25]. However, many regions only report feline cases, and zoonotic transmission to humans probably goes unnoticed [11].

The number of cases diagnosed at the Dermatological Service/HC/UFPE increased between 2015 and 2018, and the fall thereafter, may reflect the decentralization of healthcare for cases of sporotrichosis to the municipal level, which started in mid 2018. Another reason is the One Health approaches implemented by the government of the State of Pernambuco for epizooty control. Even so, it shows that expansion continued in the state with a significant emerging trend of human outbreaks.

Socio-economic issues, poverty, urban agglomeration, and poor basic sanitation could be the main causes of expansion and increase in sporotrichosis in Pernambuco, as argued by Gremião et al. [20] regarding the endemic area of Rio de Janeiro. In addition, low per capita income is a feature of the population, and contributes to the vulnerability of patients with sporotrichosis. According to IBGE, more than half of adults in Brazil have not completed high school, around 51.2% and equivalent to 69.5 million people [21]. It is noteworthy that the Brazilian northeast presents the worst literacy rates in the country.

Many epidemiological studies show that in some countries sporotrichosis is predominantly associated with agricultural and gardening activities, and men are most affected [1][26]. However, it is important to emphasize that there is considerable variation in world population contexts. For example, in Brazil the biggest sporotrichosis outbreak started in 1998 in the state of Rio de Janeiro, and was related to zoonotic transmission through felines. The vast majority of infections were in women who had contact with domestic cats [14][15][19][20].

The predominance of human sporotrichosis in adult women is reported by other research, such as that regarding endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro[27][28]. Adult women do household tasks and look after their cats at home, so zoonotic transmission can occur easily. When domestic cats are infected women are exposed to the disease because they take care of their injuries, and usually clean the cat's sleeping place. They often report having been scratched and bitten in an attempt to offer the animal medication. Another reason that we believe contributes to women being reported as the sex most affected by human sporotrichosis is that, traditionally, they seek medical care more quickly and frequently. On the other hand, men tend to neglect health assistance. However, it is important to highlight that in several studies men who work in gardening and farming are the most affected[29][30].

Sick cats, mainly male, not neutered and strays, can become vectors for humans. Hiding in plants, digging holes and covering their faeces with soil, marking territory with their claws on trees, and fighting or playing with each other, are the ways in which cats become infected[31]. Furthermore, studies prove the presence of *Sporothrix* spp. not only in the cat's lesions, but also in its oral cavity and nails [32][33]. One hypothesis for the outbreak in northeastern Brazil is environmental characteristics favorable to the growth of the fungus, with average temperatures of 25-27 °C, and humidity above 80% [20]. Another reason that could help to explain the zoonotic transmission and consequent outbreak of sporotrichosis in Pernambuco is related to tourism. In our state there are many attractive beaches for tourists, and during the summer season there is a substantial increase in the local population of these coastal regions. Nonetheless, at the end of the summer many animals are abandoned by visitors, the vast majority without being neutered, which quickly increases the cat population[34].

The species isolated from this study have not been identified yet. However, we believe that most cases will be related to *Sporothrix brasiliensis*, according to some identifications published by our research group [17][18][19]. Nevertheless, the possibility of the introduction and circulation of different

species belonging to the pathogenic clade of *Sporothrix* can be related to the increase in the number of cases in Pernambuco, as observed in Rio de Janeiro. Genomic identifications in further studies must be prioritized.

Several studies point out that the main clinical manifestation of sporotrichosis is lymphocutaneous form in 80% of cases, and lesions appear from 2 to 4 weeks after trauma with papulonodular appearance and ulceration tendency associated with the release of purulent secretion in immunocompetent patients [23][24][35]. Otherwise, the disseminated form is identified as multiple lesions that appear at the same time, and usually affects immunosuppressed patients [26][27]. However, our research group has published disseminated sporotrichosis cases in immunocompetent individuals as a result of contact with cats [17][18][19]. The frequency in our findings is in accordance with several epidemiological studies [1][29][30][31][36].

The prevalence of lymphocutaneous form within the Brazilian population may be related to certain factors, such as the size and depth of the inoculum transmitted by cats' scratches or bites, the strain's resistance to heat, and the host's immune response. Mackinnon et al. [37] point out the influence of climate on the appearance of one clinical manifestation over the other. In this study, Uruguay, México and the United States of America presented incidences of lymphocutaneous form greater than 80%, while in Colombia and Venezuela fixed forms predominated. The conclusion is that possibly variations in temperatures may have an influence on sporotrichosis, and high temperatures can inhibit fungal growth, or at least its spread. However, no seasonal difference has been described by other researchers [38].

Conclusion

This work is the first to present a retrospective study to describe the geo-epidemiological characteristics of sporotrichosis in the state of Pernambuco. There is still a lot to do for a complete epidemiological view of sporotrichosis in our state and georeferencing data should be improved. However, our study is a pioneer in showing the scenario of the spread of sporotrichosis in humans, primarily transmitted by sick domestic cats. In some aspects, we find many similarities with other studies performed in Brazil. For example, our data demonstrate that women are the most affected by sporotrichosis, and the main clinical manifestation is lymphocutaneous form. Moreover, the increase in cases in the region occurred due to zoonotic transmission, similar to the situation in the state of Rio de Janeiro, Brazil, and the time to seek assistance was an average 5.5 weeks between contact with the fungus and the appearance of the lesion. We conclude that Itraconazole has been widely used due to its known safety and effectiveness in the treatment of sporotrichosis and its availability in the public health system in Pernambuco. In addition, healthcare decentralization for diagnosis and treatment, and the achievement of One Health approaches for epizooty control have been important public health measures taken by government institutions. Lastly, animals abandoned by their owners and tourists in coastal areas can be another reason for the increase in sporotrichosis cases in Pernambuco.

Future Perspective+

We believe that northeastern Brazil is the newest sporotrichosis hotspot, and only two out of nine states in this region have included sporotrichosis as a notifiable disease. From our point of view, the clinical-epidemiological status of sporotrichosis will be better clarified in the future, and this study will have been a pioneer in establishing profiles and providing georeferencing data. This can help in choosing sanitary measures by public health authorities. Furthermore, we emphasize the importance of antifungal susceptibility-focused research which we believe will increase in the next few years to improve management of the disease, mainly in cases of the disseminated and atypical forms.

Summary Points:

- First demonstration of a sporotrichosis epidemic in northeastern Brazil with an increase of 163% between 2017 and 2018.
- The first-line drug chosen for treatment was itraconazole in almost 95% of cases.
- The inclusion of human sporotrichosis in the notifiable diseases list in 2015 has not been enough to control the spread of this disease.
- Ninety-one per cent of patients reported previous contact with cats.
- A comprehensive sporotrichosis control program involving humans and animal cases is mandatory to solve this issue.
- Updates on sporotrichosis outbreaks that are ongoing in other northeastern states are needed to help set a national public health policy.

Figure/Table legends

Figure 1: Map of the state of Pernambuco, Brazil.

Figure 2. Trendline growth based on human cases of sporotrichosis diagnosed by the Dermatological Service at the Hospital of Clinics/Federal University of Pernambuco from 2015 to 2019.

Figure 3. Geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, according to the dwelling place of patients attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, from 2017 to 2019.

Table 1: Increase in sporotrichosis cases in patients attended by the Dermatological Service at the Hospital of Clinics/Federal University of Pernambuco from 2016 to 2019.

Table 2: Distribution of human sporotrichosis cases in Pernambuco, according to the municipality of residence, from patients attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, from 2017 to 2019.

Table 3: Epidemiological and educational features of human sporotrichosis cases attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, Pernambuco, Brazil, between 2017 and 2019.

Reference

+**Reference annotations:** authors should highlight 6–8 references that are of particular significance to the subject under discussion as “* of interest” or “** of considerable interest”, and provide a brief (1–2 line) synopsis

1. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med. Mycol.* 53(1), 3–14 (2014).
* **Important considerations concerning the current epidemiology of sporotrichosis in the world.**
2. Rasamoelina T, Maubon D, Raharolahy O, *et al.* Sporotrichosis in the highlands of Madagascar, 2013–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 25(10), 1893–1902 (2019).
3. Grisolia JC, Santos LA, Coelho LML, *et al.* Seroepidemiological survey on sporotrichosis-infection in rural areas of the south of Minas Gerais State, Brazil. *Brazilian J. Microbiol.* 52(1), 41–47 (2021).
4. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi.* 35(1), 1–20 (2015).
5. Etchecopaz AN, Lanza N, Toscanini MA, *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. *J. Mycol. Med.* 30(1), (2020).
6. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: Current status of a complex disease. *J. Fungi.* 3(1) (2017).
7. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *J. Clin. Microbiol.* 45(10), 3198–3206 (2007).
8. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.* 120(2), 246–264 (2016).
9. Valeriano CAT, de Lima-Neto RG, Inácio CP, *et al.* Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile?. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14(3), 1–11 (2020).
** **First description of *Sporothrix chilensis* in Brazil, and second description in the world.**
10. Marimon R, Gené J, Cano J, Guarro J. *Sporothrix luriei*: A rare fungus from clinical origin. *Med. Mycol.* 46(6), 621–625 (2008).
11. Rodrigues AM, Della Terra PP, Gremião ID, Pereira SA, Orofino-Costa R, de Camargo ZP. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia.* 185(5), 813–842 (2020).
* **Important considerations regarding the current knowledge of the taxonomy, ecology, prevalence, and molecular epidemiology due to *Sporothrix* pathogenic species.**
12. Lopes-Bezerra LM, Mora-Montes HM, Zhang Y, *et al.* Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. *Med.*

- Mycol.* 56, S126–S143 (2018).
13. Gutierrez-Galhardo MC, Freitas DFS, do Valle ACF, Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Zancopé-Oliveira RM. Epidemiological Aspects of Sporotrichosis Epidemic in Brazil. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 9(4), 238–245 (2015).
 14. Pereira SA, Gremião IDF, Kitada AAB, Boechat JS, Viana PG, Schubach TMP. The epidemiological scenario of feline sporotrichosis in Rio de Janeiro, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47(3), 392–393 (2014).
* **Important considerations concerning the role of sick cats in the zoonotic transmission of sporotrichosis.**
 15. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, *et al.* Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(6) (2013).
 16. Silva GM, Howes JCF, Leal CAS, *et al.* Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesqui. Veterinária Bras.* 38(9), 1767–1771 (2018).
 17. Lacerda Filho AM, Cavalcante CM, Da Silva AB, *et al.* High-Virulence Cat-Transmitted Ocular Sporotrichosis. *Mycopathologia.* 184(4), 547–549 (2019).
** **First description of zoonotic sporotrichosis in Pernambuco, Northeast Brazil.**
 18. Valeriano CAT, Ferraz CE, Oliveira MME, *et al.* Cat-transmitted disseminated cutaneous sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in a new endemic area: Case series in the northeast of Brazil. *JAAD Case Reports.* 6(10), 988–992 (2020).
** **First description of disseminated sporotrichosis in Pernambuco, Northeast Brazil.**
 19. Lima IMF, Ferraz CE, Lima-Neto RG, Takano DM. Case Report: Sweet Syndrome in Patients with Sporotrichosis: A 10-Case Series. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 103(6), 2533–2538 (2020).
** **First description of acute febrile neutrophilic dermatosis (Sweet syndrome) in sporotrichosis patients in Brazil.**
 20. Gremião IDF, Marques M, Oliveira E, de Miranda LHM, Freitas DFS, Pereira SA. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 26(3), 621–624 (2020).
* **Important considerations about geographic expansion of zoonotic sporotrichosis in Brazil.**
 21. Brazil, Ministry of Economy, Brazilian Institute for Geographers and Statistics (IBGE). *Brazil in Figures.* 27, 1-480 (2019)
 22. Barros MB, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol. Infect.* 136(9), 1192–1196 (2008).
 23. Lyon GM, Zurita S, Casquero J *et al.* Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru. *Clin. Infect. Dis.* 36(1), 34–39 (2003).

24. Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T *et al.* Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 Cases (1998-2001). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 224(10), 1623–1629 (2004).
25. Brandolt TM, Madrid IM, Poester VR *et al.* Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in Southern Brazil, 2012–2017. *Med. Mycol.* 57(5), 527–533 (2019).
26. Oyarce JA, García C, Alave J, Bustamante B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. *Rev. Chil. Infectol.* 33(3), 315–321 (2016).
27. Lecca LO, Paiva MT, de Oliveira CSF *et al.* Associated factors and spatial patterns of the epidemic sporotrichosis in a high density human populated area: A cross-sectional study from 2016 to 2018. *Prev. Vet. Med.* 176(3), 104939 (2020).
28. Schubach TMP, Valle ACF, Gutierrez-Galhardo MC *et al.* Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med. Mycol.* 39(1), 147–149 (2001).
29. Macêdo-Sales PA, Souto SRLS, Destefani CA *et al.* Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: A comparison between infected and non-infected populations. *BMC Vet. Res.* 14(1), 1–10 (2018).
30. Poester VR, Souza A, Isabel M *et al.* Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic?. *Zoo. Publi. Heal.* 65(7), 815-821 (2018).
31. Duangkaew L, Yurayart C, Limsivilai O, Chen C, Kasorndorkbua C. Cutaneous sporotrichosis in a stray cat from Thailand. *Med. Mycol. Case Rep.* 23(12), 46–49 (2019).
32. da Silva MBT, de Mattos Costa MM, da Silva Torres CC *et al.* Esporotricose urbana: Epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúd. Publi.* 28(10), 1867–1880 (2012).
33. Takenaka M, Yoshizaki A, Utani A, Nishimoto K. A survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. *Mycoses.* 57(5), 294–298 (2014).
34. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An. Bras. Dermatol.* 92(5), 606–620 (2017).
35. Bonifaz A, Vázquez-González D. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: What are the options?. *Curr. Fungal Infect. Rep.* 7(3), 252–259 (2013).
36. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 27(3), 313–318 (2013).

37. Mackinnon J, Conti-Diaz I, Gezuele E, Civilia E, Luz S. Isolation of *Sporothrix schenckii* from nature and considerations on its pathogenicity and ecology. *Sabouraudia*. 7(1), 38-45 (1969).
38. De Lima Barros MB, De Oliveira Schubach A, Francesconi Do Valle AC *et al.* Cat-Transmitted Sporotrichosis Epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a Series of Cases. *Clin. Infect. Dis.* 38(4), 529–535 (2004).

Figure 1: Map of the state of Pernambuco, Brazil.



Figure 2. Trendline growth based on human cases of sporotrichosis diagnosed by the Dermatological Service at the Hospital of Clinics/Federal University of Pernambuco from 2015 to 2019.

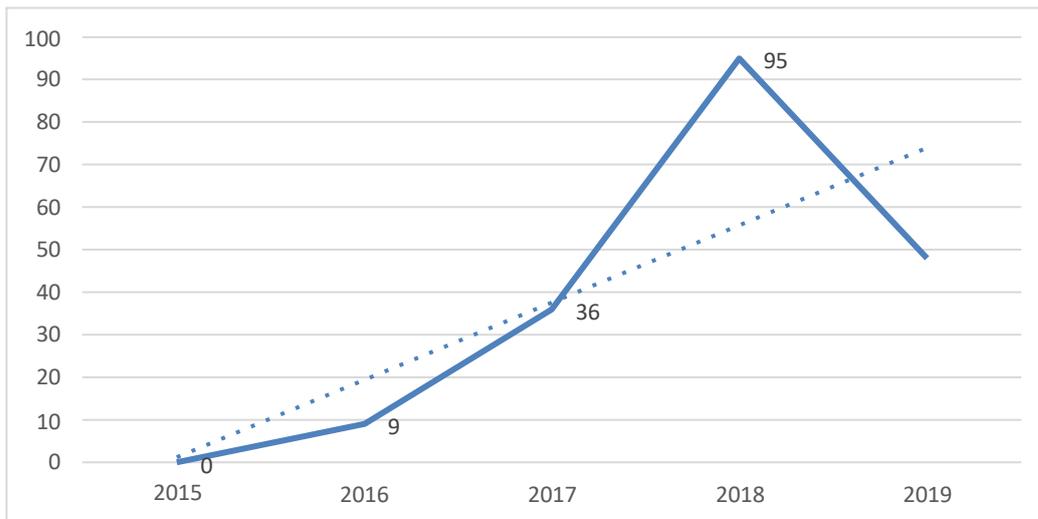


Figure 3. Geographical expansion of sporotrichosis in the state of Pernambuco, northeastern Brazil, according to the dwelling place of patients attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, from 2017 to 2019.



Table 1. Increase in sporotrichosis cases in patients attended by the Dermatological Service at the Hospital of Clinics/Federal University of Pernambuco (2016-2019).

Year	Cases/year	Cases/month	Increase in percentage from 2017
2016	9	0.75	-
2017 [†]	36	3	-
2018	95	7.91	163%
2019 [‡]	48	4	33.33%

[†] Starts from March 2017;
[‡] Until November 2019.

Table 2. Distribution of human sporotrichosis cases in Pernambuco, according to municipality, from patients attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE (2017-2019).

Municipality	Number of patients	Percentage
Abreu e Lima	4	2.2%
Água Preta	1	0.6%
Cabo de Santo Agostinho	5	2.8%
Camaragibe	19	10.6%
Carpina	1	0.6%
Igarassu	1	0.6%
Ipojuca	1	0.6%
Jaboatão dos Guararapes	18	10.1%
Olinda	31	17.3%
Paulista	13	7.3%
Recife	83	46.4%
Vitória de Santo Antão	2	1.1%

Table 3. Epidemiological and educational features of human sporotrichosis cases attended by the Dermatological Service at the HC/UFPE, Pernambuco, Brazil, (2017-2019).

Epidemiological data of patients	Number of patients	Percentage
Sex	12752	70.95%29.05%
Female		
Male		
Contact with sick cats by scratching or biting	163	91.1%
Education		
Illiterate	4	2.2%
Literate	40	22.3%
Basic education	32	17.9%
High school	82	45.8%
Undergraduate higher education (first degree)	21	11.7%
Clinical manifestation		
Fixed	52	29.05%
Lymphocutaneous	119	66.48%
Disseminated	8	4.47%
Average age	-	42.7 years (SD: 17.4)
Average time to seek assistance	-	5.5 weeks
Antifungal therapy		
Itraconazole	170	94.97%
Terbinafine	7	3.91%
Potassium iodide saturated solution	1	0.56%
Amphotericin B <u>deoxycolate</u>	1	0.56%

CAPÍTULO II

ARTIGO A SER SUBMETIDO

Novo protocolo para identificação das espécies patogênicas de *Sporothrix* diretamente de fragmentos de pele por MALDI TOF MS.

New protocol for identification of *Sporothrix* pathogenic species directly from skin fragments by MALDI TOF MS

Cybele Emanuele da Silva¹, Cláudia Elise Ferraz^{2,3}, Manoel Marques Evangelista Oliveira⁴ e Reginaldo Gonçalves de Lima Neto*, ^{1,2,3}

autor correspondente: reginaldo.limant@ufpe.br

¹ Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Pernambuco, Brasil. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

²Hospital of Clinics, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Tropical Medicine, Center for Medical Sciences, UFPE, Pernambuco, Brazil

⁴ Laboratório de Taxonomia, Bioquímica & Bioprospeção de Fungos, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil. Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro - RJ, 21040-900.

1- Introdução:

A espectrometria de massa de tempo de voo com dessorção por ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) é uma técnica físico-química usada para identificação microbiana em laboratórios de microbiologia clínica e está substituindo progressivamente os métodos de identificação bioquímica e fenotípica (Florio et al., 2018; Kostrzew e Sören, 2017). MALDI-TOF MS fornece uma nova abordagem para identificação rápida, precisa e econômica de bactérias e fungos. As impressões digitais do espectro de massas são geradas criando uma assinatura única para cada microrganismo, resultando na identificação microbiana precisa aos níveis taxonômicos de gênero e espécie e também podem ser usadas para tipagem e identificação de cepas (Patel, 2015). A análise do espectro é geralmente obtida entre 2 e 20 KDa, esta; faixa de massa que corresponde principalmente às proteínas ribossomais (Ryszov e Fenselau, 2001).

A análise clínica laboratorial clássica por MALDI-TOF MS envolve a identificação de bactérias e leveduras diretamente de colônias cultivadas em placas de cultura. No entanto, novas perspectivas de identificação de patógenos diretamente de hemoculturas positivas, urina e líquido cefalorraquidiano são possíveis (Oya, 2018; Wei et al., 2019; Noll et al., 2020). Esta abordagem é muito importante porque a oportunidade e a rapidez no diagnóstico de infecções microbianas diminuem a mortalidade e o tempo de hospitalização, especialmente em casos com urgência clínica e infecções com risco de morte (Florio et al., 2018; Hou et al., 2019). Em especial, as infecções fúngicas aumentaram nas últimas décadas e o MALDI-TOF MS é uma ferramenta de rápida identificação em uma rotina clínica, principalmente quando a identificação usual baseada em características fenotípicas muitas vezes é inconclusiva (Oliveira et al., 2015).

O Brasil experimenta uma expansão geográfica da esporotricose

zoonótica em todo o país. Desde 1998, foram relatadas altas taxas de casos humanos de esporotricose. Durante 1998-2015 foram registrados aproximadamente 5.000 casos no estado do Rio de Janeiro e esses números não representam a totalidade da esporotricose humana em todo o território brasileiro (Gremião et al., 2020). A esporotricose é uma micose subcutânea causada por diversos fungos termodimórficos do gênero *Sporothrix* (Queiroz-Telles et al., 2019)

Nesse contexto, aplicar o uso de MALDI-TOF MS tende a ser uma boa estratégia para o diagnóstico rápido de casos de esporotricose (Matos et al., 2020; Rychert, 2019). Assim, no presente artigo, propomos um novo protocolo para diagnóstico da esporotricose e identificação da espécie de *Sporothrix* diretamente a partir de amostras de pele de pacientes obtidas por biópsia, as análises foram pioneiras e trazem uma nova perspectiva no diagnóstico da doença esporotricose. Este estudo foi realizado com pacientes do Hospital das Clínicas (HC / UFPE) da cidade de Recife, Estado de Pernambuco, nordeste do Brasil, uma nova área com ocorrência de surtos de esporotricose.

2- Materiais e Métodos

2.1 - Aspectos éticos e desenho do estudo

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE, Brasil) sob o protocolo CAAE 70369117.5.0000.5208, recebendo aprovação sob o protocolo número 071133/2017. O estudo foi conduzido de acordo com a declaração de Helsinki.

Este foi um estudo experimental e descritivo do tipo prospectivo, que incluiu casos de esporotricose no Serviço de Referência em Dermatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (Dermatologia/HC/UFPE), entre Janeiro de 2020 e Outubro de 2021.

2.2 Reagentes

Ágar Mycosel foi obtido da Difco™, Sparks, NV, EUA, dodecil sulfato de sódio (SDS), tris-base (99,9% de pureza), ácido clorídrico (HCL), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-propano (CHAPS), foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA), DTT (dithiothreitol), isotiocianato de guanidina, cloreto de cálcio (CaCl₂), cloreto de sódio (NaCl), acetona (99,9% de pureza), saponina e tripsina foram obtidos da Termo Fischer Scientific (EUA), ureia, tioureia, ácido tricloroacético (TCA), foram obtidos da Merck (DE).

2.3 - Obtenção e processamento das amostras clínicas

As amostras clínicas foram obtidas de cinco pacientes na Dermatologia/HC/UFPE. Dois fragmentos de pele obtidos com *punch* dermatológico de 4mm foram utilizados para o diagnóstico laboratorial micológico tradicional (exame direto e cultura) e metodologias para avaliação proteômica por MALDI-TOF MS. Um fragmento de uma região da pele

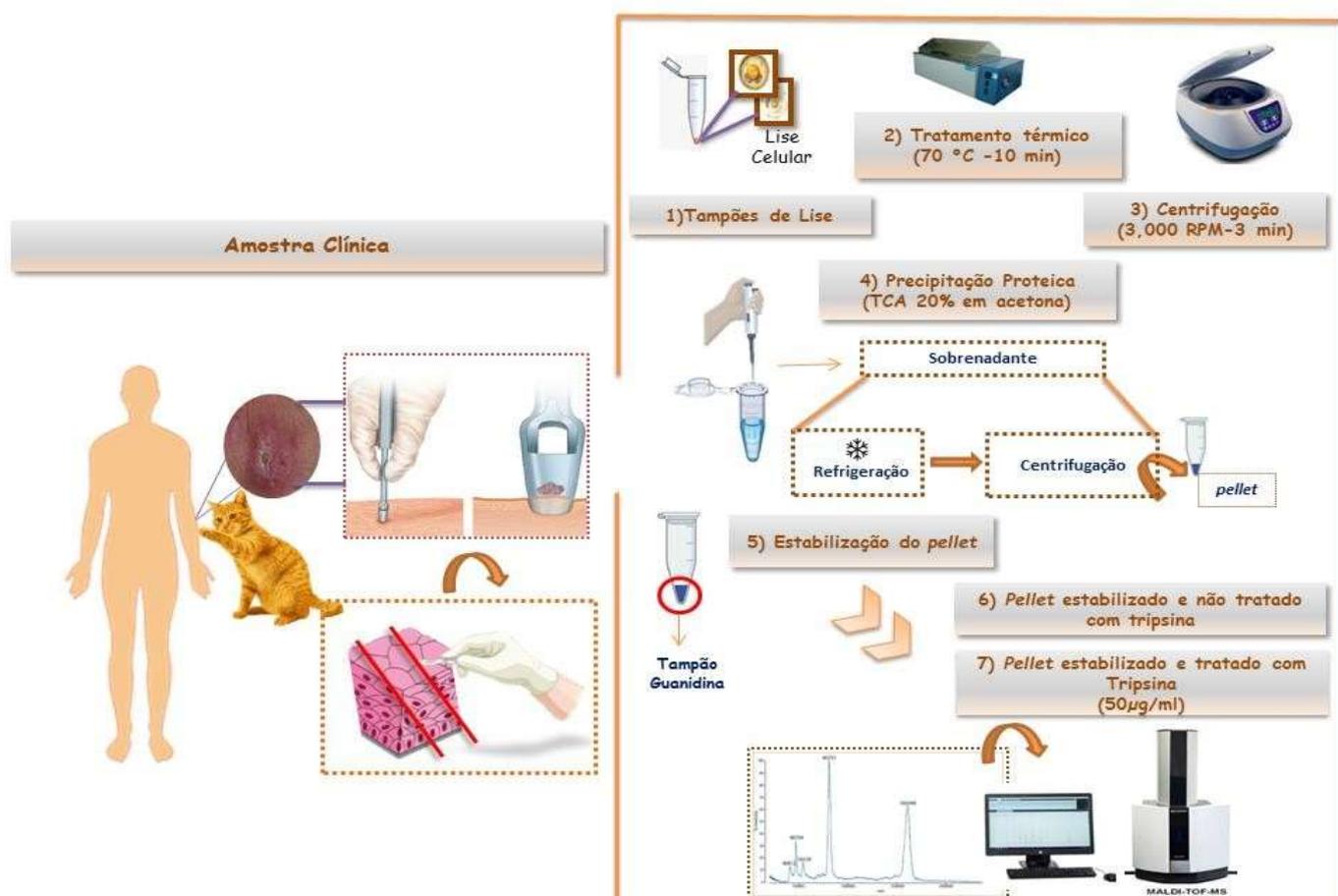
notadamente sadia foi obtido, como controle do perfil proteômico do hospedeiro humano. Para o diagnóstico tradicional, as amostras clínicas serão semeadas em duplicata em meio ágar Mycosel, mantidas à temperatura de 25-28° por até 15 dias. Após o surgimento das colônias estas foram purificadas e identificadas por macro e micromorfologia (Valeriano et al., 2020), além do sequenciamento parcial do gene calmodulina (CAL) (Rodrigues et al., 2015).

2.4 - Desnaturação e digestão enzimática dos espécimes clínicos de pacientes com esporotricose

Os fragmentos de pele foram colocados em eppendorfs® e tratados com três tipos diferentes de tampões: 1) 100µl de tampão alcalino de dodecil sulfato de sódio (5% de SDS, 50mM Tris-HCL (Ph:8,5), 0,15 M de NaCl 0,1mM de EDTA, 35mM de DTT (dithiothreitol); 2) 100µl de (3-[(3-colamidopropil)-dimetilamônio]-propano (CHAPS) [7M de ureia, 2M Tiourea, 4% CHAPS, 1% de DTT (dithiothreitol)] e 3) Saponina a 1% (em H₂O). Como uma outra proposta foi realizado a mistura 1:1 de tampão CHAPS e Saponina durante os experimentos. Em seguida, foram submetidos à intensa agitação via FastPrep™ durante 3 minutos com posterior realização de um tratamento térmico das amostras para efetivação da lise celular e desnaturação das proteases liberadas durante o processo (banho maria a 70 °C durante 10 minutos). O protocolo de precipitação das proteínas foi realizado de acordo Isaacson (2006) com modificação de Niu (2018). As soluções resultantes foram centrifugada a 3.000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante transferido para eppendorfs® limpos, sendo adicionado 100µl de ácido tricloroacético (20% de TCA/acetona (1:1, v/v, com um final de 10% de TCA / 50% de acetona), as misturas foram colocadas em gelo por 5 min, centrifugadas a 15.000 RPM por 3 min e os sobrenadantes descartados. Os *pellets* de proteínas foram lavados com 100µl de acetona a 80% cada, para remoção dos resquícios de SDS, CHAPS, Saponina e TCA, seguido por centrifugação a 15.000 RPM por 3 min. A etapa de lavagem foi repetida por três vezes consecutivas.

Após isso, os eppendorfs foram deixados à temperatura ambiente para evaporação da acetona (1-3 minutos) e em seguida adicionou-se uma solução de 50µl de tampão de guanidina (2 M de isotiocianato de guanidina, 10mM de DTT em Tris-CaCl₂ [50mM de Tris, 10mM de CaCl₂], Ph 7,6) para dissolução dos *pellets*. Por último, foi realizado, em uma parte das amostragens, um tratamento para digestão enzimática com tripsina (50µg/ml) (**Figura 1**).

Figura 1: Esquemática do processo de obtenção da amostra clínica e as etapas subsequentes para obtenção do perfil proteômico.



2.4 - Obtenção de espectros proteômicos

As análises por espectrometria de massas foram realizadas no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), utilizando o MALDI-TOF MS (MALDI-TOF Autoflex III laser nd:yag smartbean, Bruker Daltonics Inc. USA/Germany) para ionização de proteínas ribossomais e estruturais das diferentes amostras descritas anteriormente. Alicotou-se 1 μ L que foi dispensado em duplicata nos *spots* da placa em metal polido (Polished Steel Target, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). A matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico foi posteriormente adicionada. A variação de massas entre 2.000 a 20.000 Da foi registrada usando modo linear com pulso de 104 ns em uma voltagem de +20 kV. Espectros finais foram gerados através da soma de 500 tiros de laser acumulados por perfil e 6 perfis produzidos por amostra, levando a um total de 3.000 disparos de laser somados por espectro.

A identificação das amostras foi realizada de acordo com as pontuações estabelecidas pelo fabricante: $\leq 1,699$: não identificado de forma confiável; 1.700-1.999: identificação em nível de gênero; ≥ 2.000 : identificação em nível de espécie. As listas de picos foram exportadas e comparadas com o pacote de software MALDI Biotyper TM 3.1 (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) e a base de dados de proteínas do clado clínico de *Sporothrix* da Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

4- Resultados e Discussão

Métodos que possibilitem a identificação e diferenciação de espécies de *Sporothrix* são de grande importância na prática clínica em micologia, visto que, resultam em um diagnóstico confiável (Oliveira et al., 2015). Os dados atuais de espectrometria de massas das diferentes espécies que causam a esporotricose são baseados no prévio isolamento fúngico em meio de cultura, com posterior identificação a nível de espécie através da análise proteômica. A possibilidade de uma análise direta realizada com fragmentos de tecido da área

lesionada pelo fungo possui caráter inovador no campo da proteômica e, também, no futuro clínico do diagnóstico da esporotricose. As áreas do tecido utilizadas para a pesquisa se encontram evidenciadas na **Figura 2**. A confirmação laboratorial convencional foi realizada através do isolamento fúngico, com posterior obtenção do laudo confirmatório para esporotricose através de análises fenótípicas.

Figura 2: Áreas de coleta da amostragem tecidual: Pele sem lesão (SL) e Pele lesionada (L).



Para a realização dos experimentos, a escolha do tampão de lise celular foi considerada uma etapa crucial para que as proteínas de interesse mantivessem sua conformação durante o todo processo. A adição de inibidores de proteases nas soluções tampão se fez necessário para que a proteólise protéica fosse evitada. Três tipos diferentes de tampões de lise celular foram utilizados, sendo os primeiros resultados referentes ao uso do tampão alcalino de SDS, e os resultados posteriores se referem ao uso do CHAPS. Em uma terceira proposta, utilizou-se a saponina, que desestabiliza a membrana lipídica causando um dano irreversível à células humanas (Baumann, 2000). Adicionalmente, utilizou-se um disruptor celular mecânico, FastPrep™, a técnica consiste no uso de partículas de vidro para maximizar a homogeneização mecânica do tecido, o equipamento realiza movimentos tridimensionais e rápidos. A tecnologia FastPrep™ é adequada para diversos

tipos de amostras, com obtenção de sucesso para lise celular de leveduras, fungos e bactérias (Grabski, 2009). Para promover a precipitação proteica, aplicou-se um método adaptado de Niu (2018), TCA em acetona, realizado de forma simples e direta, que minimiza a degradação de proteínas e atividade de proteases, reduzindo contaminantes como sais e polifenóis na amostra. Com o objetivo de se ter uma maior sensibilidade, realizou-se em algumas amostras um tratamento de digestão enzimática, visto que, medições de massa de peptídeo são preferíveis ao invés de massas intactas de proteína na análise proteômica.

Os resultados obtidos no presente trabalho são pioneiros, mesmo que, a princípio, não tenha ocorrido a identificação proteômica a nível de espécie, conforme objetivado. Os espectros iniciais adquiridos foram comparados em um banco de dados interno de espectros MALDI e os resultados corroboram para não compatibilidade dos picos iônicos obtidos com as massas moleculares de *Sporothrix* spp. Algumas hipóteses foram levantadas para explicar tal resultado, como a presença de proteínas do hospedeiro humano que podem mascarar o perfil fúngico do espectro e a biblioteca proteômica para *Sporothrix* insuficiente para comparação com os resultados obtidos.

Os resultados das amostras dos pacientes obtidas e tratadas com tampão alcalino de SDS se agrupam e não se relacionam com o agrupamento das espécies de *Sporothrix* spp. contidas na biblioteca proteômica (**Figura 3**). Entretanto, os espectros obtidos demonstram um determinado padrão proteômico e alguns picos quando analisados separadamente se igualam aqueles dos espectros fúngicos de *Sporothrix* spp.

Figura 3: Cladograma de verosimilhança baseada na correlação de Pearson construída com espectrometria de massas por MALDI-TOF MS. Espectros das amostras clínicas referentes à utilização do tampão alcalino SDS estão em cor vermelha e lilás (A e B) e espectros de referência de *Sporothrix* spp. utilizados para comparação estão em destaque no interior dos retângulos.

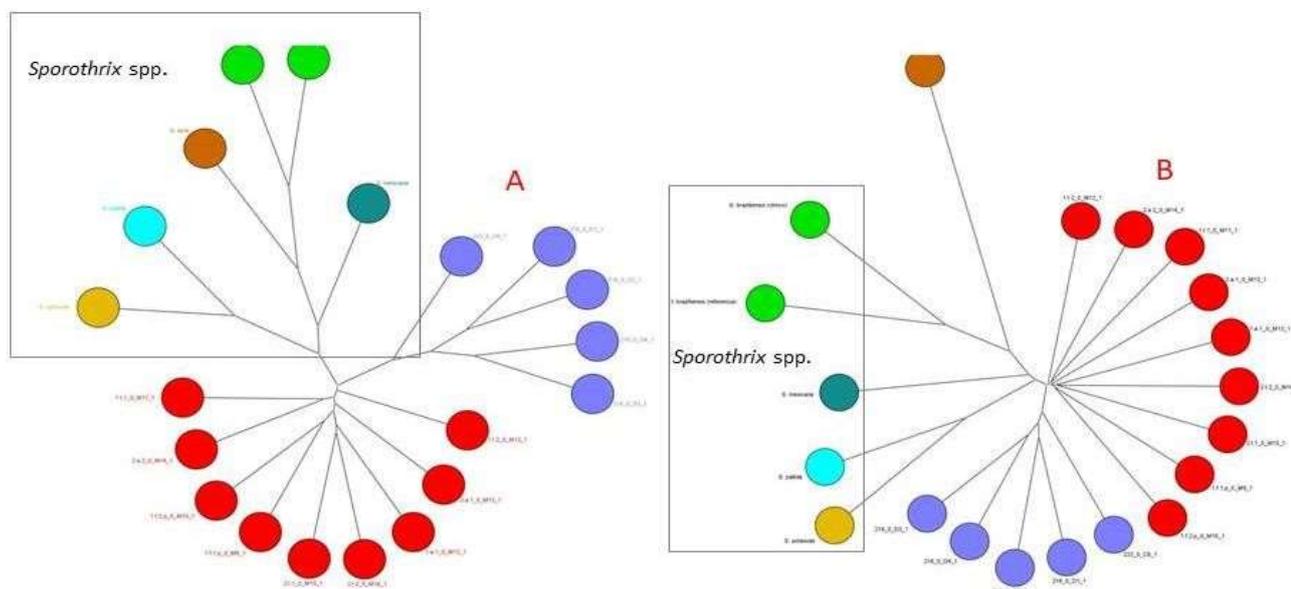
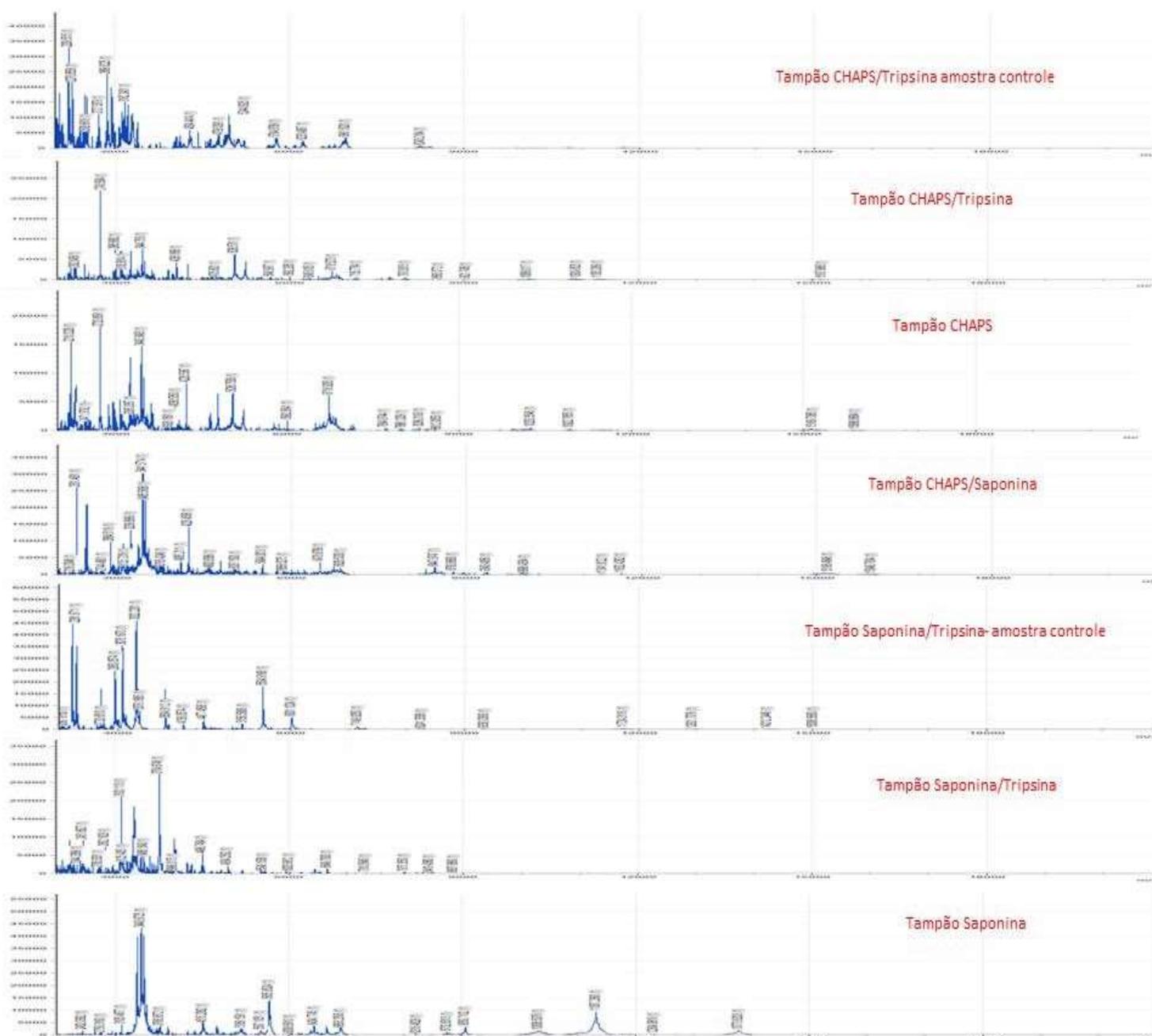


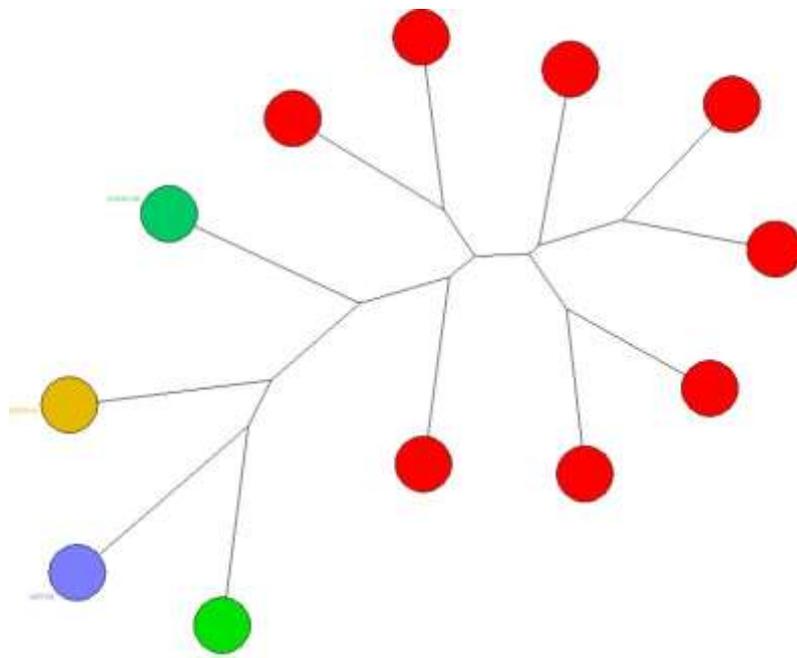
Figura 4: Perfis de espectros MALDI para diferentes tampões utilizados e das amostras controle (pele sem lesão e contaminação fúngica e/ou bacteriana)



Entretanto, espectros que evidenciam maior robustez na identificação do agente etiológico foram obtidos com a utilização dos outros dois tampões de lise, CHAPS e Saponina (**Figura 4**). A correlação de Pearson, demonstrou que há indícios que as amostras dos pacientes estavam acometidas por *Sporothrix schenckii* (**Figura 5**).

Dentre os tampões utilizados, a saponina e o CHAPS, parecem ser a melhor escolha. Entretanto, refinamentos metodológicos são necessários para afirmar com certeza tal premissa. Saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, possuindo propriedades detergente e surfactante. A utilização da saponina é bem estabelecida na hemólise de eritrócitos, o glicosídeo combina-se com moléculas de colesterol presentes nas membranas das células, desestabilizando e promovendo a ruptura celular (Bissinger, 2014). Em relação ao CHAPS, um detergente zwitteriônico, é amplamente utilizado para romper suavemente e de maneira eficaz a membrana celular. CHAPS destrói as interações proteína-proteína, mas é capaz de proteger o estado nativo ou conformação proteica, sendo utilizado tanto para lise celular quanto para purificação de proteínas (Labeta et al., 1988).

Figura 5: Cladograma de verosimilhança baseada na correlação de Pearson construída com espectrometria de massas por MALDI-TOF. Dados referentes a utilização dos tampões CHAPS e Saponina.



Referências

BISSINGER, Rosi et al. Efeito da saponina nos eritrócitos. **Jornal internacional de hematologia**, v. 100, n. 1, pág. 51-59, 2014.

CHOUREY, Karuna et al. Direct cellular lysis/protein extraction protocol for soil metaproteomics. **Journal of proteome research**, v. 9, n. 12, p. 6615-6622, 2010.

FLORIO, Walter et al. Recent advances and ongoing challenges in the diagnosis of microbial infections by MALDI-TOF mass spectrometry. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 1097, 2018.

GRABSKI, Anthony C. Advances in preparation of biological extracts for protein purification. **Methods in enzymology**, v. 463, p. 285-303, 2009.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira et al. Geographic expansion of sporotrichosis, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 3, p. 621, 2020.

HOU, Tsung-Yun; CHIANG-NI, Chuan; TENG, Shih-Hua. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. **Journal of food and drug analysis**, v. 27, n. 2, p. 404-414, 2019.

LI, Wei et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing for urinary tract pathogens by direct analysis of urine samples using a MALDI-TOF MS-based combined protocol. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1182, 2019.

LABETA, Mario O.; FERNANDEZ, Nelson; FESTENSTEIN, Hilliard. Solubilisation effect of Nonidet P-40, triton X-100 and CHAPS in the detection of MHC-like glycoproteins. **Journal of immunological methods**, v. 112, n. 1, p. 133-138, 1988.

MF MATOS, Aline et al. Identification by MALDI-TOF MS of *Sporothrix brasiliensis* isolated from a subconjunctival infiltrative lesion in an immunocompetent patient. **Microorganisms**, v. 8, n. 1, p. 22, 2020.

NOLL, Christine et al. Rapid direct detection of pathogens for diagnosis of joint infections by MALDI-TOF MS after liquid enrichment in the Bact/Alert blood culture system. **Plos one**, v. 15, n. 12, p. e0243790, 2020.

NIU, Liangjie et al. Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0202238, 2018.

ISAACSON, Tal et al. Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 769-774, 2006.

QUEIROZ-TELLES, Flavio; BUCCHERI, Renata; BENARD, Gil. Sporotrichosis in immunocompromised hosts. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 8, 2019.

RYZHOV, Victor; FENSELAU, Catherine. Characterization of the protein subset desorbed by MALDI from whole bacterial cells. **Analytical chemistry**, v. 73, n. 4, p. 746-750, 2001.

RYCHERT, Jenna. Benefits and limitations of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of microorganisms. **Journal of Infectiology**, v. 2, n. 4, 2019.

SCHUBERT, Sören; KOSTRZEWA, Markus. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: current trends. **Current issues in molecular biology**, v. 23, n. 1, p. 17-20, 2017.

4- Conclusão

O presente trabalho trouxe a elaboração de um estudo pioneiro para o estado de Pernambuco no que se refere ao status socioepidemiológico da esporotricose. Concluiu-se que a doença está em expansão no estado e apresenta padrões similares a outros estudos, como por exemplo, a principal manifestação clínica ser a linfocutânea, as mulheres sendo mais afetadas e a incidência crescente da doença relacionar-se a condições socioeconômicas desfavoráveis. Em relação a propor a identificação de fungos do complexo *Sporothrix* spp., a partir de material biológico biopsiado, obteve-se resultados promissores e inovadores no campo da proteômica. A metodologia aplicada será utilizada em estudos posteriores que irão ser o caminho para continuidade da pesquisa de biomarcadores proteicos diretamente de fragmentos de pele para o diagnóstico da esporotricose, que poderá ser realizado de forma mais rápida e precisa trazendo melhorias a saúde pública.