

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

ISABELA DA CRUZ BAHIENSE ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SPOROTHRIX*
SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

VITÓRIA

2022

ISABELA DA CRUZ BAHIENSE ROCHA

**IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SPOROTHRIX*
SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares

Coorientador: Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues

VITÓRIA

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

R672i Rocha, Isabela da Cruz Bahiense, 1998-
Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo / Isabela da Cruz Bahiense Rocha. - 2022.
104 f. : il.

Orientadora: Sarah Gonçalves Tavares.
Coorientador: Anderson Messias Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Fungos. 2. Diagnóstico micológico. 3. Epidemiologia molecular. I. Tavares, Sarah Gonçalves. II. Rodrigues, Anderson Messias. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas

PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO

O(a) mestrando(a) Isabela da Cruz Bahiense Rocha apresentou a tese intitulada "Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu () aprovar () reprovar a dissertação habilitando Isabela da Cruz Bahiense Rocha a obter o Grau de Mestre(a) em Doenças Infecciosas.

Vitória, 29 de julho de 2022.

Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora

Prof. Dr. Patricio Godoy Martínez
Universidad Austral de Chile – Titular Externo

Profa. Dra. Creuza Rachel Vicente
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno



Centro de Ciências da Saúde – Av. Marechal Campos, 1468 - Bonfim, Vitória - ES | CEP 29047-105 Tel: (27) 3335-7504 |
www.doencasinfecciosas.ufes.br | ppgdi.ufes@gmail.com

DEDICATÓRIA

Essa dissertação é dedicada aos meus pais, Maria das Neves e José Bahiense, e ao meu esposo Bruno Ramos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus, pelo cuidado e amor a minha vida, por sempre estar comigo, especialmente em tempos tão difíceis.

Agradeço aos meus pais que nunca mediram esforços para realizar os meus sonhos e por acreditarem que eu sou capaz. Compartilho essa trajetória com vocês. Foi por vocês.

Ao meu esposo, Bruno, por cada palavra de incentivo. Obrigada por entender e vivenciar o meu processo com amor, paciência e zelo.

A minha orientadora Profa. Dra. Sarah Gonçalves Tavares, por ser essa pessoa e profissional incrível. Obrigada pela oportunidade ímpar de trabalharmos juntas e por sempre extrair o melhor de mim, mesmo quando não notava. Não tenho como agradecer por tudo durante esses cinco anos de caminhada... Minha eterna gratidão e admiração.

A toda equipe de alunos e servidores que fizeram e fazem parte do Centro de Investigação em micologia Médica (CIMM), em especial a farmacêutica Simone Maifrede pela ajuda em todos os experimentos do TSA e por me auxiliar desde 2017 no laboratório.

A equipe do Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes (LAPEM) na UNIFESP, em especial ao Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues pela parceria e por sempre me receber tão bem ao longo desses anos. Obrigada também a Jamile Carvalho por me repassar o seu conhecimento e me auxiliar nos experimentos de biologia molecular.

Agradeço aos demais membros do projeto, Dr. Aloísio Falqueto e ao Wdson Luiz Lima Kruschewsky, pelo envio das amostras e ajuda quanto aos dados clínicos.

As agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

RESUMO

CRUZ BAHIENSE ROCHA, I. **Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo.** Dissertação (mestrado). Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2022. 104p.

A esporotricose é uma infecção fúngica subcutânea que afeta humanos e animais causada por espécies do gênero *Sporothrix* spp. Informações sobre a diversidade genética e estrutura populacional do patógeno são necessárias para traçar estratégias eficazes para enfrentar o avanço da esporotricose em áreas endêmicas. O objetivo do estudo foi avaliar a diversidade genética e estrutura da populacional das espécies de *Sporothrix* no estado do Espírito Santo, a fim de compreender melhor a sua epidemiologia, distribuição, diversidade e explorar as possíveis rotas de transmissão envolvidas nos surtos em andamento. Neste estudo, foram investigadas 262 amostras, sendo 142 provenientes de humanos e 120 de felinos no período de 2016 a 2021. Os isolados foram identificados de acordo com as características morfológicas (macro e micromorfologia) e moleculares. Em seguida, foi realizada a extração do DNA fúngico e aplicada a técnica de PCR espécie-específica utilizando marcadores direcionados ao gene da calmodulina. Os idiomorfos sexuais foram identificados por PCR mating-type utilizando iniciadores direcionados aos loci *MAT1-1* e *MAT1-2*. A técnica de polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) foi aplicada para compreender melhor a dinâmica da doença, variabilidade genética e origem dos isolados testados. Por fim, foi realizado o teste de susceptibilidade aos antifúngicos seguindo o protocolo M32-A2 do CLSI, frente aos antifúngicos anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina. Dos isolados provenientes de amostras humanas, 125 foram identificados como *S. brasiliensis* e 17 como *S. schenckii* s. str. Por outro lado, 100% dos isolados de felinos foram identificados como *S. brasiliensis*. Em ambas as espécies foram detectadas a presença dos dois idiomorfos sexuais, entretanto, o *MAT1-2* foi predominante, sugerindo que os isolados do estado do Espírito Santo possam ter sido originados do Rio de Janeiro. A esporotricose no estado assume um caráter epidêmico-urbano de forma abrupta nos últimos anos devido à espécie *S. brasiliensis*. Além disso, a terbinafina demonstrou ser o antifúngico com melhores

resultados *in vitro*, embora na prática clínica o itraconazol segue sendo primeira escolha de tratamento. A esporotricose segue avançando no estado, portanto, estratégias de contenção da doença devem ser traçadas pelo sistema de saúde, a fim de evitar conter epidemias futuras da esporotricose.

Palavras-chave: *Sporothrix*. Esporotricose. Espírito Santo. Diversidade Genética. Estrutura populacional.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection that affects humans and animals caused by species of the genus *Sporothrix* spp. Information about genetic diversity and the population structure of the pathogen is necessary to devise effective strategies to face the advance of sporotrichosis in endemic areas. Therefore, this study aimed to evaluate the genetic diversity and population structure of *Sporothrix* species, to better understand their epidemiology, distribution, and diversity, and explore possible transmission routes involved in the ongoing outbreaks. In the study, 262 samples were investigated, 142 from humans and 120 from felines in the period from 2016 to 2021. The isolates were identified according to morphological (macro and micromorphology) and molecular characteristics. Then, the fungal DNA extraction was performed and the species-specific PCR was applied using markers directed to the calmodulin gene. Sexual idiomorphs were identified by mating-type PCR using primers targeted to the *MAT1-1* and *MAT1-2* loci. The technique of amplified fragment length polymorphism (AFLP) was used to assess the dynamics of the disease, genetic variability, and origin of the isolates. Finally, the antifungal susceptibility test was performed following the CLSI M32-A2 protocol, with amphotericin B, itraconazole, posaconazole, and terbinafine. In isolates from human samples, 125 were identified as *S. brasiliensis* and 17 as *S. schenckii* s. str. On the other side, all the feline isolates were identified as *S. brasiliensis*. In both species, the presence of two sexual idiomorphs was detected; however, *MAT1-2* was predominant, suggesting that the isolates from the state of Espírito Santo may have originated from Rio de Janeiro state. In recent years, sporotrichosis has taken an abruptly urban-epidemic characteristic due to the species *S. brasiliensis*. In addition, terbinafine proved to be the antifungal with the best results *in vitro*, although in clinical practice itraconazole remains the first choice of treatment. Sporotrichosis continues to advance in the state; therefore, strategies to contain the disease must be outlined by the health system, to avoid containing future epidemics of sporotrichosis.

Keywords: *Sporothrix*. Sporotrichosis. Espírito Santo. Genetic diversity. Population structure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Macromorfologia e micromorfologia de <i>Sporothrix</i> spp. a 25°C | 19 |
| Figura 2 – Macromorfologia e micromorfologia de <i>Sporothrix</i> spp. a 37 °C | 19 |
| Figura 3 – Relação filogenética entre espécies ambientais e clínicas do gênero <i>Sporothrix</i> | 21 |
| Figura 4 – Distribuição das espécies de <i>Sporothrix</i> no mundo..... | 22 |
| Figura 5 – Distribuição geográfica de casos suspeitos de esporotricose felina no estado do Espírito Santo no período de março de 2019 a abril de 2020 (n=154). | 25 |
| Figura 6 – Manifestações clínicas da esporotricose..... | 27 |
| Figura 7 – Reconhecimento de espécies pertencentes ao gênero <i>Sporothrix</i> usando métodos clássicos e moleculares..... | 31 |
| Figura 8 – Esquema do locus mating-type em espécies de <i>Sporothrix</i> . (A) Gene <i>MAT1-1-1</i> codifica a proteína α -box; (B) Gene <i>MAT 1-2-1</i> codifica proteína de domínio HMG. | 33 |
| Figura 9 – Macro e Micromorfologia das espécies de <i>Sporothrix</i> cultivadas em PDA a 25°C por 14 dias..... | 52 |
| Figura 10 – Distribuição das espécies de <i>Sporothrix</i> provenientes de humanos (n=142) e felinos (n=120) no estado do Espírito Santo identificados por PCR espécie-específica..... | 53 |
| Figura 11 – Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de <i>Sporothrix</i> com DNA amplificado pela técnica de PCR espécie-específica para identificação de espécies e presença do idiomorfo sexual pela PCR <i>mating-type</i> | 54 |
| Figura 12 – Distribuição do tipo de acasalamento (<i>mating-type</i>) em isolados humanos detectado por PCR nos isolados identificados como <i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> (n=17) e <i>Sporothrix brasiliensis</i> (n=125). | 55 |
| Figura 13 – Panorama atual da esporotricose humana e distribuição das espécies de <i>S. schenckii s. str.</i> e <i>S. brasiliensis</i> antes de 2015 e entre 2016-2021..... | 56 |
| Figura 14 – Manifestações clínicas da esporotricose de pacientes incluídos no estudo. | 58 |
| Figura 15 – Variação do tempo entre os primeiros sintomas até o diagnóstico definitivo dos pacientes incluídos no estudo. | 59 |
| Figura 16 – Antifúngicos selecionados para o tratamento da esporotricose dos pacientes incluídos no estudo. | 61 |

| | |
|---|----|
| Figura 17 – Dendrograma representando o perfil de agrupamento gerado pela técnica de AFLP resultantes dos isolados de <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii sensu stricto</i> presentes no estado do Espírito Santo..... | 63 |
| Figura 18 – Árvore geradora mínima (MST) das espécies de <i>Sporothrix brasiliensis</i> e <i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> avaliadas neste estudo..... | 65 |
| Figura 19 – Análise de componente principal (PCA) e escalonamento multidimensional (MDS) das espécies de <i>Sporothrix</i> no estado do Espírito Santo. .. | 66 |
| Figura 20 – Distribuição dos genótipos de <i>Sporothrix</i> spp. gerados pelo AFLP utilizando <i>Self-Organizing Map</i> (SOM) das espécies de <i>Sporothrix brasiliensis</i> e <i>Sporothrix schenckii sensu stricto</i> . .. | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo confirmados com esporotricose (n=132). | 57 |
| Tabela 2 – Tratamento de escolha dos pacientes incluídos no estudo antecedendo o diagnóstico de esporotricose (n=132). | 60 |
| Tabela 3 – Isolados obtidos de felinos com esporotricose no estado do Espírito Santo e incluídos no AFLP. | 62 |
| Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos 96 isolados de <i>Sporothrix</i> spp. provenientes de amostras humanas frente anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina. | 67 |
| Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade antifúngica <i>in vitro</i> dos 20 isolados de felinos frente anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina. | 68 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFLP – Polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados

ANB – Anfotericina B

CAL – Calmodulina

CEM – Concentração efetiva mínima

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa em seres humanos

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CIM – Concentração inibitória mínima

CIMM – Centro de Investigação em Micologia Médica

CTZ – Cetoconazol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

EMD – Exame micológico direto

ES – Espírito Santo

FAM – 6-carboxifluoresceína

g – grama

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes

IgG – Imunoglobulina da classe G

ITS – Espaçador Interno Transcrito

ITZ – Itraconazol

kDa – Kilodalton

KI – Iodeto de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

LAPEM – Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes

MALDI - TOF MS – Espectrometria de massas por ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz tempo-de-voo

MAT – *Mating-type*

mm – Milímetro

MYC – Ágar Mycosel

N – Número de amostras

PAS – Periodic acid-Schiff

pb – Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PDA – Ágar Batata Dextrose

PSC – Posaconazol

qPCR= reação da cadeia da polimerase quantitativa

RAPD - Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso

RCA – Amplificação em círculo rolante

rpm – Rotações por minuto

SDA – Ágar Sabouraud dextrose

T – Total de amostras

TRB – Terbinafina

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UV – Radiação Ultravioleta

VRC – Voriconazol

V – Volt

μg = Micrograma

μL - Microlitro

® = Marca registrada

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Aspectos gerais e epidemiologia da esporotricose | 18 |
| 1.2 Características clínicas da esporotricose..... | 26 |
| 1.3 Diagnóstico e identificação de espécies do gênero <i>Sporothrix</i> | 28 |
| 1.4 Distribuição de <i>mating-types</i> das espécies pertencentes ao gênero <i>Sporothrix</i> | 32 |
| 1.5 Tratamento e perfil de susceptibilidade a antifúngicos | 34 |
| 2. OBJETIVOS | 38 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 38 |
| 2.2 Objetivos específicos | 38 |
| 3. METODOLOGIA | 39 |
| 3.1 Obtenção, seleção e caracterização dos isolados incluídos no estudo | 39 |
| 3.2 Análise de dados clínicos, epidemiológicos e terapêuticos | 40 |
| 3.3 Verificação da viabilidade e pureza dos isolados previamente aos experimentos..... | 40 |
| 3.4 Identificação dos isolados de <i>Sporothrix</i> aplicando o conceito polifásico de espécie..... | 40 |
| 3.4.1 Identificação fenotípica dos isolados | 40 |
| 3.5 Identificação molecular dos isolados incluídos no estudo..... | 41 |
| 3.5.1 Extração de DNA genômico dos isolados..... | 41 |
| 3.5.2 PCR espécie-específico a partir de iniciadores que codificam fragmentos do gene da calmodulina | 42 |
| 3.6 Detecção do tipo de acasalamento de isolados de <i>Sporothrix</i> por PCR <i>mating-type</i> duplex..... | 43 |
| 3.7 Genotipagem por polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) dos isolados de <i>Sporothrix</i> | 44 |
| 3.7.1 Purificação do DNA para a análise por AFLP | 44 |
| 3.7.2 Condições da técnica de AFLP..... | 45 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.7.3 | Análise dos dados brutos obtidos através do AFLP | 47 |
| 3.8 | Avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica <i>in vitro</i> | 47 |
| 3.8.1 | Preparação do meio de cultivo para o teste de sensibilidade aos antifúngicos <i>in vitro</i> | 48 |
| 3.8.2 | Diluição dos antifúngicos selecionados | 48 |
| 3.8.3 | Preparação do inóculo fúngico e inoculação em meio RPMI-1640..... | 49 |
| 3.8.4 | Leitura dos testes de susceptibilidade <i>in vitro</i> e análise de dados..... | 49 |
| 4. | RESULTADOS | 51 |
| 5. | DISCUSSÃO | 69 |
| 6. | CONCLUSÃO | 78 |
| | REFERÊNCIAS..... | 79 |
| | ANEXOS | 93 |
| | Anexo I – Comitê de ética no uso de animais | 93 |
| | Anexo III – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo (n=132) de acordo com a região e município de origem | 98 |
| | Anexo IV – Produções científicas durante o período de mestrado | 102 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais e epidemiologia da esporotricose

A esporotricose é uma micose cutânea ou subcutânea causada por fungos do gênero *Sporothrix*, sendo mundialmente distribuída, especialmente nas zonas tropicais e subtropicais. A rota clássica de transmissão ocorre por inoculação traumática de solo, plantas e matéria orgânica contaminada com propágulos fúngicos no tecido do hospedeiro (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). Certas atividades de lazer e ocupacionais, como jardinagem, agricultura, mineração e exploração de madeira, são tradicionalmente associadas a essa micose (BARROS *et al.*, 2011). Alternativamente, a infecção pode ocorrer durante a transmissão animal-animal e transmissão zoonótica, sendo esta última associada principalmente a arranhões ou mordidas de gatos infectados (GREMIÃO *et al.*, 2017).

Sporothrix é um fungo termodimórfico que possui a capacidade de alternar sua morfologia entre fungo filamentosos e levedura em resposta a estímulos térmicos e outras condições ambientais. Na fase saprófita (micelial a 25°C) apresenta na microscopia hifas delgadas, hialinas, septadas e ramificadas contendo conidióforos finos, cujo ápice forma uma vesícula pequena com conídios dispostos de forma simpodial (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Esses conídios formam aglomerados semelhantes a margaridas e podem ser ovóides ou alongados, medindo 3-6 x 2-3 µm, hialinos, unicelulares com paredes lisas, e em alguns casos, podem apresentar pigmentação (MARIMON *et al.*, 2007). As colônias a 25°C são de crescimento lento, úmidas e glabras, com uma superfície enrugada e dobrada, com pigmentação que pode variar de branco a creme e preto (Figura 1) (BONIFAZ E TIRADO-SANCHEZ, 2017). A fase parasitária (leveduriforme a 37°C) apresenta células em forma de fuso e/ou ovais, medindo 2,5 a 5 µm de diâmetro, sendo semelhante a um "charuto", cujas colônias podem variar de coloração podendo ser brancas até amarelo acinzentadas (Figura 2) (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2006). O termodimorfismo é um dos principais fatores virulência do gênero *Sporothrix*, podendo ser encontrado em outros patógenos fúngicos, tais como: *Blastomyces* spp., *Paracoccidioides* spp., *Histoplasma* spp. e *Coccidioides* spp. (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

A esporotricose humana foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos, no ano de 1896, por Bernard Schenck, a partir do aspirado de lesão cutânea de um paciente. Em 1900, ainda nos Estados Unidos, Hektoen e Perkins descreveram o segundo caso da doença e, após isolarem o agente etiológico em questão, propuseram sua nomenclatura como *Sporothrix schenckii* (BARROS *et al.*, 2011).

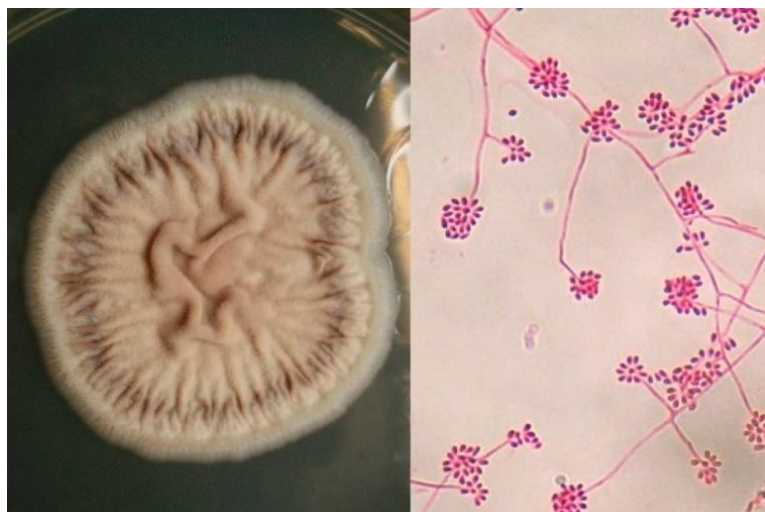


Figura 1 – Macromorfologia e micromorfologia de *Sporothrix* spp. a 25°C (Fonte: BONIFAZ E TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

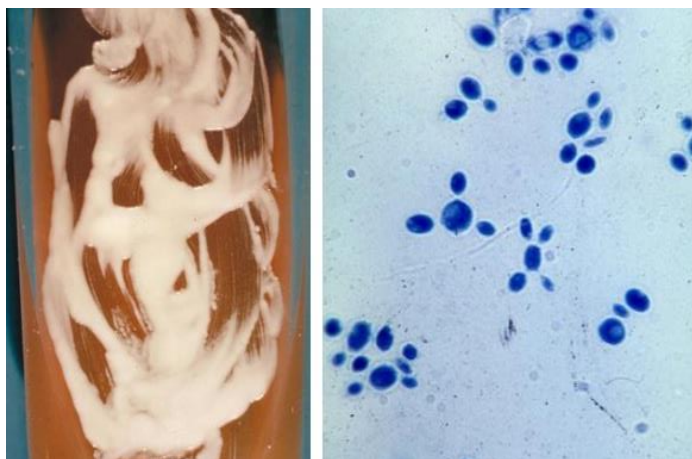


Figura 2 – Macromorfologia e micromorfologia de *Sporothrix* spp. a 37 °C (Fonte: GEORG, 1964)

Um dos maiores surtos da doença já registrados foi descrito na África do Sul entre 1938 e 1949, no qual afetou mais de 3000 trabalhadores de minas de ouro. A fonte de transmissão por *Sporothrix* spp. ocorreu por meio dos pilares de madeira utilizados para manter os telhados das minas (CHAKRABARTI *et al.*, 2015). No Brasil, os primeiros achados clínicos relacionados à esporotricose ocorreram em

1907, quando Lutz e Splendore relataram as primeiras ocorrências do fungo em pacientes brasileiros. Após descreverem o primeiro caso desta doença em humanos, reportaram, pela primeira vez, a possibilidade de cultivo do fungo em sua fase leveduriforme *in vitro*, além da infecção natural por este microrganismo em ratos (LUTZ E SPLENDORE, 1907).

Até poucos anos atrás, a esporotricose foi atribuída a um único agente causal, *Sporothrix schenckii*. No entanto, a partir de 2006, com os avanços das ferramentas moleculares, foi demonstrada a variabilidade genética entre os isolados morfológicamente identificados como essa espécie (MARIMON *et al.*, 2006). Marimon *et al.* (2007) descreveram seis espécies novas com base na análise de sequências de DNA de três *loci* codificadores de proteínas (quitina sintase, β -tubulina e calmodulina) e características fenotípicas (morfologia dos conídios, termotolerância e assimilação de carboidratos). Baseado nos achados de Marimon e colaboradores, *S. schenckii* foi reclassificado em um complexo de espécies composto por: *Sporothrix albicans*, *Sporothrix brasiliensis*, *Sporothrix globosa*, *Sporothrix luriei*, *Sporothrix mexicana* e *S. schenckii sensu stricto* (*s. str.*), sendo a espécie *S. brasiliensis* relacionada a manifestações clínicas atípicas e mais graves (MARIMON *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2016).

Até o presente momento, foram descritas 62 espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix* (OSTAFIŃSKA *et al.*, 2021). A partir de análises filogenéticas realizadas por Rodrigues *et al.* (2020), o gênero *Sporothrix* foi dividido em dois clados, i) clado clínico ou patogênico, composto pelas principais espécies de relevância clínica (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. schenckii s. str.* e *S. luriei*) e ii) clado ambiental, englobando as demais espécies geralmente não patogênicas, com casos raros de infecções em mamíferos (Figura 3) (RODRIGUES *et al.*, 2020a).

As espécies de *Sporothrix* geralmente estão ligadas a rotas de transmissão específicas e são geograficamente distribuídas de forma heterogênea (Figura 4) (RODRIGUES *et al.*, 2020a; ZHANG *et al.*, 2015). A espécie *S. globosa* está diretamente relacionada à via de transmissão ambiental e possui ampla distribuição geográfica. Amostras clínicas já foram recuperadas em todo o continente Americano, Europa, Ásia e Austrália. Todavia, a Ásia é o continente em que esta espécie é mais prevalente com diversos casos relatados na Índia, China, Japão e Malásia (MADRID *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2021b). Cabe destacar a crescente incidência de

casos na região nordeste da China, especialmente na província de Jilin, que vivencia um surto pela transmissão sapronótica (SONG *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2017). A espécie *S. luriei* até o momento foi isolada apenas na África do Sul (CARVALHO *et al.*, 2021b).

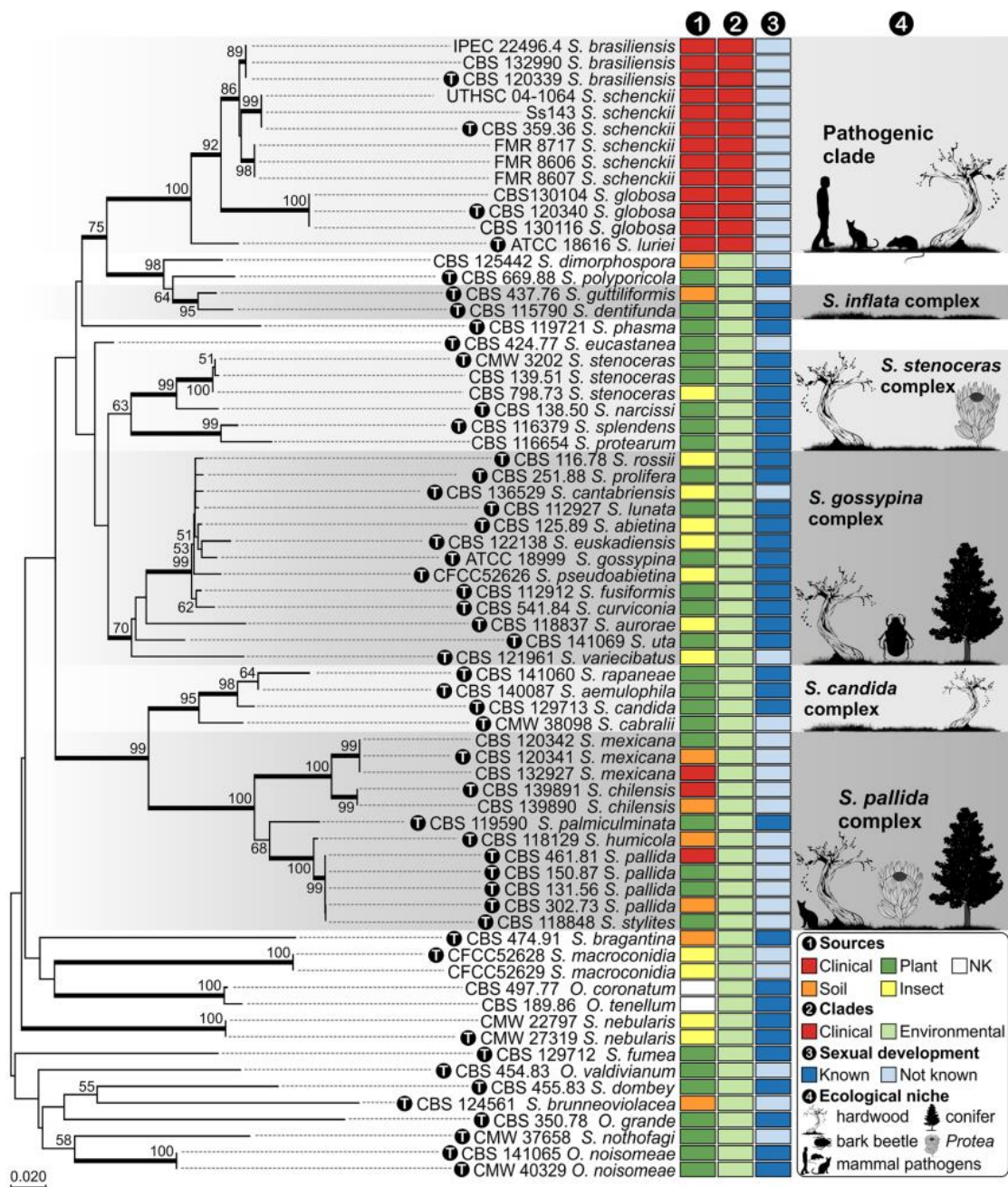


Figura 3 – Relação filogenética entre espécies ambientais e clínicas do gênero *Sporothrix* (Fonte: RODRIGUES *et al.*, 2020a).

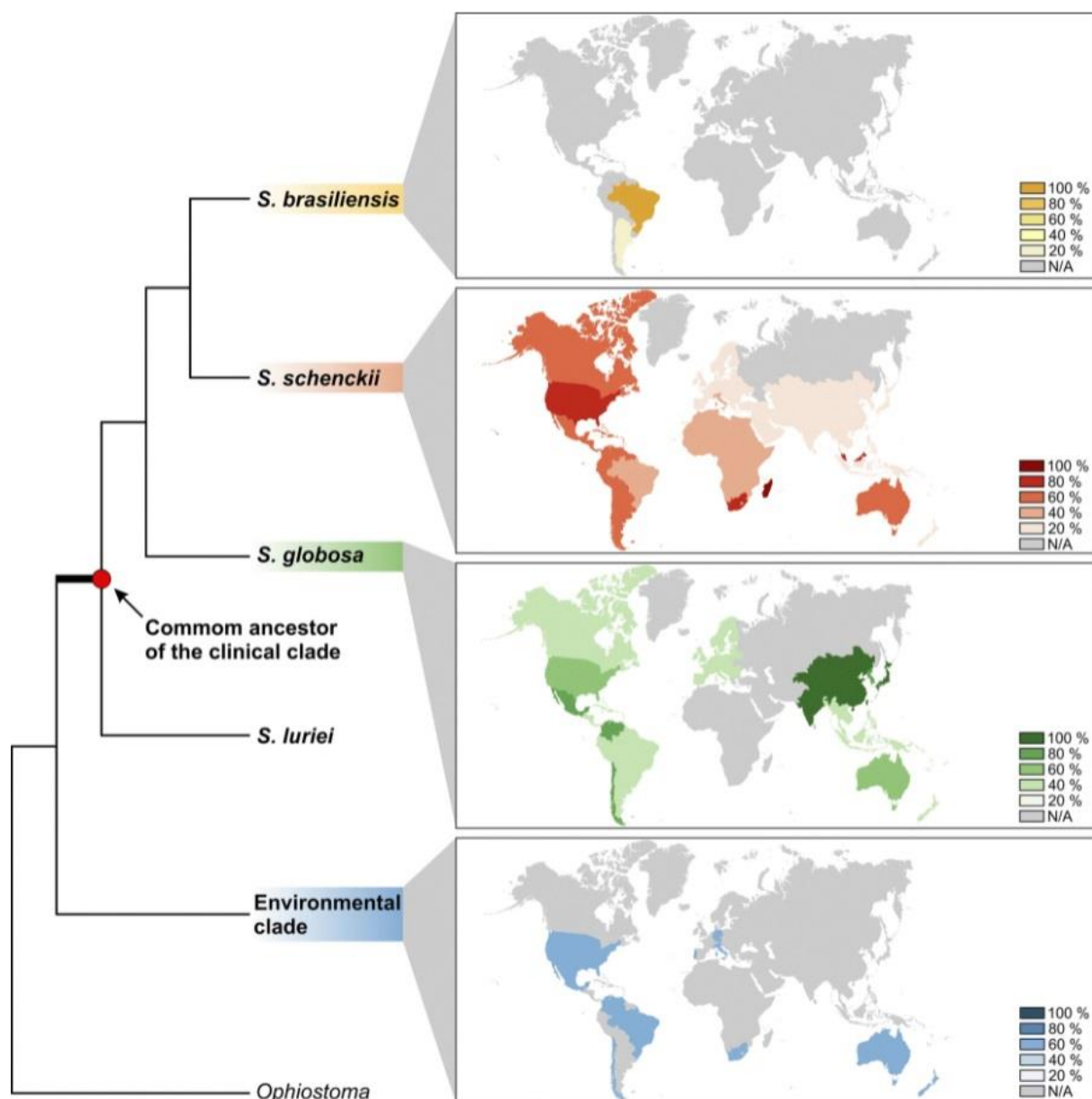


Figura 4 – Distribuição das espécies de *Sporothrix* no mundo (Fonte: RODRIGUES et al., 2020a).

A transmissão por *S. schenckii s. str.* também ocorre geralmente pela via clássica, com casos relatados em todos os continentes, sendo eles: América do Norte (Estados Unidos e México), América Central (Guatemala), América do Sul (Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Peru, Venezuela, Uruguai), Europa (França, Itália, Espanha, Holanda, Alemanha), África (África do Sul, Moçambique, Madagascar), Ásia (Japão, China, Tailândia, Irã e Malásia) e Austrália (RODRIGUES et al., 2020a; CARVALHO et al., 2021b).

Por outro lado, *S. brasiliensis* é uma espécie emergente no Brasil com proporções epidêmicas, sendo altamente patogênica para seres humanos e animais (RODRIGUES *et al.*, 2016). A Argentina, por sua vez, também tem reportado casos de esporotricose por *S. brasiliensis* mais recentemente (ETCHECOPAZ *et al.*, 2019). Em virtude a endemicidade da doença no Brasil, os países da América do Sul podem abarcar futuramente cenários endêmicos da esporotricose devido a sua rápida expansão. Novos casos de esporotricose zoonótica e felina possivelmente causada por *S. brasiliensis* já foram relatados também na Bolívia, Colômbia, Panamá e Paraguai (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

No Brasil, com exceção do estado de Roraima, casos isolados, pequenos surtos e séries de casos têm sido relatados no país (RABELLO *et al.*, 2021). Porém, cabe destacar a região sudeste do país que tem sofrido uma grande epidemia devido à transmissão zoonótica, sendo os gatos o principal vetor pelo qual a doença é transmitida ao homem e a outros animais, e *S. brasiliensis* a principal espécie envolvida nessa rota de transmissão (RODRIGUES *et al.*, 2014).

É importante levar em consideração o avanço histórico da esporotricose no estado do Rio de Janeiro (RJ), atualmente epicentro da doença no Brasil. De 1997 a 2011, 4.188 casos humanos foram registrados na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro (GREMIÃO *et al.*, 2017). A esporotricose passou a ser um grande desafio de saúde pública no estado e devido à ascensão progressiva da doença, tornou-se um agravo de notificação estadual a partir da Resolução nº 674, de 12 de julho de 2013 da Secretaria Estadual de Saúde do Rio de Janeiro (SES/RJ) (RIO DE JANEIRO, 2013).

Segundo a Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses – GERDTVZ, no boletim epidemiológico publicado em maio de 2018, entre o período de 2015 a 2017, foram confirmados 3291 casos de esporotricose humana no Rio de Janeiro. A expansão da esporotricose felina no RJ ocorreu de forma ainda mais acentuada, sendo confirmados 4703 casos até o ano de 2015, justificando os felinos como principais responsáveis na rota de transmissão zoonótica (RODRIGUES *et al.*, 2013; GREMIÃO *et al.*, 2017). Em um novo boletim publicado em 21 de abril de 2021, foram relatados 2616 novos casos de esporotricose humana confirmados entre os anos de 2019 e 2020 (GERDTVZ, 2018; GERDTVZ, 2021). Lembrando que esses valores podem estar subestimados em virtude da pandemia de SARS-CoV-2.

Há um crescente aumento nos relatos de casos de esporotricose felina em todo o mundo, principalmente no Brasil, sendo *S. brasiliensis* a principal espécie envolvida, seguido por *S. schenckii* s. str. e *S. globosa* com menos frequência. Ademais, espécies mais raras como *S. pallida* e *S. humicola* já foram identificadas como causadoras da infecção em felinos no Reino Unido e Austrália (ZHANG *et al.*, 2019; HAN E KANO, 2020; MAKRI *et al.*, 2020). Apesar dos gatos serem os animais mais afetados pela esporotricose, cabe destacar que outros animais também podem estar atuando como vetores para a transmissão da doença, havendo diversos relatos de casos envolvendo cães, tatus, equinos e outros mamíferos (DÍAZ, 1989; MADRID *et al.*, 2007; BOSCARATO *et al.*, 2016; RODRIGUES *et al.*, 2020a).

Já no Espírito Santo, os casos de esporotricose humana registrados na literatura datam desde o ano de 1982, a partir de pacientes atendidos no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), localizado na capital do estado, Vitória, sendo naquela época casos restritos a região serrana do estado (FALQUETO *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2015; CAUS *et al.*, 2019). Sabe-se que no período de 1982 a 2012, apenas no ambulatório do serviço de Doenças Infecciosas do HUCAM, foram diagnosticados 171 casos de esporotricose humana. Destes, 160 casos (93,57%) foram confirmados por diagnóstico laboratorial por meio do isolamento do *S. schenckii sensu lato* e 11 (6,43%) pelo quadro clínico, com resposta satisfatória ao tratamento registrado no prontuário (CAUS *et al.*, 2019).

Araujo e colaboradores (2015) identificaram a nível molecular 18 isolados incluídos no estudo citado anteriormente, sendo a espécie mais prevalente *S. schenckii sensu stricto* (66,7%), seguido por *S. brasiliensis* (27,8%) e *S. globosa* (5,5%). Portanto, a esporotricose no Espírito Santo apresentado nestes estudos é até então uma doença restrita às áreas rurais e montanhosas do estado, com temperaturas e altitudes ligeiramente mais baixas quando comparado à região metropolitana do estado, com transmissão a partir do fungo na sua forma saprofítica.

Em um estudo recente, conduzido por Cruz Bahiense Rocha e colaboradores (2021), avaliando 75 isolados de *Sporothrix*, foi observado um novo cenário da esporotricose no estado, na qual a doença se difunde e se expande em áreas urbanas de forma abrupta. A doença tem se disseminado para vários municípios, inclusive aqueles com perfil climático distinto aos encontrados por Caus e colaboradores (2019), ocorrendo em locais com temperaturas mais elevadas e de

maior umidade. Nesse novo perfil epidemiológico, a infecção ocorre por via zoonótica entre humanos e felinos, sendo *S. brasiliensis* a espécie mais prevalente (CRUZ BAHIENSE ROCHA *et al.*, 2021). Em um estudo realizado por Redigueri e colaboradores (2022), foram relatados no período de março de 2019 a abril de 2020 um total de 121 amostras de felinos positivas para esporotricose oriundas de cidades distintas no estado do Espírito Santo (Figura 5). Esses dados reiteram o fato de que o território capixaba vive uma epidemia de esporotricose felina, o que reflete diretamente na esporotricose humana devido à transmissão zoonótica ser a principal fonte de infecção por *Sporothrix* spp. atualmente no Brasil (REDIGUIERI *et al.*, 2022).

Vale salientar que a esporotricose humana foi acrescentada na lista de doenças de notificação compulsória no estado do Espírito Santo segundo a PORTARIA Nº 054-R, de 31 de março de 2020 (ESPÍRITO SANTO, 2020), no entanto ainda é pouco conhecida pela população capixaba.

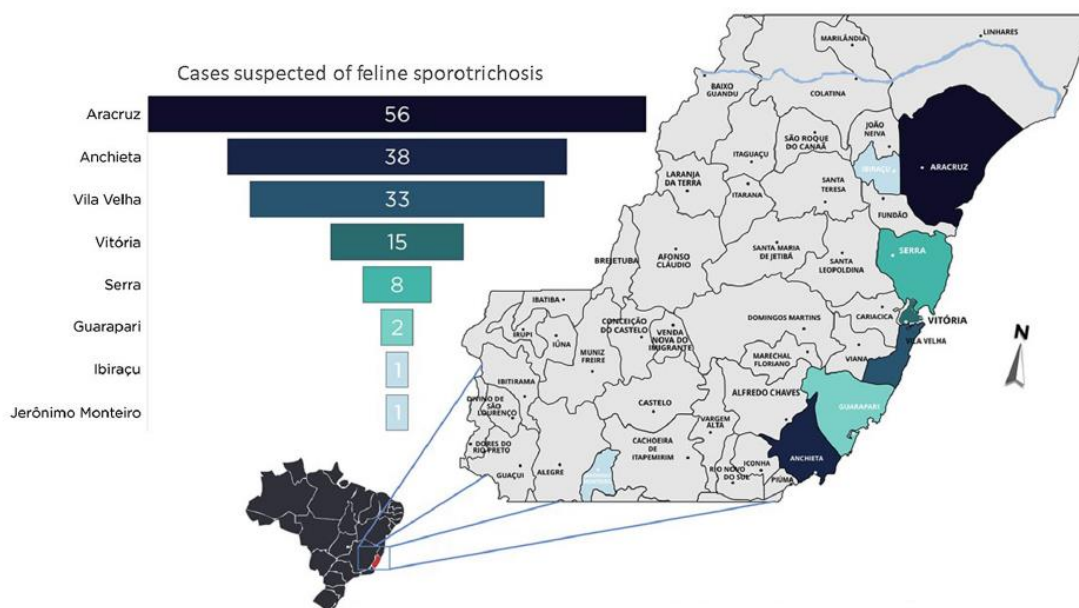


Figura 5 – Distribuição geográfica de casos suspeitos de esporotricose felina no estado do Espírito Santo no período de março de 2019 a abril de 2020 (n=154) (FONTE: REDIGUIERI *et al.*, 2022).

1.2 Características clínicas da esporotricose

A forma clínica sob a qual se apresenta a esporotricose depende de diversos fatores, como o tamanho do inóculo fúngico, profundidade da inoculação traumática, tolerância térmica da cepa e o estado imunológico do hospedeiro. As lesões costumam ser restritas à pele, tecido subcutâneo e vasos linfáticos adjacentes. Em raras ocasiões, pode disseminar para outros órgãos, ou ainda, ser primariamente sistêmica, resultante da inalação de conídios (BARROS *et al.*, 2010). É comumente observado o envolvimento dos membros superiores em 45-53% dos casos, seguido por lesões na face em 14-21% dos casos e membros inferiores 18-23% dos casos (ARENAS *et al.*, 2018).

As manifestações clínicas da esporotricose são divididas em cutânea e extracutânea, podendo, ainda, serem classificadas em: cutânea fixa ou localizada, linfocutânea, cutânea disseminada, mucosa e extracutânea ou sistêmica (Figura 6). A forma mais frequente é a linfocutânea, correspondendo a cerca de 80% dos pacientes afetados, no qual as lesões seguem os vasos linfáticos de forma ascendente (BARROS *et al.*, 2010; OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). A forma mucocutânea é uma variedade da forma cutânea, podendo atingir boca, faringe, olhos, seios da face, nariz e cordas vocais, sendo geralmente associada ao *S. brasiliensis* (EYER-SILVA *et al.*, 2019; ARINELLI *et al.*, 2020).

Já a forma cutânea fixa é relatada como a principal apresentação clínica em crianças, representada por uma única lesão ou poucas lesões no local de inoculação, que muitas vezes é ulcerada com bordas eritematosas. Alguns casos podem regredir espontaneamente. Embora exista uma patogênese distinta para cada situação, é difícil identificar se a apresentação clínica se deve à disseminação de uma única lesão ou a múltiplas inoculações (ARENAS *et al.*, 2018). As formas clínicas extracutâneas, tais como: esporotricose pulmonar, osteoarticular e o envolvimento do sistema nervoso central (SNC) são raras. Casos de esporotricose disseminada e formas mais graves da doença estão associados diretamente à imunossupressão, especialmente nos portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), *diabetes mellitus*, alcoolismo, uso de esteroides, transplante de órgãos, entre outros (CALLENS *et al.*, 2005; SILVA-VERGARA *et al.*, 2012; BONIFAZ E TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

A esporotricose no SNC é a principal manifestação que pode levar o paciente a óbito, podendo se manifestar unicamente como meningite crônica ou como parte da forma disseminada da doença (KAUFFMAN, 2019). Já foi demonstrado que os casos de esporotricose com acometimento do SNC, têm como agente responsável *S. brasiliensis*, espécie mais virulenta no gênero *Sporothrix*. Entretanto, alguns relatos na literatura também retratam *S. brasiliensis* causando meningite em pacientes imunocompetentes (FREITAS *et al.*, 2015; MIALSKI *et al.*, 2018). Apesar de ser uma micose com manifestações clínicas que geralmente se limitam às lesões cutâneas ou subcutâneas, vale destacar que existem relatos mais severos da doença e que a mesma não deve ser subestimada.

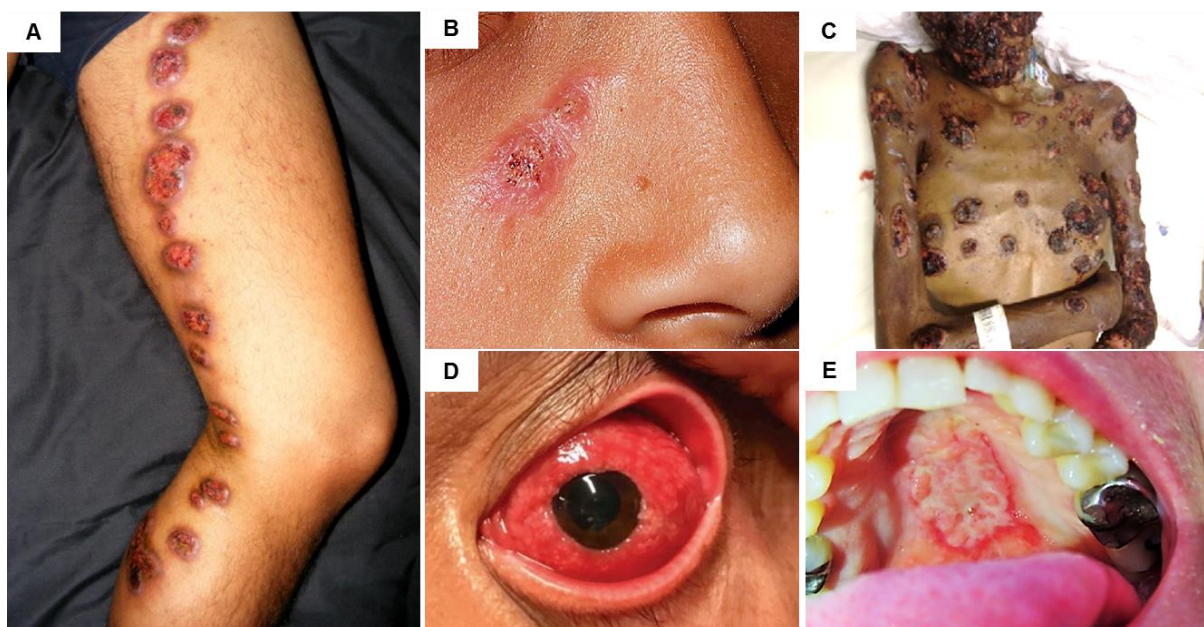


Figura 6 – Manifestações clínicas da esporotricose. A) Forma linfocutânea; B) Forma cutânea-fixa; C) Esporotricose disseminada; D) Variedade mucocutânea com acometimento ocular; E) Variedade mucocutânea com lesão no palato (FONTE adaptado de MAHAJAN, 2014; PAIXÃO *et al.*, 2015; EYER-SILVA *et al.*, 2019; ARINELLI *et al.*, 2020).

Devido à diversidade de apresentações clínicas, a esporotricose pode ser clinicamente semelhante a muitas outras doenças infecciosas e não infecciosas tanto tegumentares quanto sistêmicas. Dentre elas, nocardiose cutânea e cromoblastomicose, por exemplo (FERNÁNDEZ E LÓPEZ, 2020). Em regiões de alta endemicidade, o contexto epidemiológico deve ser levado em consideração no momento do diagnóstico (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017).

Os principais fatores que contribuem para a disseminação da esporotricose envolvem justamente: i) o desconhecimento da doença por maior parte da população; ii) ao comportamento dos felinos, por exemplo, brigas por território/reprodução/alimentação, fazendo com que o fungo se dissemine facilmente entre esses animais e, posteriormente, aos humanos que podem ser contaminados; iv) a capacidade de evolução do fungo ao longo dos anos (mutação e seleção natural); e v) ausência de medidas de saúde pública eficazes para contenção da doença (RODRIGUES *et al.*, 2020a).

1.3 Diagnóstico e identificação de espécies do gênero *Sporothrix*

A esporotricose pode ser diagnosticada através de uma combinação de manifestações clínicas/epidemiológicas e testes laboratoriais incluindo exame micológico direto (EMD), cultura, exame histopatológico, detecção molecular, testes intradérmicos com esporotriquina e detecção de anticorpos e antígenos (LOPEZ-BEZERRA *et al.*, 2018).

O EMD permite a visualização das leveduras a partir de amostras biológicas humanas através da solução de hidróxido de potássio (KOH) de 20 a 40%. Entretanto, essa técnica possui baixa sensibilidade devido ao tamanho pequeno das células (2 a 6 μm de diâmetro) e sua escassez nas amostras clínicas humanas (ARENAS *et al.*, 2018).

Para técnicas histopatológicas, a partir de amostras biológicas em seres humanos, a sensibilidade também é baixa devido à escassez de elementos fúngicos no tecido. O corpo asteroide e células leveduriformes podem ser observados pela coloração de hematoxilina e eosina (H&E), ácido periódico de Schiff (PAS) ou Gomori metenamina de prata (GMS), usadas para identificar estruturas fúngicas (LOPEZ-BEZERRA *et al.*, 2006). Segundo a literatura, essas estruturas estão presentes em 18 a 35,3% dos casos, dependendo da técnica. A presença de corpos asteroides ou fenômeno de Splendore-Hoeppli pode apontar para o diagnóstico de esporotricose, porém não é patognomônico (ARENAS *et al.*, 2018). Em contraste, as amostras provenientes de felinos têm uma carga fúngica muito maior, sendo possível visualizar as leveduras de *Sporothrix* spp. mais facilmente (ROSSOW *et al.*,

2020). O exame citopatológico demonstra ser um teste rápido, preciso e reprodutível para a prática veterinária, independente da gravidade das lesões nos gatos, com sensibilidade alcançando até 95% (REDIGUIERI *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços a respeito da biologia do *Sporothrix*, o método de referência para diagnosticar a esporotricose na rotina laboratorial ainda é baseado em cultura convencional em ágar Sabouraud dextrose (SDA) de espécimes clínicos, que podem ser obtidos a partir de lesões ativas, pus, secreção ou biópsias (RABELLO *et al.*, 2021). O tempo médio de crescimento desse fungo é de 7 a 14 dias a 25°C. A partir de culturas positivas, os isolados obtidos podem ser identificados acuradamente por métodos moleculares agregados aos fenotípicos e testados quanto sua susceptibilidade a antifúngicos *in vitro*, entre outros testes quando aplicável (ZHANG *et al.*, 2019).

Investigações visando o desenvolvimento destes diagnósticos baseados em ensaios imunológicos para detecção de *Sporothrix* spp. ocorrem desde 1970. Para isso é utilizado anticorpos específicos do fungo a partir do soro de pacientes. As técnicas de aglutinação e imunoenzimáticas, principalmente, vêm sendo ensaiadas (ALMEIDA-PAES *et al.*, 2007; CAROLIS *et al.*, 2022). Os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade e especificidade, não havendo, portanto, reação cruzada com outras infecções fúngicas e podem vir a ser uma importante ferramenta, não somente para o diagnóstico da esporotricose, como também para acompanhamento da evolução clínica mediante o manejo terapêutico através da quantificação dos títulos de anticorpos (BERNARDES-ENGEMANN *et al.*, 2005; RABELLO *et al.*, 2021).

A identificação clássica de espécies do gênero *Sporothrix* era baseada apenas em métodos fenotípicos, entre eles os morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (MARIMON *et al.*, 2006; LOPEZ-BEZERRA *et al.*, 2018). No entanto, com o uso de ferramentas moleculares, foi possível observar que o gênero era constituído por várias espécies que sobrepujam características fenotípicas, relacionadas filogeneticamente, não permitindo a identificação desses microrganismos baseando apenas nesses parâmetros. A fim de identificar acuradamente às espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, o mais adequado é utilizar a abordagem polifásica, na qual são investigadas, além das características

morfológicas, características moleculares e ecológicas (Figura 7) (RODRIGUES, 2010; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da biologia molecular permitiu também, o aumento substancial no número de métodos baseados em detecção de ácido nucléico para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. Muitos destes testes, incluindo o sequenciamento de DNA, PCR *nested*, PCR *fingerprinting*, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) de diferentes alvos genéticos, DNA polimórfico amplificado randomicamente (RAPD), polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP), *Rolling Circle Amplification* (RCA) e iniciadores específicos para espécies, foram desenvolvidos para detecção e identificação de *Sporothrix* spp. (HU *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2015a; RODRIGUES *et al.*, 2015b; ZHANG *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2021b; DELLA-TERRA *et al.*, 2021).

Entre todas as técnicas moleculares citadas, destacamos a PCR espécie-específica por utilizar iniciadores específicos que amplificam seletivamente o DNA para a identificação da espécie-alvo, sendo interespecificamente divergentes. Essa técnica apresenta baixo custo, é rápida e robusta, sendo capaz de detectar e identificar pequenos DNAs de patógenos com base em amostras isoladas, bem como amostras biológicas complexas (biópsia, solo, culturas mistas etc.), sem a necessidade de isolar o patógeno (RODRIGUES *et al.*, 2015a, OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). A PCR espécie-específica utiliza como marcador o gene da calmodulina e é considerado o método referência entre as demais ferramentas moleculares para identificação de espécies clínicas do gênero *Sporothrix* (RODRIGUES *et al.*, 2015a).

Atualmente, os limites moleculares entre *Sporothrix* spp. estão definidos, permitindo, assim, o estudo de numerosos marcadores moleculares para reconhecimento e identificação de espécimes clínicas (CAROLIS *et al.*, 2022). O desenvolvimento de métodos de genotipagem rápidos e de baixo custo é importante para o diagnóstico, bem como para estudos epidemiológicos. Ademais, devemos considerar que as espécies patogênicas em *Sporothrix* diferem em termos de sua variação geográfica, virulência e susceptibilidade às drogas antifúngicas (ZHANG *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018).

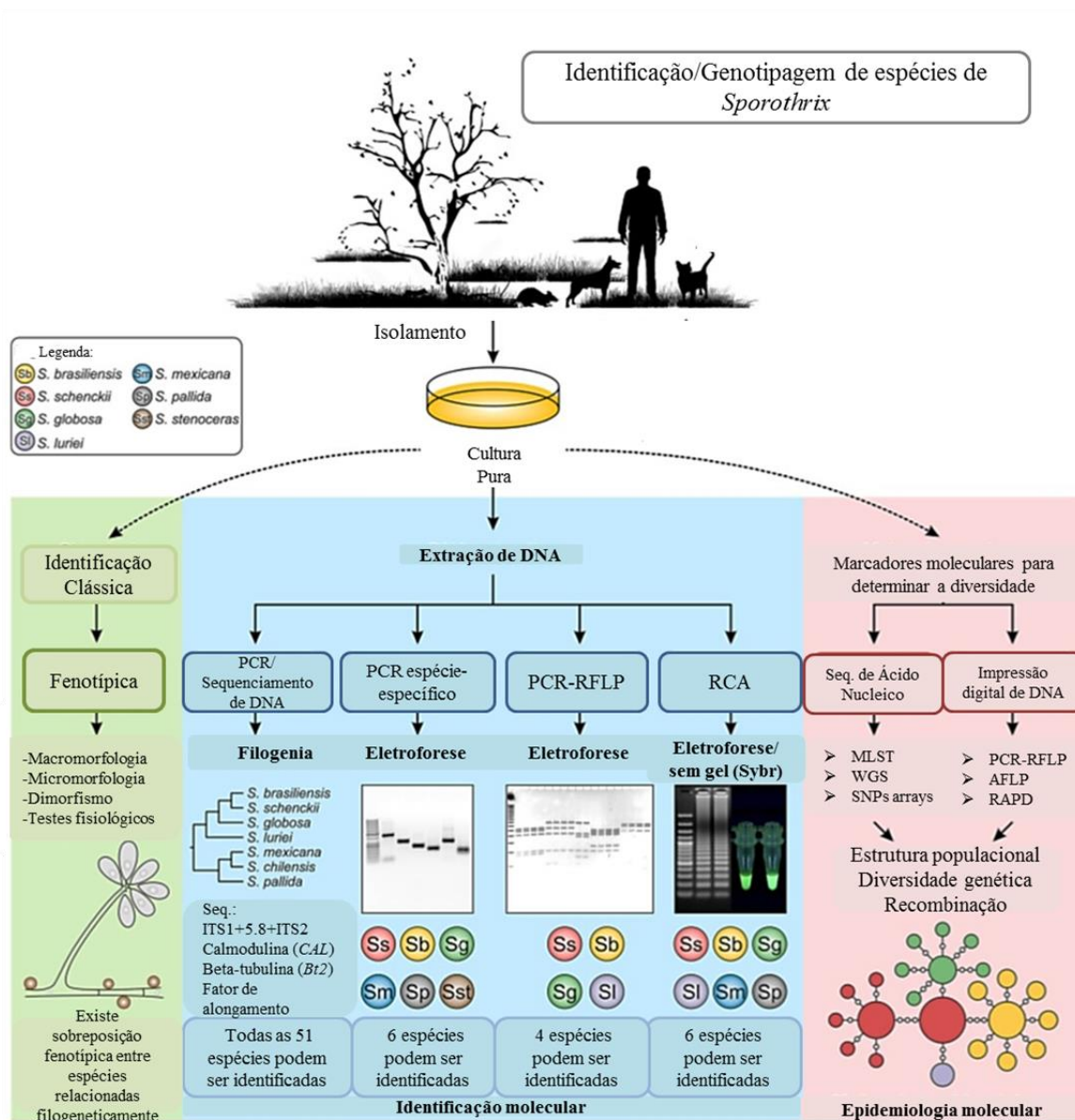


Figura 7 – Reconhecimento de espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix* usando métodos clássicos e moleculares. Legenda: PCR, reação em cadeia da polimerase; PCR-RFLP, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR; RCA, *rolling circle amplification*; MLST, digitação de sequência multilocus; WGS, sequenciamento de genoma inteiro; SNPs, polimorfismos de nucleotídeo único; AFLP, polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado; RAPD, DNA polimórfico amplificado randomicamente (Fonte: adaptado de LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, as técnicas de AFLP e polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) vêm sendo utilizadas para descrever diversidade genética associada à distribuição geográfica de isolados de *Sporothrix* spp., sendo, portanto, muito valiosas para os estudos moleculares (RANGEL-GAMBOA *et al.*, 2015). O AFLP é uma técnica de impressão digital do DNA que tem sido empregada em estudos evolutivos, genéticos populacionais, epidemiológicos e de conservação de vários táxons (RESTREPO *et al.*, 2018). A principal característica do AFLP é que

“Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo”.

ele permite a avaliação simultânea de diferentes regiões de DNA, distribuídas aleatoriamente por todo o genoma, sem o conhecimento prévio da sequência. Isso torna a utilização da técnica particularmente útil para estudar espécies que não possuem sequências genômicas completas disponíveis, cujo outros tipos de marcadores genômicos, como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são difíceis de obter (CABALLERO *et al.*, 2013). Essas características tornam a AFLP uma ferramenta poderosa, podendo ser utilizada para acessar a diversidade genética de *Sporothrix*, visando responder perguntas relacionadas à estrutura da população, rotas de transmissão, variabilidade intra e interespecífica, assim como, modos de recombinação e reprodução, entre muitas outras questões biológicas (LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2020).

1.4 Distribuição de *mating-types* das espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*

Os fungos apresentam uma ampla diversidade de modos reprodutivos, incluindo estratégias sexuais e assexuadas (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Reprodução sexual em fungos tem um alto impacto nos surtos infecciosos e padrões de distribuição das populações. A recombinação desempenha um papel crítico na diversificação e evolução de espécies patogênicas por gerar linhagens com melhor *fitness* em situações adversas (RODRIGUES *et al.*, 2014). Entretanto, o evento que está por trás da diversificação de *S. schenckii s. str.* e o mecanismo de emergência de *S. brasiliensis* são pouco conhecidos. O modo de reprodução assexuada, ou seja, estritamente clonal, pode ser vantajoso quando os genótipos são adaptados a hospedeiros e habitats específicos (TEIXEIRA *et al.*, 2015).

O termo *mating-type* (*MAT*) é usado para indicar uma regulação genética da especificidade e do desenvolvimento sexual de acasalamento em muitos fungos filamentosos e não filamentosos (KANO *et al.*, 2013). O processo de acasalamento e a reprodução sexual em Ascomycota são controlados pelos genes *MAT*, que é representado por dois idiomorfos: *MAT1-1* e *MAT1-2*. Em espécies heterotáticas há a presença exclusiva de um dos dois idiomorfos no genoma, necessitando o encontro de linhagens com *mating-types* opostos para que ocorra a reprodução

sexuada. No entanto, espécies homotáticas possuem ambos os idiomorfos em seu genoma, conferindo a esses indivíduos a capacidade de se reproduzir sem necessariamente precisarem de um parceiro compatível (KRONSTAD *et al.*, 1997; WILSON *et al.*, 2018).

As sequências dos genes nos idiomorfos do tipo acasalamento e a caracterização bioquímica inicial dos produtos gênicos sugerem que os idiomorfos são polipeptídios reguladores de genes (KRONSTAD *et al.*, 1997). O idiomorfo *MAT1-1* contém o gene *MAT1-1-1* que codifica a proteína α -box, enquanto em *MAT1-2* contém o gene *MAT1-2-1* que codifica uma segunda proteína que possui um grupo de alta motilidade (HMG), sendo este um domínio de ligação ao DNA (Figura 8). Tais proteínas codificadas são fatores de transcrição que regulam diferentes estágios do ciclo sexual (KANO *et al.*, 2013; CARVALHO *et al.*, 2021a). Embora os genes do domínio alfa e do domínio HMG sejam elementos essenciais para o *MAT*, a estrutura do *locus MAT* de cada espécie de fungo é única em termos de número e arranjo do gene e orientação transcrricional (LI *et al.*, 2010).

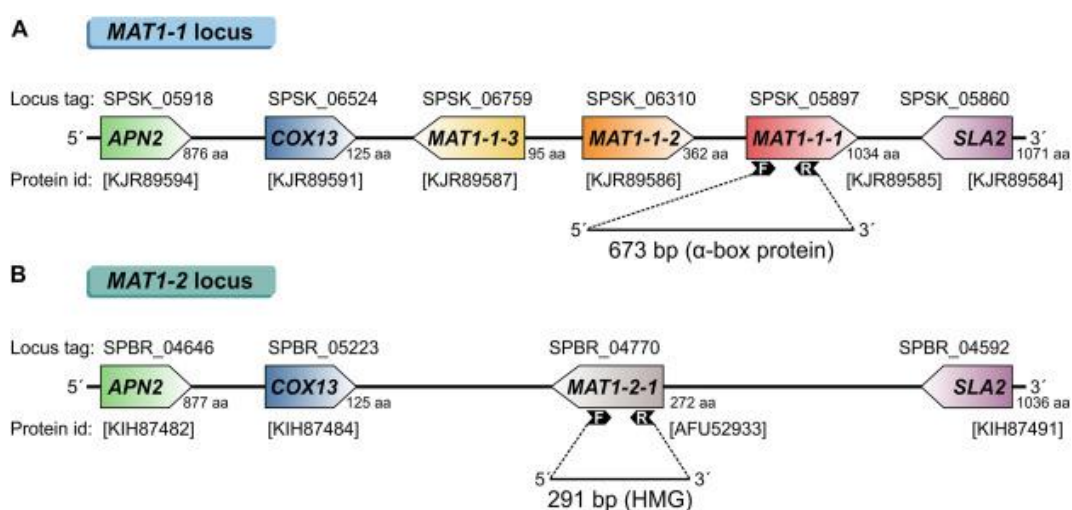


Figura 8 – Esquema do locus mating-type em espécies de *Sporothrix*. (A) Gene *MAT1-1-1* codifica a proteína α -box; (B) Gene *MAT 1-2-1* codifica proteína de domínio HMG (Fonte: Carvalho *et al.*, 2021a).

Estudos têm demonstrado que a virulência e patogenicidade dos fungos podem estar relacionadas ao *mating-type*. Monteiro e colaboradores (2018) evidenciaram predominância do idiomorfo *MAT1-1* relacionado à resistência aos azólicos em casos de aspergilose invasiva causada por *Aspergillus fumigatus*. Neste estudo, havia uma alta taxa de mortalidade (64%) referente ao *MAT1-1* quando

comparado ao *MAT1-2*. O mesmo ocorre em um estudo sobre a influência do *mating-type* na virulência de *Mucor irregularis*, fungo da ordem *Mucorales*, que segundo os autores foi observado que o *mating-type* *SexP* (+) parece ser mais virulento quando comparado ao *mating-type* *SexM* (-) (XU *et al.*, 2017).

Espécies do complexo *Sporothrix schenckii* têm sido consideradas assexuais devido à falta de evidência morfológica no desenvolvimento sexual. Entretanto, evidências genômicas indicam que *S. schenckii* s. str., *S. brasiliensis* e *S. globosa* são heterotáticas e elas podem reter a habilidade de reproduzir sexualmente, provavelmente da mesma forma que outros fungos da ordem *Ophiostomatales*. Uma compreensão filogeneticamente ampla do tipo de acasalamento é importante, dado o papel central da reprodução sexuada nos ciclos de vida dos fungos e a influência crítica do sexo na genética populacional e na evolução (KRONSTAD *et al.*, 1997; TURGEON *et al.*, 2000; KANO *et al.*, 2013).

1.5 Tratamento e perfil de susceptibilidade a antifúngicos

A escolha do fármaco para o tratamento da esporotricose é baseada na gravidade e localização das lesões, condição clínica do paciente, avaliação das interações medicamentosas, eventos adversos, envolvimento sistêmico e de acordo com as espécies de *Sporothrix* envolvidas (OROFINO-COSTA *et al.*, 2017). Itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B são os medicamentos atualmente disponíveis no Brasil para o tratamento da esporotricose. Os três primeiros são administrados por via oral, enquanto o último é administrado por via intravenosa, sendo o itraconazol o antifúngico de primeira escolha para tratar a doença (LEGABÃO *et al.*, 2022).

O itraconazol, farmacologicamente, inibe a enzima 14α -desmetilase que converte o lanosterol em ergosterol, o principal esterol na parede celular dos fungos (BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2015). A depleção de ergosterol compromete a estrutura e funções importantes da membrana, levando à morte do fungo (MAHAJAN, 2014). O iodeto de potássio pertence ao grupo químico dos iodetos inorgânicos e seu mecanismo de ação ainda não está muito bem elucidado (REIS, 2011). Alguns estudos sugerem que seu mecanismo interrompe a formação de granuloma, inibe a

quimiotaxia de neutrófilos e suprime a produção de intermediários reativos de oxigênio (MACEDO *et al.*, 2015). Essa opção terapêutica é uma alternativa em pacientes não responsivos ao itraconazol, além de ser um tratamento menos custoso financeiramente (REIS, 2011).

A terbinafina faz parte da classe das alilaminas e é um agente alternativo para o tratamento de esporotricose cutânea ou linfocutânea que não responde ao itraconazol ou quando este fármaco não é tolerado (VETTORATO *et al.*, 2018). Tem como mecanismo de ação bloquear a enzima esqualeno epoxidase responsável por converter esqualeno em lanosterol, impedindo a continuação da via de biossíntese do ergosterol, e, por isso, exerce seu efeito fungicida (MAHAJAN, 2014). Já a anfotericina B faz parte da classe dos poliênicos e tem por mecanismo de ação primário a alteração da permeabilidade celular da membrana fúngica por se ligar ao ergosterol desses microrganismos. Seu principal efeito colateral é a nefrotoxicidade, portanto, a avaliação renal do paciente durante o tratamento deve ser realizada. Desse modo, seu uso na esporotricose está restrito a infecções graves e sistêmicas que requerem tratamento mais agressivo (ROSA *et al.*, 2017).

O teste de sensibilidade aos antifúngicos *in vitro* é usado para determinar se o isolado fúngico é sensível a diferentes drogas antifúngicas, auxiliando no manejo terapêutico do paciente e, conseqüentemente, no sucesso do desfecho da doença (BATISTA-DUHARTE *et al.*, 2015). Ademais, os testes de sensibilidade auxiliam na vigilância epidemiológica da resistência, possibilitando identificar falhas terapêuticas futuras (WALLER *et al.*, 2021). A microdiluição em placa é um teste de fácil execução, permitindo ainda a análise de grande número de amostras, sendo considerado o método referência para traçar o perfil de sensibilidade dos agentes fúngicos. A fim de padronizar os testes de sensibilidade, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) elaboraram documentos para estabelecer critérios essenciais que devem ser seguidos na realização dos testes, como: definição do método e preparação do inóculo, composição e pH do meio a ser utilizado, temperatura e tempo de incubação. A principal divergência entre os protocolos estabelecidos pelas instituições consiste no inóculo fúngico, no qual o CLSI propõe um teste de microdiluição com um inóculo de $0,4 \times 10^4$ a 5×10^4 UFC/mL, enquanto o EUCAST propõe um teste com um inóculo maior de 1×10^5 a $2,5 \times 10^5$ UFC/mL, ademais

neste último, é utilizado RPMI-1640 suplementado com glicose a 2%. Com o intuito de criar um consenso entre o CLSI e EUCAST foi criado um subcomitê de antifúngicos pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST), contudo, ainda não há nenhuma atualização ou alteração para o gênero *Sporothrix* até o presente momento (CLSI, 2008; ARENDRUP *et al.*, 2015; BrCAST, 2020).

Dessa forma, para realização do teste, o CLSI desenvolveu o documento M38-A2 para ser aplicado na fase micelial do fungo, determinando, assim, a sensibilidade dos isolados aos fármacos. A determinação do perfil de sensibilidade é estabelecida através da concentração inibitória mínima (CIM), no qual avalia o crescimento fúngico frente a diferentes concentrações do antifúngico testado (CLSI, 2008).

Stopiglia *et al.* (2014) não observaram diferença estatisticamente significativa no perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro* ao avaliarem espécies de *Sporothrix* provenientes de quatro estados brasileiros. Porém, Marimon *et al.* (2008), avaliando cinco espécies isoladas em diferentes países, verificaram diferenças significativas quanto ao perfil de sensibilidade frente a diferentes antifúngicos. A terbinafina foi o medicamento mais ativo, seguida pelo cetoconazol. No entanto, este último medicamento foi menos ativo contra *S. mexicana* e *S. albicans* quando comparada a outras espécies do complexo. O posaconazol foi o terceiro medicamento antifúngico mais ativo testado e o mais ativo dos medicamentos para uso sistêmico. O itraconazol mostrou apenas boa atividade contra *S. brasiliensis*, enquanto, para as outras espécies testadas, o medicamento apresentou valores de CIMs elevados. Apesar desses resultados *in vitro*, o itraconazol têm mostrado eficácia no cenário clínico (ANTUNES *et al.*, 2009; BENTO *et al.*, 2021; GUIMARÃES E GUIMARÃES, 2021). Essa diferença de resultados obtidos pode ocorrer em virtude da origem geográfica dos isolados. Este dado reforça a importância de verificar o perfil de sensibilidade antifúngica dos patógenos isolados no estado do Espírito Santo. Ademais, como o itraconazol vem sendo utilizado no tratamento de animais e humanos em uma proporção muito elevada, é necessário monitorar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Sporothrix*, a fim de evitar o aparecimento de cepas resistentes a essa e as demais drogas.

A esporotricose tem afetado diretamente a população capixaba, tornando-se um problema de saúde pública desconhecido pela maior parte da comunidade. Esse fato impacta no abandono dos animais infectados, especialmente felinos, no qual é uma potencial fonte de transmissão desta doença. Nos três últimos anos, notamos uma expansão considerável da doença em todo estado, tanto em humanos quanto em animais, principalmente em áreas urbanas.

À vista disso, esse estudo nos permitirá acessar a diversidade genética de isolados humanos e animais, visando responder algumas perguntas como: (i) cenário atual da esporotricose humana e animal no Espírito Santo, (ii) rotas de transmissão da doença, (iii) diferenças intra e interespecíficas desses patógenos, (iv) tipo de reprodução e idiomorfo sexual predominante (v) origem dos isolados de *Sporothrix* no estado, (vi) diferença das espécies do gênero *Sporothrix* quanto à resposta aos antifúngicos *in vitro* e as variáveis dos quadros clínicos apresentados por pacientes. Desse modo, nosso intuito é compreender o ciclo de transmissão da esporotricose e suas demais peculiaridades, para que conseqüentemente haja um manejo clínico adequado e, posteriormente, estimular medidas efetivas de contenção da doença a serem tomadas a fim de evitar futuros surtos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como objetivo geral identificar as espécies de *Sporothrix* no estado do Espírito Santo aplicando a abordagem polifásica (características fenotípicas e moleculares), assim como avaliar a diversidade genética dos isolados e traçar o perfil de susceptibilidade *in vitro* frente aos principais fármacos do tratamento da esporotricose no Brasil.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente e genotipicamente os isolados recuperados de felinos e humanos incluídos neste estudo.
- Avaliar a estrutura da população através de genes correlacionados com a sexualidade destes patógenos (*MAT1-1* e *MAT1-2*).
- Verificar a distribuição geográfica e a ocorrência das espécies de *Sporothrix* nas regiões do estado incluídas no estudo.
- Avaliar os dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes incluídos no estudo.
- Analisar a diversidade genética dos isolados de *Sporothrix* incluídos no estudo, a fim de verificar rotas de transmissão, variabilidade intra e interespecífica entre isolados humanos e felinos.
- Correlacionar a diversidade intraespecífica dos isolados de *Sporothrix* com as formas clínicas dos pacientes envolvidos no estudo.
- Verificar o perfil de sensibilidade a antifúngico *in vitro* dos isolados de *Sporothrix* frente a itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B e verificar se há correlação com os perfis genéticos possivelmente gerados pela técnica de AFLP.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção, seleção e caracterização dos isolados incluídos no estudo

Foram incluídos neste estudo, isolados recuperados de amostras humanas e felinas com suspeita de esporotricose, demanda espontânea, provenientes de centros médicos e veterinários do estado do Espírito Santo, durante janeiro de 2016 a fevereiro de 2021. No acervo do Centro de Investigação em Micologia Médica (CIMM)/Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), foram armazenados um total de 262 isolados. Entre esses isolados, 142 pertenciam a pacientes com suspeita de esporotricose, atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP), no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM) que foram incluídos no estudo durante o desenvolvimento dele. Após esclarecimentos, esses pacientes foram convidados a participar da pesquisa. Depois da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), o Prof. Dr. Aloisio Falqueto coletou as amostras a partir de lesões sugestivas de esporotricose.

Foram utilizadas 120 amostras de felinos, coletadas no domicílio do tutor ou na sala de procedimento do Centro de Controle de Zoonoses do município de residência do mesmo (Vitória e Grande Vitória) durante o estudo de Redigueri e colaboradores (2022).

Para isolamento, as amostras foram coletadas com um swab estéril, objeto sem superfície de corte, não invasivo. Essas amostras foram encaminhadas para o CIMM e, em seguida, os swabs foram semeados em tubos com Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) (Difco™ BD/Sparks, MD, EUA) inclinados e incubados a 25°C. Após crescimento do fungo, os isolados foram previamente triados por métodos morfológicos em SDA. Isolados sugestivos de *Sporothrix* foram armazenados e mantidos em água com cloranfenicol 0,05% a temperatura ambiente (Castellani, 1939), para posteriores experimentos. Quando positivo para *Sporothrix*, o diagnóstico laboratorial era informado ao ambulatório da DIP/HUCAM.

Para a seleção dos casos, foram adotados os seguintes critérios: i) inclusão – pacientes/animais com lesões cutâneas/subcutâneas ativas, apresentando sinais e sintomas suspeitos de esporotricose; ii) exclusão – pacientes/animais que estavam em tratamento antifúngico no momento.

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética de animais (CEUA – 14/2020 - ANEXO I) e humanos (CEP – 4.032.820 - ANEXO II).

3.2 Análise de dados clínicos, epidemiológicos e terapêuticos

Dados demográficos dos pacientes, classificação do quadro clínico, provável fonte de infecção e o histórico de doenças crônicas deles também, foram coletados. Além disso, o tempo entre os primeiros sintomas até o diagnóstico de esporotricose, bem como, a escolha do tratamento antes do diagnóstico e após o diagnóstico também foram fatores relevantes investigados.

3.3 Verificação da viabilidade e pureza dos isolados previamente aos experimentos

Previamente aos experimentos, os isolados foram submetidos à verificação de sua pureza e viabilidade a fim de trabalhar com isolados sem contaminantes. À vista disso, os isolados foram reativados em SDA a partir do armazenamento em água com cloranfenicol. Posteriormente ao crescimento, os mesmos foram submetidos a repiques consecutivos e mantidos à temperatura de 25°C em meio SDA contendo cloranfenicol 0,05%, por 5 a 10 dias, a fim de que os testes fossem realizados com culturas novas (CASTELLANI, 1939).

3.4 Identificação dos isolados de *Sporothrix* aplicando o conceito polifásico de espécie

A identificação do microrganismo utilizando abordagem polifásica foi realizada agregando várias ferramentas que visavam determinar acuradamente a identificação da espécie, entre elas ferramentas fenotípicas e moleculares.

3.4.1 Identificação fenotípica dos isolados

A identificação fenotípica dos isolados de *Sporothrix* foi realizada levando em consideração as características macromorfológicas da colônia (coloração,

topografia, textura, diâmetro e presença de melanina) e micromorfológicas (presença de hifas, conidióforos, disposição e formato de conídios) (MARIMON *et al.*, 2007). Para isso, cada isolado foi semeado, com o auxílio de uma alça de platina em L, em três pontos equidistantes da placa de Petri (90 X 15 mm), contendo Ágar Dextrose Batata (200 g de batata, 15 g de dextrose, 15 g de ágar puro e 1 litro de água destilada-PDA) e incubados a 25°C durante 7 a 14 dias. Após o período de incubação, as culturas foram analisadas de forma descritiva (MARIMON *et al.*, 2007).

Em relação a micromorfologia, cada isolado foi semeado, com o auxílio de uma alça de platina em L, nas extremidades de blocos (1,0 X 1,0 cm) de PDA em placas de Petri (90 X 15 mm). Cada bloco foi coberto com uma lamínula esterilizada e, em seguida, as placas foram incubadas a 25°C durante 7 a 14 dias. Decorrido o período de incubação, após o crescimento, uma lâmina de cada cultivo foi montada adicionando uma gota de lactofenol com azul de algodão na lâmina e, em seguida, cobrindo-a com a lamínula incubada. Cada lâmina foi observada em microscópio de luz (Leica® DM500), com objetiva de 40 X, onde foram analisadas as características das estruturas do micélio reprodutivo (MARIMON *et al.*, 2007).

3.5 Identificação molecular dos isolados incluídos no estudo

Os isolados armazenados no CIMM-UFES foram reativados a 25°C, em placas de Petri contendo SDA, para posteriores ensaios de biologia molecular. Vale ressaltar que toda a parte envolvendo a biologia molecular foi realizada no Laboratório de Patógenos Fúngicos Emergentes (LAPEM), da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), contando com a colaboração do Prof. Dr. Anderson Messias Rodrigues.

3.5.1 Extração de DNA genômico dos isolados

Essa metodologia foi realizada de acordo com o protocolo adaptado descrito por Rodrigues *et al.* (2015a). A extração de DNA genômico foi realizada a partir de uma cultura monospórica, onde as células fúngicas de *Sporothrix* foram recuperadas após 14 dias de crescimento, cultivadas em meio PDA a 25°C. O DNA total foi

extraído com o *kit FastDNA* (MP Biomedicals, Vista, CA, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. A lise da parede celular ocorreu tanto por métodos químicos, como físicos, seguido pela etapa de purificação do DNA. Sendo assim, um fragmento da colônia foi transferido para um tubo de eppendorf do *Kit FastDNA* (contendo uma esfera de porcelana), e adicionado 1000 µL de uma solução detergente (**CLS-Y**). Em seguida, as células miceliais foram homogeneizadas três vezes através do aparelho Precellys 24 (Bertin, Montigny le Bretonneux, França) a 6.000 rotações por minuto (rpm). O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo acrescido de 700 µL de uma solução matriz (**Binding matriz**), seguido de uma centrifugação por 5 minutos em 14.500 rpm. Posteriormente, o sobrenadante formado na centrifugação foi descartado e o *pellet* formado foi ressuspensionado e purificado com 500 µL de uma solução de lavagem a base de etanol (**SEWS-M**), a fim de remover os sais restantes. Novamente, o tubo foi centrifugado (5 minutos a 14.500 rpm) e o sobrenadante descartado. Em seguida, o *pellet* de DNA passou por um processo de secagem no aparelho SpeedVac® (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA), por 30 minutos a 30° C. Posteriormente, o DNA foi ressuspensionado em 170 µL de água ultrapura (Milli-Q) e foi incubado a 56° C por 3 minutos. Logo após, o DNA foi submetido a três centrifugações de 8 minutos a 14.500 rpm, dessa vez descartando o *pellet* e resgatando/transferindo o sobrenadante para novos tubos. O sobrenadante correspondente ao DNA total [100 µL] foi transferido para um novo tubo e as concentrações de DNA foram estimadas em um espectrofotômetro de massa NanoDrop® 2000 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Além disso, avaliamos a pureza do DNA que deveria estar entre 1,8 a 2,0. O DNA extraído foi armazenado a - 20° C até o momento do uso.

3.5.2 PCR espécie-específico a partir de iniciadores que codificam fragmentos do gene da calmodulina

Para PCR, dois conjuntos de iniciadores (senso e anti-senso) foram utilizados, sendo um específico para a espécie de *Sporothrix brasiliensis* (SbraF e SbraR – 469 pb) e outro para *Sporothrix schenckii* s. str. (SschF e SschR – 331 bp), pois são as espécies mais prevalentes na região Sudeste do Brasil. Como controle da PCR fúngica, foi utilizada um par de iniciadores da região ITS do DNA ribossomal **ITS1**

(5'-TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG) e **ITS4** (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC). Além disso, como controles para identificação das espécies, foram utilizadas cepas referência (*S. brasiliensis* – **Ss54** e *S. schenckii* – **Ss126**) e o controle negativo (ausência de DNA). Sendo assim, um Mix Duplex PCR foi preparado tendo como volume final 25 µL da reação, conforme descrito: 12,5 µL de tampão Master Mix (2 X), que consiste em 3 mM MgCl₂, 400 mM cada dNTP, e 50 U/mL de Taq Polimerase (Promega Corporation, Madison, WI, USA); 8,5 µL de água ultrapura; 1 µL de cada iniciador senso e anti-senso da espécie em questão; 0,5 µL de cada iniciador senso e anti-senso da região ITS e 1 µL de DNA alvo [100 ng/µL]. As reações de PCR foram incubadas em um termociclador com um passo inicial de 94°C por 4 minutos e, então, amplificadas por 35 ciclos utilizando o seguinte programa: i) fase de desnaturação em 1 minuto a 94°C; ii) fase de anelamento iniciando a 70°C por 1 minuto, diminuindo 1°C em média a cada dois ciclos até chegar a 60°C, na qual mantinha a essa temperatura pelos 15 ciclos restantes; iii) a fase de polimerização do DNA, ocorreu em 1 minuto a 72°C. Por fim, o final da extensão do DNA ocorreu por 10 minutos a 72°C. A reação durou em média 3 horas. Para posterior visualização dos *amplicons* resultantes, foi preparado um Mix (6 µL de água ultrapura; 2 µL tampão padrão; 4 µL do produto da PCR) para ser utilizado na eletroforese. Um gel de agarose 1,2% (1,8g de agarose; 150 mL de Tampão TBE 1x Tris/Borato/EDTA), foi preparado para realização da eletroforese. A solução resultante foi vertida em uma cuba de eletroforese, aguardando posterior solidificação. Em seguida, foram aplicados 3 µL do marcador de peso molecular de 3000 pares de base (pb) (Fermentas, USA), a fim de mensurar as bandas e comparar com controle positivo. As reações foram distribuídas nos demais poços, sendo aplicados 10 µL do mix preparado anteriormente. Em seguida, realizou-se a eletroforese durante 70 minutos a 100 Volts na presença de um corante de ácido nucléico intercalante – GelRed (Biotium, Hayward, CA, EUA). os *amplicons* foram visualizados em um sistema de fotodocumentação composto de um aparelho transiluminador UV acoplado a uma câmera fotográfica digital L-Pix (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) (RODRIGUES *et al.*, 2015a).

3.6 Detecção do tipo de acasalamento de isolados de *Sporothrix* por PCR *mating-type* duplex

Para PCR *mating-type duplex* foi utilizado um conjunto de iniciadores sendo um direcionado ao idiomorfo *MAT1-1* (673 pb) e o outro direcionado ao idiomorfo *MAT1-2* (291 pb). Além disso, como controles da reação, foi avaliada a cepa referência para cada gene correspondente envolvido (*MAT1-1*: **Ss05** e *MAT1-2*: **Ss37**) e o controle negativo (ausência de DNA). Para este fim, foi preparada uma reação com volume final de 25 µL conduzida da seguinte forma: 12,5 µL de PCR buffer; 9,6 µL de água ultrapura; 1,0 µL do DNA alvo; 0,6 µL de cada iniciador senso e anti-senso direcionado ao idiomorfo sexual *MAT1-1*; 0,6 µL de cada iniciador senso e anti-senso direcionado ao idiomorfo sexual *MAT1-2*. A reação foi colocada em um termociclador e o início da reação ocorreu por 4 minutos a 94°C. As três etapas seguintes ocorreram em 35 ciclos, iniciando pela a fase de desnaturação (1 minuto a 94°C), seguida da fase de anelamento (1 minuto a 62°C), polimerização do DNA (1 minuto a 72°C) e extensão final por 10 minutos a 72°C. A reação durou em média 2 horas. Assim, para posterior visualização dos *amplicons* resultantes foi preparado um Mix (6 µL de água ultrapura; 2 µL tampão padrão; 4 µL de produto da PCR) que foi utilizado na eletroforese. Assim como na PCR espécie-específico, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1,2%, durante 70 minutos a 100 Volts na presença de *GelRed*. A detecção das bandas amplificadas, correspondentes ao idiomorfo sexual de cada isolado, foi realizada no transiluminador seguida de fotodocumentação em uma câmera fotográfica digital L-Pix (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil) (CARVALHO *et al.*, 2021a).

3.7 Genotipagem por polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) dos isolados de *Sporothrix*

Essa metodologia foi realizada baseada em protocolos anteriormente descritos por Vos *et al.* (1995) e adaptados por Carvalho *et al.* (2020). A técnica demonstrou ser reprodutível e de grande importância para estudos de diversidade genética.

3.7.1 Purificação do DNA para a análise por AFLP

Antecedendo a técnica de AFLP, foi realizada uma etapa extra de purificação do DNA pelo *kit Wizard® SV Gel* (Promega, USA), seguindo as instruções do fabricante, a fim de igualar a pureza do DNA, anteriormente extraído, entre 1,8 e 2,0. Primeiramente, foi adicionada uma solução matriz 1:1 (*Binding Solution*) no *ependorf* contendo o DNA a ser purificado. Em seguida, foi acoplado ao *ependorf* o filtro do kit e foi adicionado 600 µL de solução de lavagem (*Wash Solution*), seguido por uma centrifugação a 14.500 rpm por 2 minutos. O sobrenadante resultante foi descartado e o processo anterior foi repetido. A fim de retirar qualquer indício da solução de lavagem, o tubo foi novamente centrifugado por 1,5 minutos a 14.500 rpm sem adição de qualquer solução. O filtro foi transferido para um novo *ependorf* acrescido de 95 µL de água ultrapura, no qual ficou sob repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. Por conseguinte, foi realizada uma última etapa de centrifugação por 2 minutos a 14.500 rpm. Logo após, o filtro foi descartado e o DNA do *ependorf* resgatado. A concentração e pureza do DNA foram estimados no NanoDrop® 2000 e foi armazenado a - 20° C até o momento do uso.

3.7.2 Condições da técnica de AFLP

Para a realização dessa metodologia, foram necessárias 4 etapas distintas: i) restrição/ligação; ii) PCR pré-seletiva; iii) PCR seletiva; iv) eletroforese capilar. Na etapa de restrição/ligação, 200 ng/mL DNA genômico foi digerido com duas enzimas de restrição EcoRI e MseI, sendo simultaneamente ligados aos adaptadores nas extremidades coesivas dos fragmentos gerados pelas enzimas. Para isso, um mix foi preparado tendo como volume final 20 µL da reação, conduzido da seguinte forma: 7,22 µL de água ultrapura, 2,0 µL *Cut-Smart Buffer*, 0,25 µL de cada enzima EcoRI e MseI, 2,0 µL de ligase *buffer*, 1,0 µL do adaptador EcoRI (5 pmol/µL), 1,0 µL do adaptador MseI (10 pmol/µL), 0,33 µL T4 ligase (3U/µL), 1,0 µL RNase (0,1 mg/mL) e 5,0 µL do DNA alvo [50 ng]. As reações de PCR foram incubadas em um termociclador sob condições anteriormente descritas, e após o término da ciclagem, foram adicionados 80 µL de Tris-HCl 10 mM ajustando o pH para 8,0.

Na etapa pré-seletiva, foram utilizados os iniciadores moleculares EcoRI (5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3') e MseI (5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'). Preparou-se um novo mix, tendo como volume final 25,0 µL da reação, no qual foi

conduzido da seguinte forma: 17,55 μL de água ultrapura, 2,5 μL de *Taq-buffer* 10x, 0,50 μL dos dNTP's (10 mM), 0,20 μL da Taq-Polimerase (5 U/ μL), 0,63 μL de cada iniciador de EcoRI (5 pmol/ μL) e MseI (5 pmol/ μL) e, por fim, 3,0 μL do produto de DNA da primeira etapa de restrição/ligação. As reações de PCR foram incubadas em um termociclador e, após o término da ciclagem, foram adicionados 25 μL de água ultrapura. Na etapa seletiva, foram utilizados os mesmos iniciadores moleculares da PCR pré-seletiva com o acréscimo do fluoróforo FAM na extremidade 5' do iniciador molecular EcoRI e de dois nucleotídeos na extremidade 3' de cada iniciador molecular. A combinação de nucleotídeos utilizada foi a #5 (EcoRI-FAM-GA/MseI-AG), previamente descrita por Carvalho *et al.* (2020). Um novo mix foi preparado, tendo como volume final 24 μL da reação, no qual foi conduzido da seguinte forma: 15,80 μL de água ultrapura, 2,5 de *Taq-Buffer* 10x, 0,5 μL dos dNTP's (10 mM), 2,50 EcoRI-NN FAM (10 pmol/ μL), 2,50 MseI-NN (10 pmol/ μL), 0,20 μL da Taq-Polimerase (5 U/ μL) e 1,50 μL do produto de DNA da primeira etapa pré-seletiva. As reações de PCR foram incubadas em um termociclador e, após o término da ciclagem, 5 μL de cada produto do DNA da etapa seletiva foram diluídos em 45 μL de água ultrapura.

Na última etapa de eletroforese capilar, os fragmentos de AFLP foram detectados por capilaridade em um sequenciador (*Applied Biosystems* - Foster City, CA, USA), através do feixe de luz emitido pela fluorescência presente. Diferentes picos foram gerados referentes aos *amplicons* resultantes da reação. Para isso, um novo mix foi preparado e distribuído em uma placa de 96 poços, tendo como volume final uma reação de 24 μL , no qual foi conduzido da seguinte forma: 8,925 μL de Formamida HI-DI - Tampão para estabilizar a reação, 0,075 μL LIZ 600 - Padrão para determinar o tamanho dos fragmentos e 1,50 μL do produto de DNA diluído da etapa seletiva. Primeiramente, a reação foi submetida a uma etapa de resfriamento, na qual foi centrifugada por 1 minuto a 4°C em 1500 rpm. Por conseguinte, a reação foi aquecida no termociclador em uma etapa de desnaturação por 3 minutos a 95°C, seguido por 2 minutos de resfriamento a 4°C. Após o término da ciclagem, o processo de centrifugação foi repetido conforme descrito acima. A reação foi centrifugada e a placa foi introduzida ao sequenciador (Seq Studio Genetic Analyser - Thermo Fisher) para realização da última etapa da técnica. O ensaio molecular foi realizado em duplicata a fim de garantir reprodutibilidade da ferramenta.

3.7.3 Análise dos dados brutos obtidos através do AFLP

A partir dos produtos gerados pelo AFLP, as análises dos resultados foram realizadas utilizando o software Bionumerics v7.6 (Applied Maths, St. Martens-Latem, Bélgica), considerando apenas fragmentos com tamanho entre 50 e 500 pb. Os fragmentos foram convertidos em uma matriz de dados binários considerando presença (1) ou ausência (0) de fragmentos.

Com o intuito de verificar a similaridade entre os isolados por meio da técnica de AFLP, foram construídos dendrogramas utilizando o método de *Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages* (UPGMA, *Jaccard Distance*). A qualidade dos ramos do dendrograma foi representada pelas cores mediante a correlação dos valores cofenéticos, que nada mais é que a correlação da similaridade derivada do dendrograma e a similaridade da matriz, sendo um parâmetro para expressar a consistência de um *cluster*. Realizamos a análise de componentes principais (PCA) e o escalonamento multidimensional (MDS) das espécies como métodos alternativos de agrupamento, produzindo gráficos tridimensionais (3D), nos quais as entradas foram distribuídas de acordo com sua relação. Enquanto o PCA utiliza o coeficiente de correlação de similaridade para parear os dados referentes aos isolados, o MDS utiliza coeficiente de distância ou dissimilaridade para agrupamento dos mesmos. Além disso, foi empregado o *Self-Organizing Map* (SOM), uma rede neural de aprendizado artificial para organizar de forma bidimensional (mapa), de acordo com sua semelhança (CARVALHO *et al.*, 2020; CARVALHO *et al.*, 2021b).

3.8 Avaliação do perfil de sensibilidade antifúngica *in vitro*

A sensibilidade antifúngica dos isolados de *Sporothrix* spp. foi determinada *in vitro* frente aos fármacos: itraconazol (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), posaconazol (Schering-Plough Incorporated, Kenilworth, EUA), terbinafina (Sigma-aldrich) e anfotericina B (Sigma Chemical Corporation, St. Louis, EUA) por meio do método de microdiluição em caldo padronizado pelo documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Além dos isolados selecionados para este estudo, a cepa controle *Aspergillus flavus* ATCC 204304 foi incluída em cada lote de

ensaios para a verificação da perfeita diluição dos antifúngicos testados (CLSI, 2008; ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2017).

3.8.1 Preparação do meio de cultivo para o teste de sensibilidade aos antifúngicos *in vitro*

Para o teste de microdiluição em caldo foi utilizado o meio de cultivo líquido RPMI-1640 (Angus Buffers e Biochemicals, Niagara Falls, NY, EUA) com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio em sachê, MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) (Sigma, Aldrich) e uma solução tampão de hidróxido de sódio 10 M (NaOH), previamente preparada (4g NaOH; 100 mL água destilada), para ajuste do pH. Sendo assim, foram adicionados 10,40 g RPMI e 34,53 g MOPS, verificando e ajustando posteriormente o pH até 7,0, com o auxílio do pHmetro (Quimis, SP, Brasil). Por fim, o meio de cultura foi esterilizado por filtração utilizando o sistema de filtragem acoplado a bomba de vácuo, com filtro biológico de 0,22 micra (Corning Incorporated Costar, Corning, NY, EUA), e armazenado a 4°C até o momento do uso.

3.8.2 Diluição dos antifúngicos selecionados

Inicialmente, os antifúngicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (AudazBrasil, Lote 1304936) com uma concentração final de 1600 µg/mL. Posteriormente, cada antifúngico foi diluído novamente em uma proporção de 1:5 em RPMI-1640 em dez diferentes concentrações seriadas. Alíquotas de 100 µg/mL destas concentrações foram dispensadas nas placas de microtitulação (Corning Inc. Costar), com o auxílio de uma pipeta multicanal (Digital Multichannel Pipette, Labsystem, Helsinki, Finland). Concentrações progressivas de drogas foram dispensadas sequencialmente nos poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez, sendo a diluição para todos os antifúngicos realizada da seguinte forma: 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,06 µg/mL e 0,03 µg/mL. Os poços pertencentes à coluna identificada com o número 12 foram utilizados como controle positivo de crescimento, sendo dispensados apenas 100 µg/mL do diluente do antifúngico, meio de cultura e

inóculo. Os poços da coluna 1 foram os controles de esterilidade, contendo apenas 200 µg/mL do meio RPMI-1640. As placas foram mantidas a -20° C até o momento do uso.

3.8.3 Preparação do inóculo fúngico e inoculação em meio RPMI-1640

Os isolados de *Sporothrix* foram repicados em meio de cultura inclinado de PDA em tubo e, posteriormente, incubados a 25°C por 14 dias. Após crescimento da colônia fúngica, foi adicionado ao tubo 2 mL de solução salina estéril acrescido de Tween 80 a 0,85%. A suspensão fúngica foi transferida para um tubo de ensaio de vidro para estimar a densidade em um espectrofotômetro com absorvância de 530 nm e ajustar a transmitância em 80 a 82%. Alíquotas de 100 µL da solução do inóculo padrão (5×10^4 UFC/mL) foram dispensadas nos poços contendo 100 µL das diferentes concentrações dos antifúngicos testados. Por fim, as placas foram incubadas na estufa a 35°C e a leitura do teste foi realizada após 48 horas de incubação.

3.8.4 Leitura dos testes de susceptibilidade *in vitro* e análise de dados

Para analisar os resultados obtidos, foi determinado o valor de CIM avaliado visualmente, com o auxílio de um espelho invertido, a partir da comparação do crescimento fúngico do controle positivo. O valor de CIM foi definido como a menor concentração de antifúngico que inibiu o crescimento de células fúngicas. Em relação à distribuição dos valores de CIM para os antifúngicos, os dados foram analisados da seguinte forma:

1°) Variação dos valores de CIM para diferentes espécies e antifúngicos, representando os limites inferior e superior.

2°) Análise da distribuição de valores de CIMs para as diferentes espécies e antifúngicos: Para os azólicos (itraconazol e posaconazol) e anfotericina B, o valor de CIM foi definido como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 100% do crescimento fúngico. Já para a terbinafina, o valor de CIM foi definido como a menor concentração de antifúngico capaz de inibir 80% do crescimento fúngico.

3º) CIM₅₀, definida como o valor da concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir 50% dos isolados testados.

4º) CIM₉₀, definida como o valor da concentração inibitória mínima de antifúngico capaz de inibir 90% dos isolados testados.

4. RESULTADOS

De março de 2020 a fevereiro de 2021, foram enviados ao CIMM/UFES 62 isolados em cultura, suspeitos de *Sporothrix*, provenientes de 62 pacientes atendidos no HUCAM. Desses, 53 (85,5%) foram positivos para esporotricose e, incluídos neste estudo, juntamente aos demais isolados armazenados no banco de fungos filamentosos do CIMM/UFES, totalizando 142 isolados de *Sporothrix* provenientes de amostras humanas entre os anos de 2016 e 2021. Além disso, 120 isolados recuperados de felinos com esporotricose comprovada também foram incluídos neste trabalho, perfazendo um total de 262 amostras isoladas.

Conforme observado na Figura 9, após o crescimento durante 14 dias de incubação a 25°C, as colônias de *Sporothrix* em PDA variaram em seus aspectos morfológicos, onde na macromorfologia observamos uma pigmentação desde um bege claro no início do crescimento, podendo escurecer ao decorrer da incubação, até uma tonalidade marrom ou preta em 1-2 semanas. No entanto, algumas colônias permaneciam beges e, em um caso, não observamos a presença de melanina durante todo o período de incubação do isolado, sendo considerado, portanto, albino (Figura 9E-I). As colônias apresentaram uma textura com superfície ligeiramente enrugada, com micélio aéreo rasteiro, variando em diâmetro, nas quais mediram desde 19,0 mm² a 41,0 mm² aos 14 dias.

Na micromorfologia em PDA a 25°C, foi possível observar hifas hialinas delgadas, septadas e ramificadas; conídios hialinos pequenos (2-3 X 3-6 µm) com características distintas entre os isolados. A disposição dos conídios variou, podendo apresentar-se de forma simpodial, surgindo em pequenos grupos de denticulos em uma pequena dilatação apical do conidióforo, resultando em uma aparência de “margarida” ou dispostos como conídios sésseis aderidos diretamente às hifas.

Entre os isolados sugestivos de *S. schenckii*, predominaram os conídios mais alongados (Figura 9A-II, 8C-II), entretanto alguns isolados apresentaram conídios pigmentados triangulares (Figura 9B-II), característico da espécie. Já os isolados de *S. brasiliensis*, os conídios observados apresentaram variação quanto à presença ou ausência melanina, sendo predominantemente mais globosos (Figura 9 D, E, F-II). Algumas características micromorfológicas são bastante sutis e sua variação pode levar a erros na identificação da espécie. Portanto, analisando apenas caracteres morfológicos, não foi possível definir acuradamente a espécie.

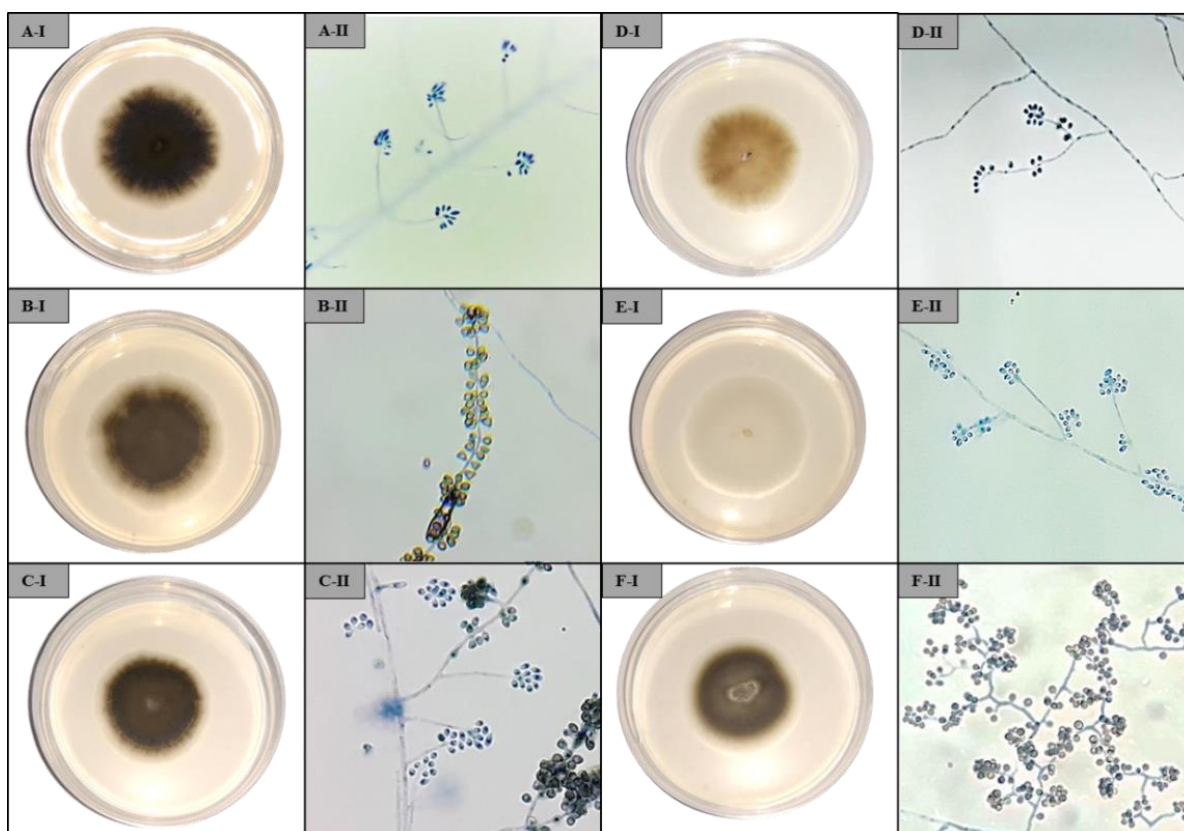


Figura 9 – Macro e Micromorfologia das espécies de *Sporothrix* cultivadas em PDA a 25°C por 14 dias. A-I-AII) *S. schenckii* s. str. – Conídios hialinos; B-I-BII) *S. schenckii* s. str. – Conídios triangulares e melanizados; C-I-CII) *S. schenckii* s. str. – conídios triangulares e melanizados; D-I-DII) *S. brasiliensis* – conídios hialinos; E-I-EII) *S. brasiliensis* – conídios hialinos e globosos; F-I-FII) *S. brasiliensis* – conídios melanizados e globosos.

A fim de identificar os patógenos em nível de espécie, os isolados incluídos no estudo foram avaliados por meio de PCR espécie-específica. Dessa forma, associando os parâmetros morfológicos aos moleculares, todos os 142 isolados de humanos e os 120 isolados de felinos foram identificados. Dos isolados provenientes

de amostras humanas, 125 isolados (88%) foram identificados como *S. brasiliensis* e 17 isolados como *S. schenckii sensu stricto* (12%). Por outro lado, todos os isolados provenientes de gatos (n=120, 100%) foram identificados exclusivamente como *S. brasiliensis*, demonstrando, até o momento, ser o único agente responsável pela esporotricose felina no território capixaba (Figura 10).

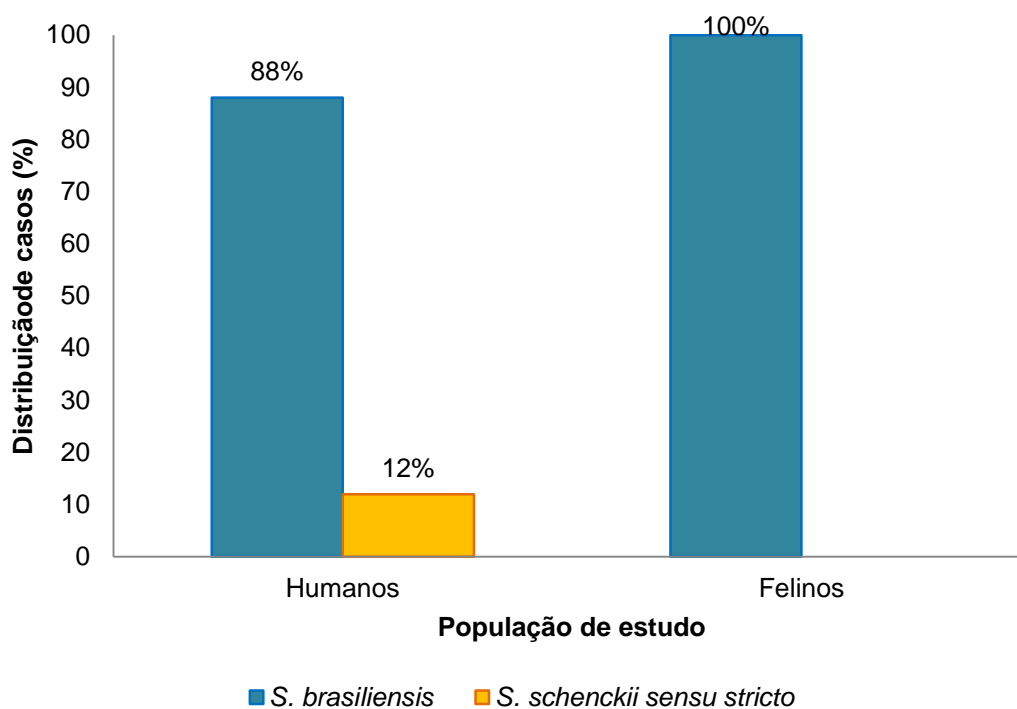


Figura 10 – Distribuição das espécies de *Sporothrix* provenientes de humanos (n=142) e felinos (n=120) no estado do Espírito Santo identificados por PCR espécie-específica.

Com o intuito de avaliar a estrutura populacional e a distribuição das espécies de *Sporothrix*, selecionamos todos os isolados de felinos (n=120) e os isolados de humanos (n=142), previamente identificados, e determinamos a presença de idiomorfos sexuais por meio da análise do gene *MAT*. Para isso, foi realizada PCR *mating-type* com iniciadores direcionados aos loci *MAT1-1* e *MAT1-2* (Figura 11). Além disso, dados relacionados à origem geográfica dos casos de esporotricose foram coletados. A partir dos resultados gerados, foi possível observar a presença dos dois idiomorfos sexuais (*MAT1-1* e *MAT1-2*) em ambas às espécies, e, apenas um desses idiomorfos em cada isolado testado, sugerindo que as espécies são heterotáticas.

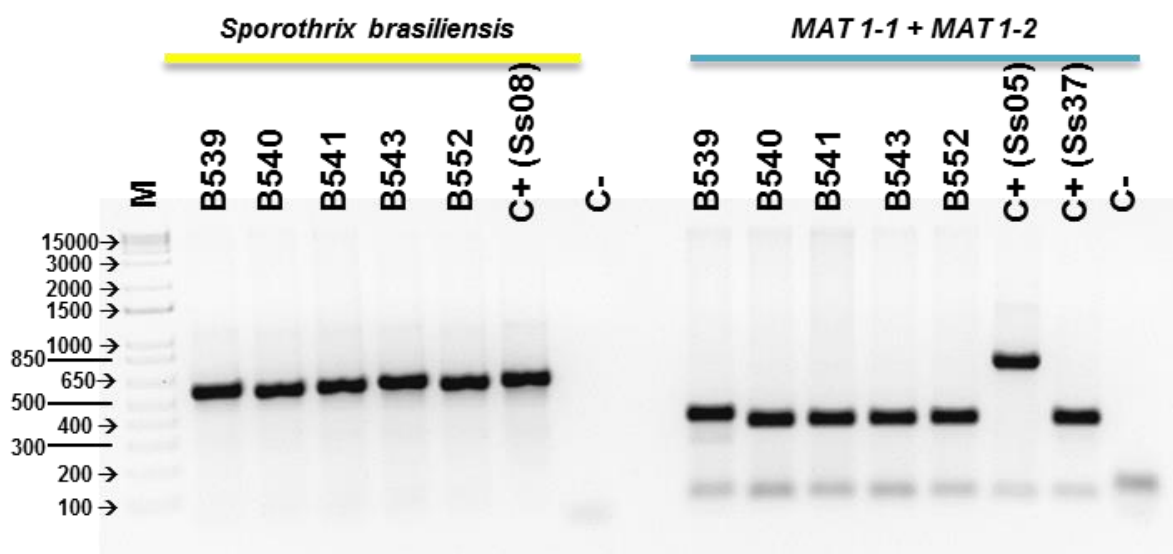


Figura 11 – Gel de agarose exibindo padrões genotípicos de isolados de *Sporothrix* com DNA amplificado pela técnica de PCR espécie-específica para identificação de espécies e presença do idiomorfo sexual pela PCR *mating-type*. Legenda – M: Marcador de peso molecular; + Ss08: Controle Positivo *Sporothrix brasiliensis*; C+ Ss05: Controle Positivo *MAT1-1*; C+ Ss37: Controle Positivo *MAT1-2*; C-: Controle Negativo.

Em relação aos isolados de felinos, foi observado que 119 deles amplificaram para o *MAT1-2* (99,2%), enquanto apenas uma amostra amplificou para *MAT1-1* (0,8%). Já as amostras provenientes de humanos, observamos que na espécie *S. brasiliensis* (n=125), 10 isolados (8%) apresentaram o idiomorfo sexual *MAT1-1* e 115 cepas (92%) amplificaram para *MAT1-2*. Em relação aos isolados identificados como *S. schenckii sensu stricto* (n=17), observamos a predominância do idiomorfo *MAT1-2* (n=12/70,6%), entretanto o *MAT1-1* se mostra mais presente nessa espécie quando comparado a *S. brasiliensis* (n=5/29,4%) (Figura 12).

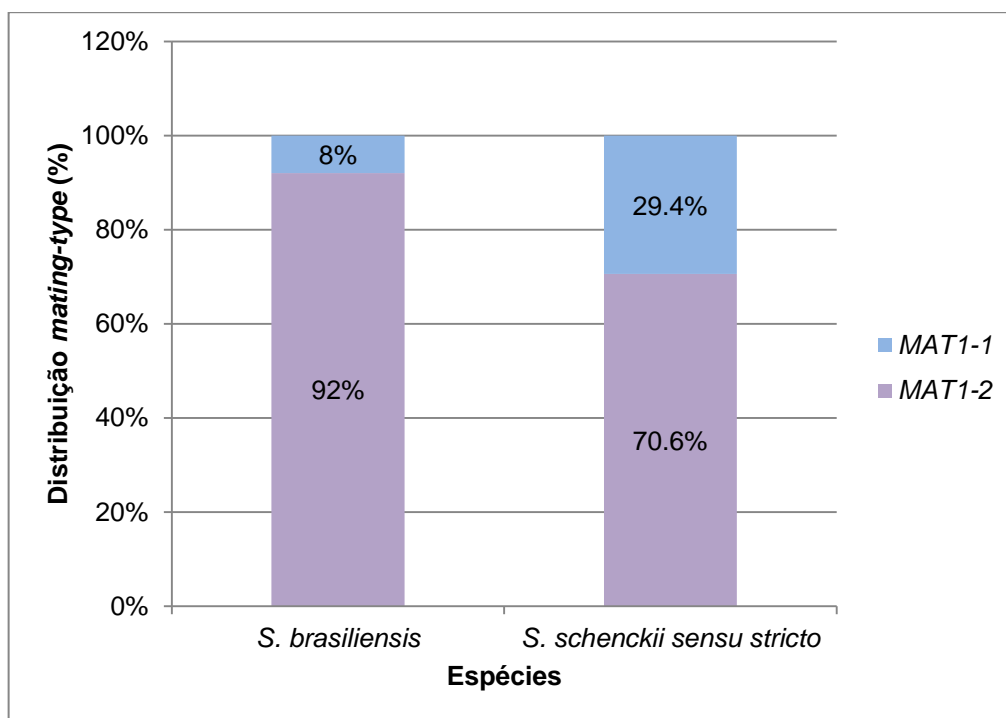


Figura 12 – Distribuição do tipo de acasalamento (*mating-type*) em isolados humanos detectado por PCR nos isolados identificados como *Sporothrix schenckii sensu stricto* (n=17) e *Sporothrix brasiliensis* (n=125).

Uma avaliação baseada na presença do idiomorfo sexual e identificação taxonômica de *Sporothrix* spp. foi utilizada para entender melhor a distribuição populacional desse patógeno em relação aos pacientes atendidos no HUCAM. Observando a origem geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo, foi possível visualizar como o tipo de acasalamento entre as espécies de *Sporothrix* estão distribuídas no Espírito Santo. De 142 casos de esporotricose humana, obtivemos os dados epidemiológicos de apenas de 132, portanto, não foi possível analisar as variáveis propostas para 10 pacientes.

Os 132 isolados investigados neste estudo foram associados a casos de esporotricose notificados em nove regiões do estado, sendo elas: Região Metropolitana, Central Serrana, Sudoeste Serrana, Litoral Sul, Central Sul, Caparaó, Rio Doce, Centro-Oeste e Nordeste. Podemos verificar que a presença do idiomorfo *MAT1-2* predomina na maior parte das regiões, independente da espécie, com exceção das regiões Sudoeste Serrana e Caparaó. A distribuição de espécies no estado e idiomorfos sexuais são apresentadas no Anexo III. De acordo com os resultados obtidos neste estudo, *S. brasiliensis* é atualmente responsável pela maior parte dos casos de esporotricose no estado do Espírito Santo, sendo prevalente na

região metropolitana (n=98/125 (78,4%)). Em contrapartida, *Sporothrix schenckii* s. str. predomina na Região Serrana e em áreas rurais do estado. Nos municípios de Domingos Martins, Santa Maria de Jetibá, Vila Velha, Vitória e Guarapari, ambas as espécies estão presentes entre os isolados estudados. Podemos verificar melhor o perfil da esporotricose humana antes de 2015 e entre 2016 a 2021 através da Figura 13. Vale ressaltar que essa casuística incluiu aqueles pacientes atendidos apenas pelo serviço de infectologia do HUCAM, referência em esporotricose no nosso estado.

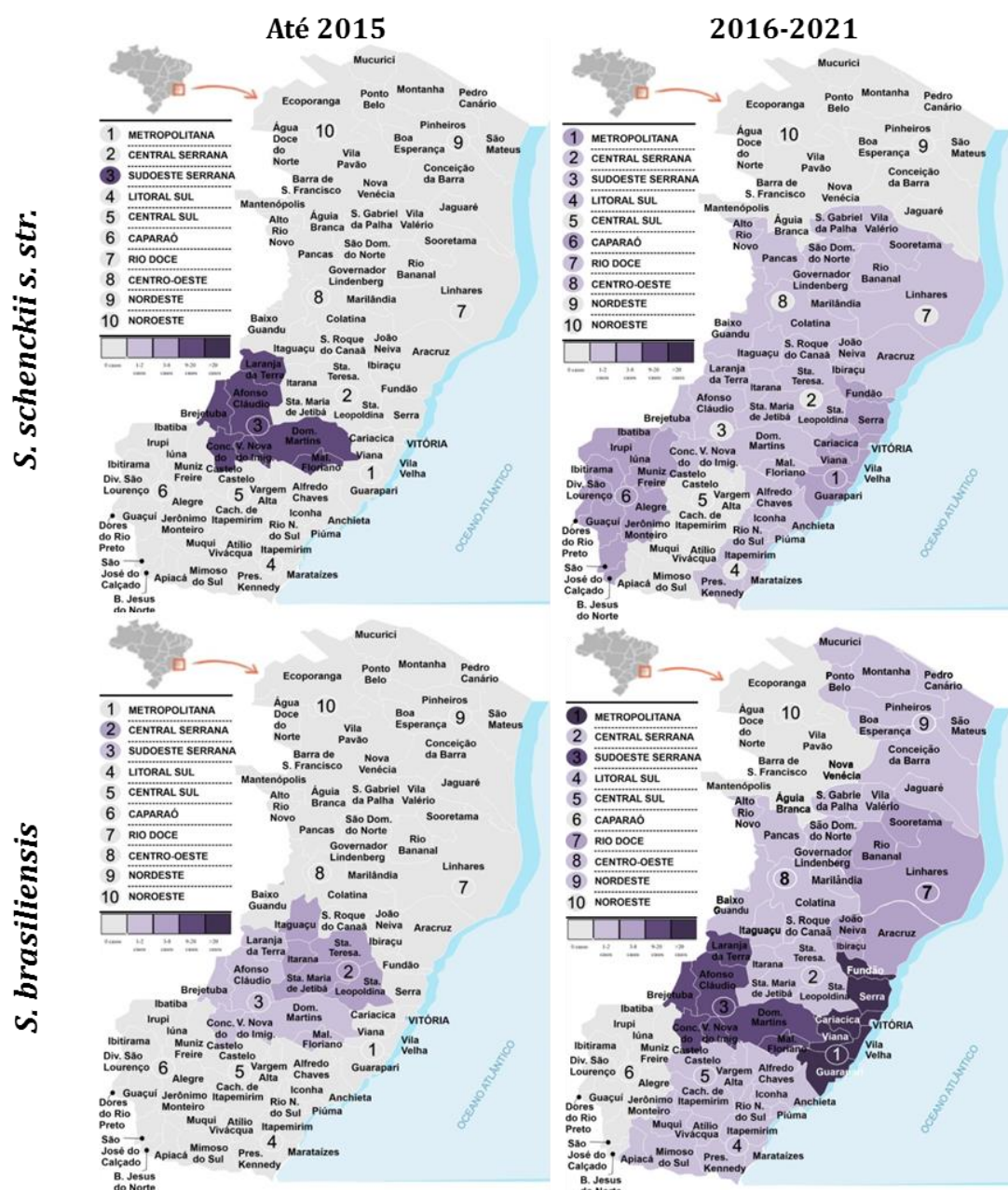


Figura 13 – Panorama atual da esporotricose humana e distribuição das espécies de *S. schenckii* s. str. e *S. brasiliensis* antes de 2015 e entre 2016-2021.

rothrix spp.
isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo”.

A maioria dos pacientes pertencia ao sexo feminino (n=79/59,9%) com média/mediana de idade de 40/41 anos, respectivamente. A principal manifestação clínica apresentada pelos pacientes foi a forma linfocutânea (n=92/ 69,7%), seguido pela forma cutânea-fixa (n=37/28%) e, em menor frequência, a forma disseminada (n=3/2,3%), sendo esta última, a mais grave da doença, no qual um paciente imunodeprimido (HIV/AIDS) incluído no estudo evoluiu a óbito (Tabela 1). Na Figura 14, podemos observar algumas manifestações clínicas dos pacientes incluídos no nosso estudo.

Tabela 1 – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo confirmados com esporotricose (n=132).

| Variáveis | Pacientes | |
|---|-----------|-----------------|
| | N | Porcentagem (%) |
| Gênero | | |
| Feminino | 79 | 59,9 |
| Média/Mediana de idade = 40/41 | | |
| Masculino | 53 | 40,1 |
| Média/Mediana de idade = 38,7/40 | | |
| Apresentação Clínica | | |
| Linfocutânea | 92 | 69,7 |
| Cutânea-Fixa | 37 | 28 |
| Disseminada | 3 | 2,3 |
| Fonte de Infecção | | |
| Zoonose | 112 | 84,9 |
| Ambiental | 20 | 15,1 |

Em relação à transmissão da doença, 84,9% dos pacientes relataram contato prévio com felinos doentes, caracterizando, assim, a rota de transmissão zoonótica como a mais prevalente no estado nos últimos anos. Todos esses dados podem ser observados na Tabela 1. Do total de 132 pacientes, 77 (58,3%) não apresentaram nenhuma doença crônica ou doença de base, sendo considerados

imunocompetentes. Entre os demais pacientes (n=55/47,7%), as principais comorbidades relatadas foram hipertensão arterial sistêmica (n=25/18,9%), *diabetes mellitus* (n=8/6%), infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (n=2/1,5%).



Figura 14 – Manifestações clínicas da esporotricose de pacientes incluídos no estudo. A) Esporotricose localizada, com lesão no ombro esquerdo; B) Esporotricose cutâneo-linfática no braço direito; C) Esporotricose localizada no pé esquerdo; D) Esporotricose localizada na cabeça; E) Esporotricose cutâneo-linfática no braço direito; F-G) Esporotricose sistêmica; H) Esporotricose localizada com lesão na mão direita.

Foi observada uma grande variação quanto ao tempo entre os primeiros sintomas até o diagnóstico definitivo, sendo este de 1 semana até 8 meses. A grande maioria dos pacientes (n=77/58,3%) obteve o seu diagnóstico entre 4 e 8 semanas a partir dos primeiros sinais e sintomas. Podemos acompanhar essa variação por meio da Figura 15, sendo o tempo de diagnóstico de 4 semanas o mais frequente entre os demais observados (n=42/31,8%). Em alguns poucos casos

"Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo".

(n=7/5,3%), foi possível obter o diagnóstico logo na primeira semana, por outro lado, houve um caso (n=1/0,8%) em que o paciente aguardou até 8 meses para ter o seu diagnóstico esclarecido e definitivo.

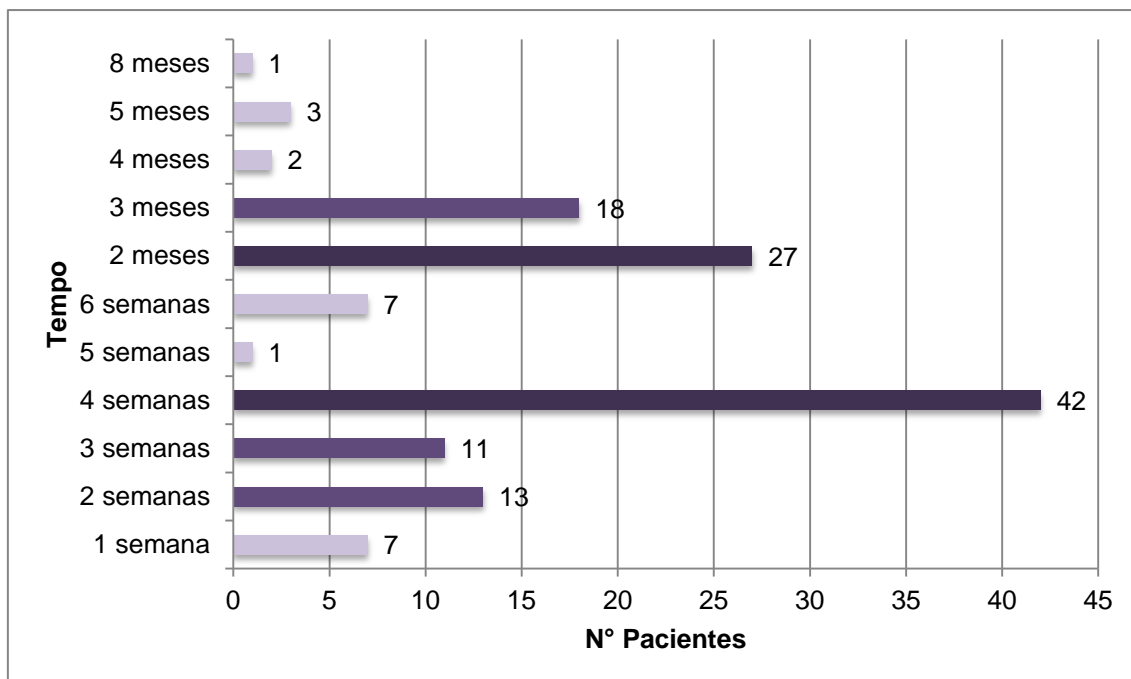


Figura 15 – Variação do tempo entre os primeiros sintomas até o diagnóstico definitivo dos pacientes incluídos no estudo (n=132).

Além disso, o tratamento antes do diagnóstico conclusivo da esporotricose foi baseado geralmente no uso de antibióticos, sendo muitas vezes utilizada a terapia combinada entre antibióticos de amplo espectro ou raramente associado a algum antifúngico. Outras medicações também foram utilizadas. Antecedendo o diagnóstico, os antibióticos mais utilizados pelos pacientes em foram cefalexina (n=43/32,6%), amoxicilina mais clavulanato (n=19/14,4%) e ceftriaxona (n=14/10,6%) (n=76/57,6%) (Tabela 2).

Tabela 2 – Tratamento de escolha dos pacientes incluídos no estudo antecedendo o diagnóstico de esporotricose (n=132).

| Terapêutica de escolha antes do diagnóstico | Frequência utilizada em relação ao número de pacientes |
|---|--|
| Cefalexina | 43/132 |
| Amoxicilina + Clavulanato | 19/132 |
| Ceftriaxona | 14/132 |
| Penicilina G benzatina | 13/132 |
| Sulfametoxazol + trimetoprim | 13/132 |
| Amoxicilina | 11/132 |
| Itraconazol | 11/132 |
| Clindamicina | 8/132 |
| Azitromicina | 7/132 |
| Levofloxacino | 7/132 |
| Ciprofloxacino | 6/132 |
| Mupirocina | 3/132 |
| Terbinafina | 3/132 |
| Fluconazol | 2/132 |
| Aciclovir | 1/132 |
| Doxiciclina | 1/132 |
| Ivermectina | 1/132 |

Após a identificação do agente infeccioso em questão, o manejo terapêutico foi estabelecido de acordo com as lesões e gravidade do paciente. O itraconazol foi o antifúngico mais utilizado pelos pacientes (n=98/74,2%), seguido pelo iodeto de potássio (n=21/15,9%), combinação itraconazol e iodeto de potássio (n=10/7,6%), anfotericina B e itraconazol em combinação (n=2/1,5%) e anfotericina B (n=1/0,8%) (Figura 16).

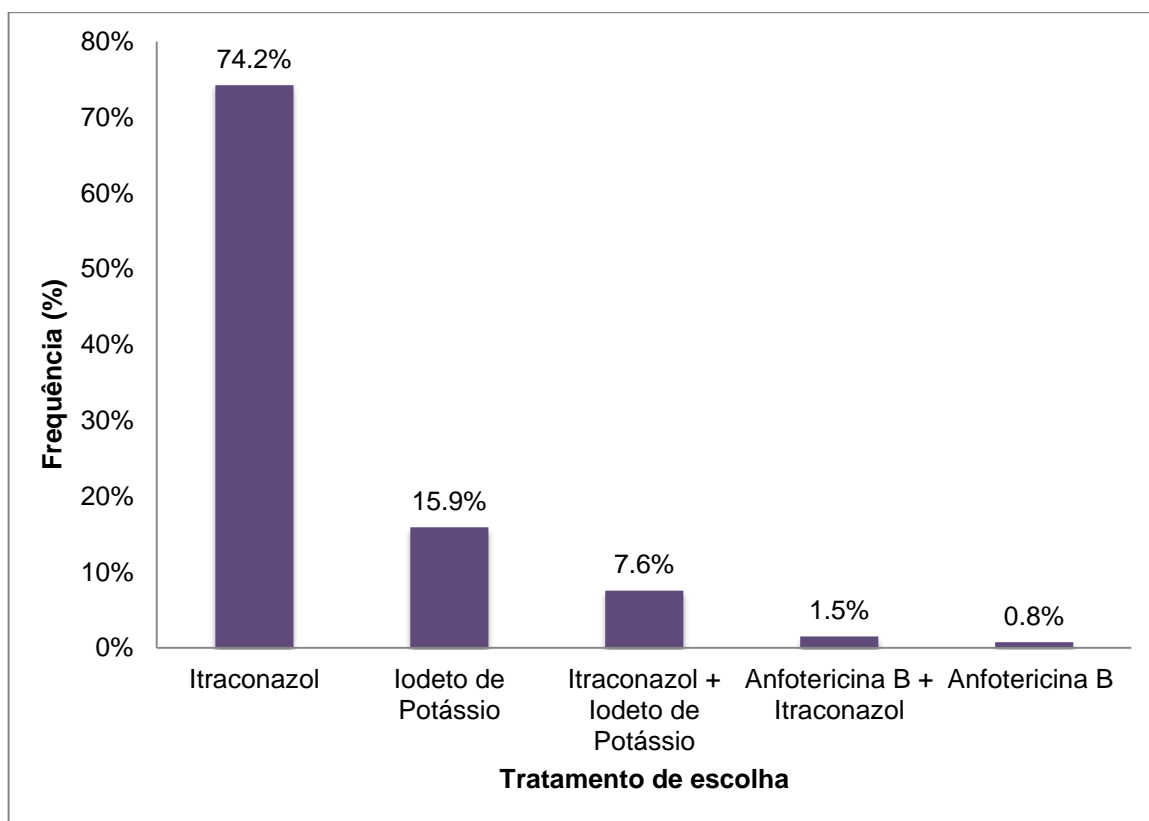


Figura 16 – Antifúngicos selecionados para o tratamento da esporotricose dos pacientes incluídos no estudo (n=132).

Para avaliar se havia variabilidade inter e intraespecífica entre os isolados de *Sporothrix*, lançamos mão da técnica de AFLP, anteriormente descrita. Foram selecionados arbitrariamente isolados das duas espécies detectadas no estudo, perfazendo um total de 116 isolados (*S. brasiliensis* n=104, *S. schenckii sensu stricto* n=12). Dentre os isolados de *S. brasiliensis*, foram incluídas 20 amostras de felinos representativas de seis cidades do Espírito Santo de onde foram diagnosticadas casos de esporotricose humana incluídos neste estudo (Tabela 3). Além disso, para fins de comparação dos isolados, incluímos o controle das três espécies clinicamente relevantes: *S. brasiliensis* (grupo I), *S. schenckii s. str.* (grupo II) e *S. globosa* (grupo III).

De acordo com o dendrograma da Figura 17, observamos que os isolados foram agrupados corretamente de acordo com cada táxon. Podemos notar a formação de três grandes grupos distintos que não derivam de um ancestral comum, correspondendo e confirmando a interespecificidade dos isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii s. str.* oriundos de diferentes regiões do Espírito Santo, além de *S.*

globosa utilizada como controle no nosso estudo. Por outro lado, percebemos algumas subdivisões dentro da espécie de *S. brasiliensis*. Dessa forma, os isolados de *S. brasiliensis* que possuem o idiomorfo sexual *MAT1-1* agruparam nas extremidades do dendrograma e não se agrupam com os isolados que possuem o idiomorfo sexual *MAT 1-2*. Apesar da grande maioria dos isolados de *S. brasiliensis* serem clonais, cabe destacar que existe diferença intraespecífica desse patógeno entre os isolados do Espírito Santo, visto que, nem todos derivam de um único ancestral.

Não foi observada correlação entre os diferentes grupos formados e as formas clínicas apresentadas pelos pacientes atendidos, tampouco padrões específicos distinguindo os isolados presentes na região metropolitana das demais regiões, demonstrando a ampla distribuição e diversidade das espécies em todo o estado.

Tabela 3 – Isolados obtidos de felinos com esporotricose no estado do Espírito Santo e incluídos no AFLP.

| Código | Espécie | Mating-type | Região | Município | Sexo | Ano isolamento |
|--------|-------------|---------------|---------------|------------|------|----------------|
| 284 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Rio Doce | Aracruz | M | 2019 |
| 300 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | M | 2019 |
| 301 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | M | 2019 |
| 302 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | M | 2019 |
| 326 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | M | 2019 |
| 331 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | F | 2019 |
| 364 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Rio Doce | Aracruz | M | 2019 |
| 366 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | M | 2019 |
| 384 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Anchieta | M | 2019 |
| 401 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Anchieta | M | 2019 |
| 413 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Anchieta | M | 2019 |
| 424 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-1</i> | Metropolitana | Vitória | M | 2019 |
| 451 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | M | 2020 |
| 471 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Guarapari | M | 2020 |
| 472 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Serra | F | 2020 |
| 473 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Serra | M | 2020 |
| 478 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Serra | M | 2020 |
| 483 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Serra | M | 2020 |
| 484 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Guarapari | F | 2020 |
| 492 | <i>Sbra</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Serra | M | 2020 |

Legenda – *Sbra*: *Sporothrix brasiliensis*; M: Macho; F: Fêmea.

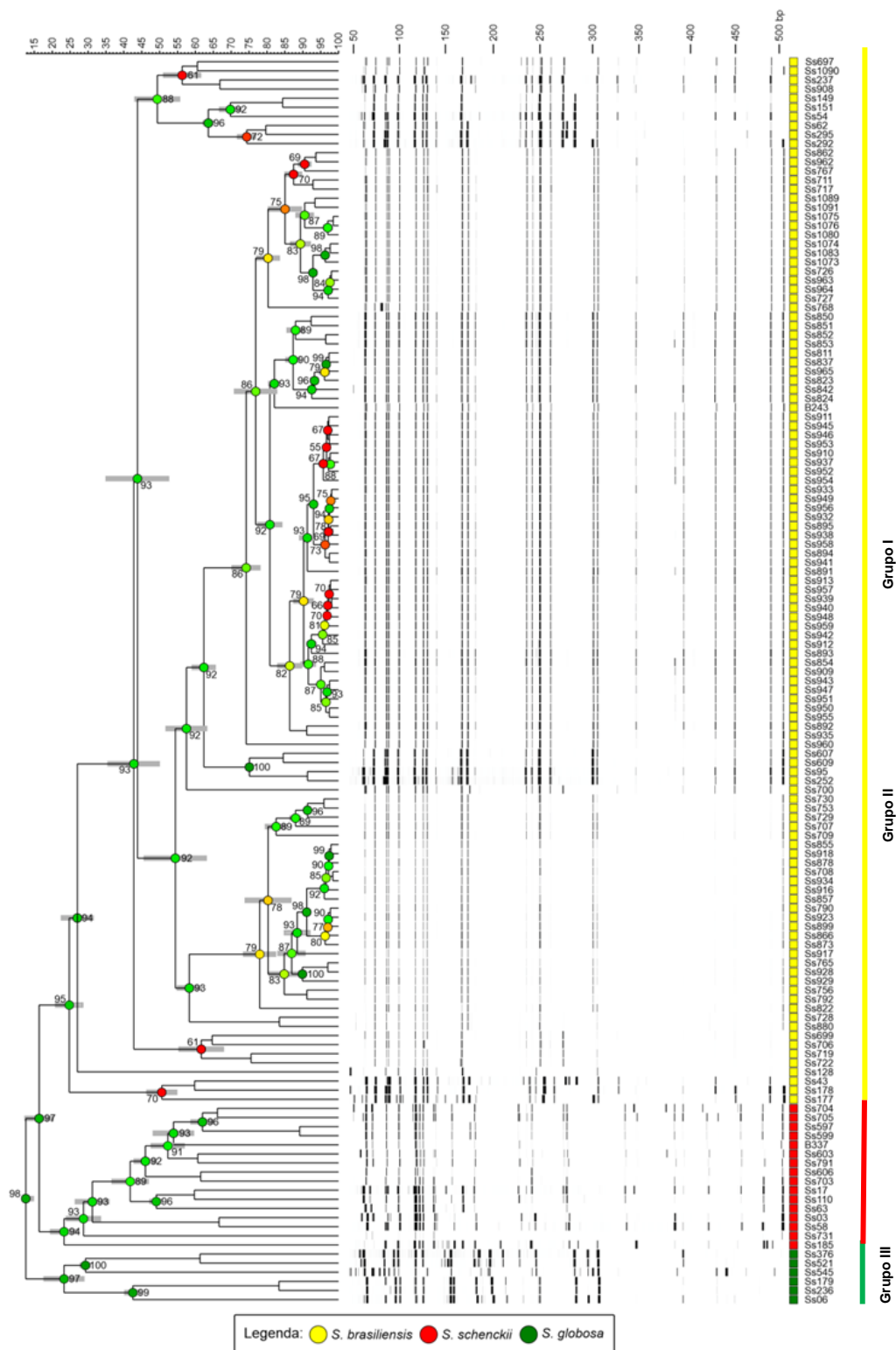


Figura 17 – Dendrograma representando o perfil de agrupamento gerado pela técnica de AFLP resultantes dos isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii sensu stricto* presentes no estado do Espírito Santo. A análise foi realizada através do software BioNumerics v7.6.

Já na Figura 18, podemos observar as interconexões geradas entre os isolados analisados que foram utilizadas para investigar as relações evolutivas entre os genótipos analisados. Podemos destacar que as espécies *S. brasiliensis* (representada pela cor amarela), *S. schenckii* s. str. (representada pela cor vermelha) e *S. globosa* (representada pela cor verde), demonstraram estar agrupadas de forma heterogênea. Além disso, observamos um primeiro grupo dentro da população de *S. brasiliensis* que se conecta em determinado ponto com *S. schenckii* s. str. e este está conectado com *S. globosa*. Por outro lado, observamos um segundo grupo da espécie *S. brasiliensis* mais distantes, que não se interligam com as demais espécies. Em seguida, realizamos a análise de componentes principais (PCA) e o escalonamento multidimensional (MDS) das espécies e conseguimos observar a subdivisão dos grupos formados em ambos os gráficos, especialmente através do MDS (Figura 19).

Por fim, aplicamos o *Self-Organizing Map* (SOM) para determinar a consistência da diferenciação das populações definidas pela análise de agrupamento gerada pelo AFLP (Figura 20). A distância genética relativa entre grupos vizinhos (blocos pretos) é designada pela intensidade das linhas brancas que separam os aglomerados. Assim, grupos intimamente ligados e correlacionados geneticamente estarão mais próximos e separados por linhas mais escuras e finas. Em contrapartida, quanto maior a distância entre as linhagens, mais clara e grossa será a linha que os separam. A Figura 20-A foi gerada a partir de dados da matriz binária, enquanto a Figura 20-B a partir de dados da matriz de similaridade. Podemos reafirmar que a população de *S. brasiliensis* está claramente dividida, com isolados bem distantes dentro do próprio grupo.

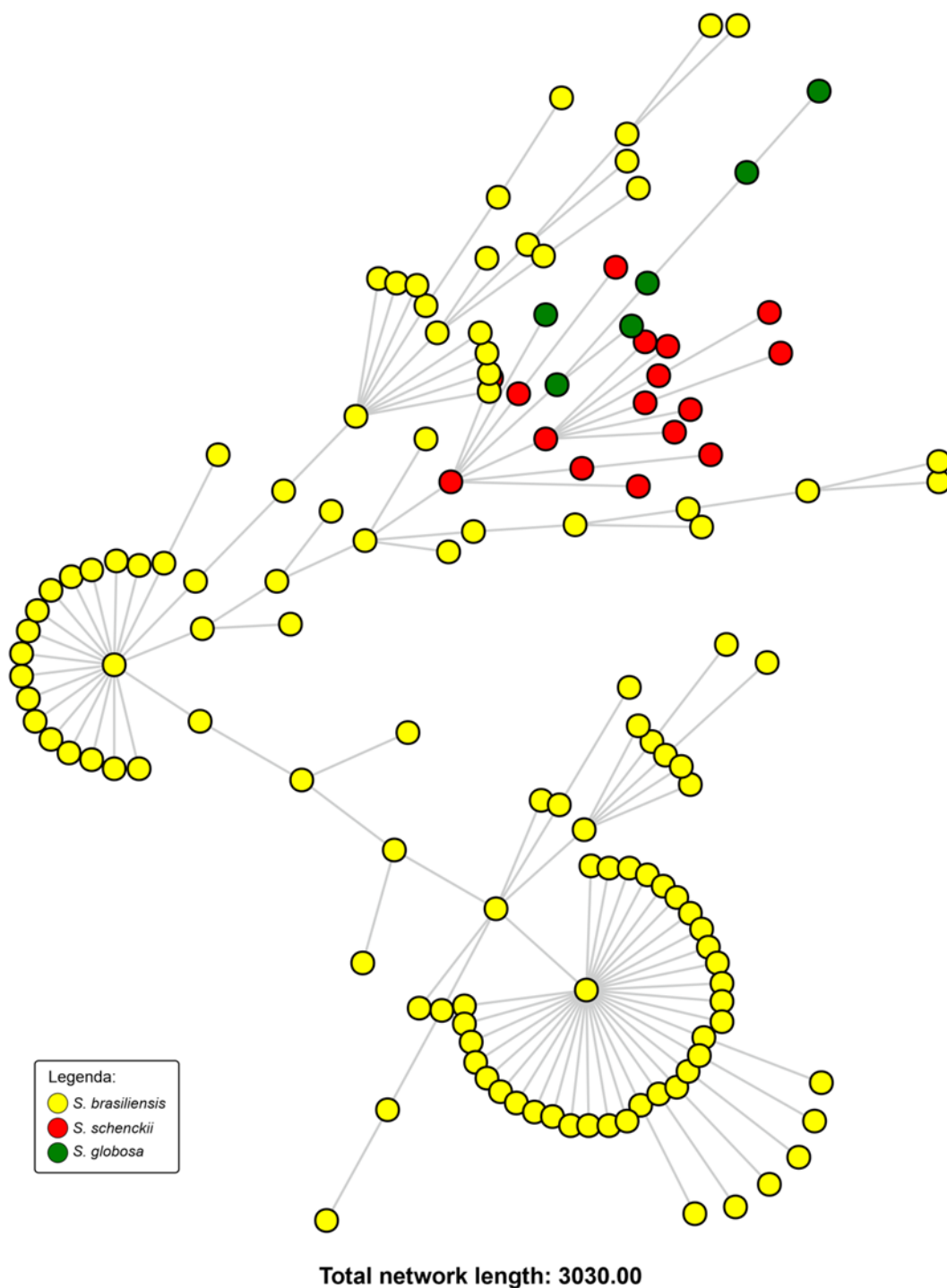


Figura 18 – Árvore geradora mínima (MST) das espécies de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii sensu stricto* avaliadas neste estudo. A análise foi realizada através do software BioNumerics v7.6.

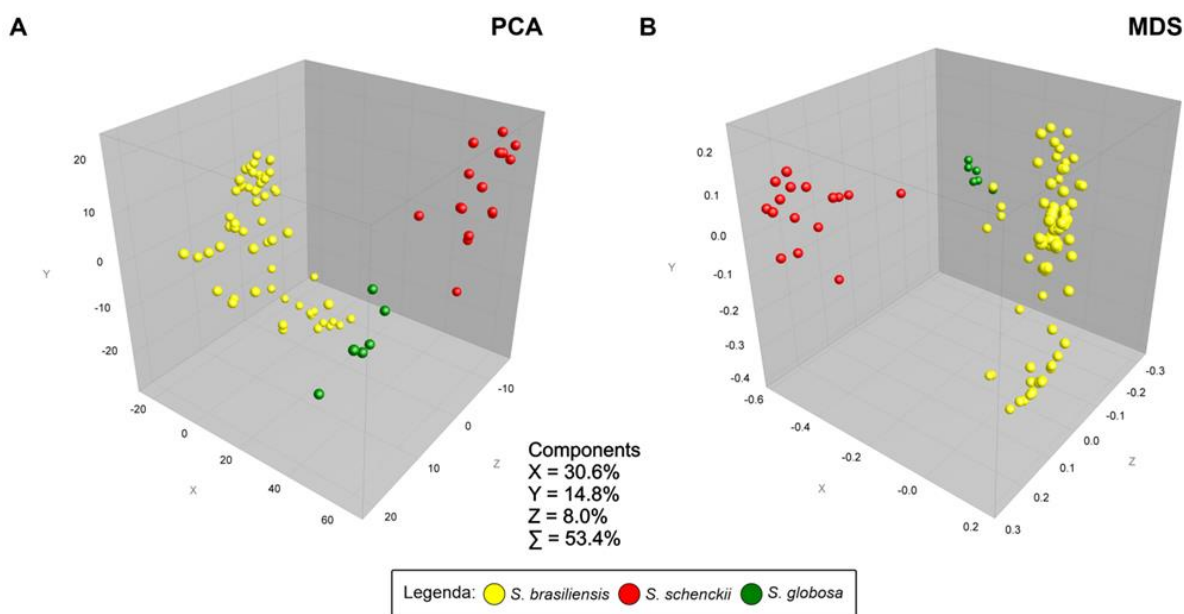


Figura 19 – Análise de componente principal (PCA) e escalonamento multidimensional (MDS) das espécies de *Sporothrix* no estado do Espírito Santo. Ambos foram construídos utilizando o software BioNumerics v7.6.

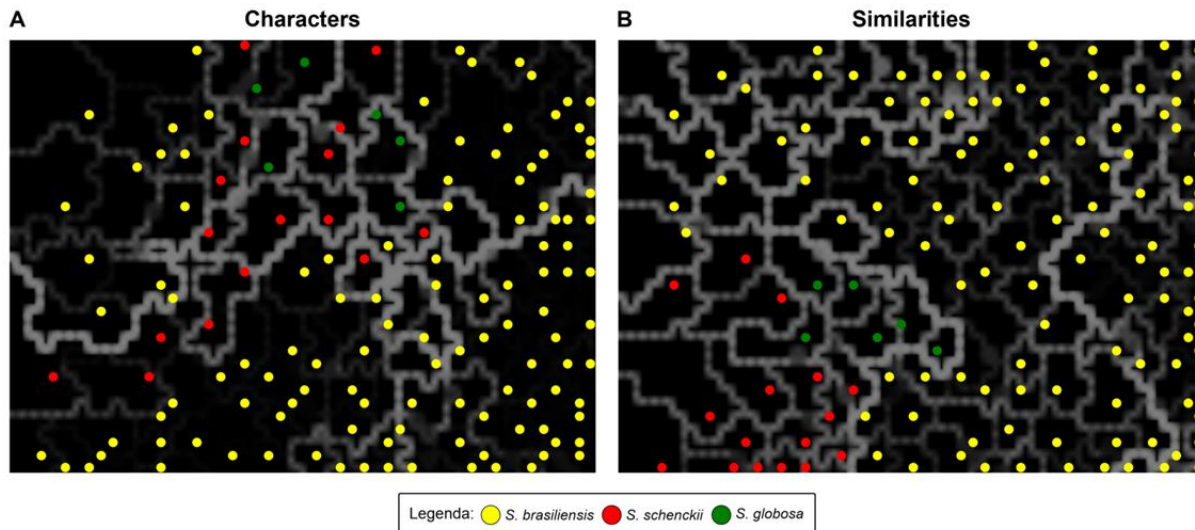


Figura 20 – Distribuição dos genótipos de *Sporothrix* spp. gerados pelo AFLP utilizando Self-Organizing Map (SOM) das espécies de *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix schenckii sensu stricto*.

Em relação à susceptibilidade aos antifúngicos *in vitro*, foram avaliados os mesmos 116 isolados analisados pelo AFLP, sendo 104 *S. brasiliensis* e 12 *S. schenckii s. str.* Os valores de CIM para a cepa referência utilizada estavam dentro

dos valores estabelecidos para os fármacos testados: anfotericina B (0,5 – 4 µg/mL), itraconazol (0,25 – 0,5 µg/mL) posaconazol (0,06 – 0,5 µg/mL) e terbinafina (0,25 – 0,5 µg/mL), validando, portanto, a diluição adequada dos antifúngicos. Os valores de CIM determinados estão descritos na tabela 4 e 5 abaixo.

Nos isolados provenientes de amostras humanas, a terbinafina demonstrou ser o antifúngico mais efetivo tanto para a espécie *S. brasiliensis* quanto para *S. schenckii s. str.* (CIM₉₀=0,125 µg/mL). Entre os azólicos, posaconazol demonstrou valores de CIM elevados para *S. schenckii s. str.* (CIM₉₀=2,0 µg/mL). No entanto, os isolados *S. brasiliensis* apresentaram valor de CIM₉₀ duas vezes maior que os isolados de *S. schenckii s. str.* Para itraconazol e anfotericina B, o valor de CIM₉₀ para ambas as espécies foi o mesmo, 4,0 µg/mL e 2,0 µg/mL, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Perfil de susceptibilidade antifúngica *in vitro* dos 96 isolados de *Sporothrix* spp. provenientes de amostras humanas frente anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina.

| Espécies (n) | Antifúngicos | Varição de CIM µg/mL | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ |
|-----------------------------|----------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>S. brasiliensis</i> (84) | Anfotericina B | 0,5-2,0 | 2,0 | 2,0 |
| | Itraconazol | 0,5-8,0 | 2,0 | 4,0 |
| | Posaconazol | 1,0-4,0 | 2,0 | 4,0 |
| | Terbinafina | 0,03-0,25 | 0,06 | 0,125 |
| <i>S. schenckii</i> (12) | Anfotericina B | 1,0-2,0 | 2,0 | 2,0 |
| | Itraconazol | 1,0-8,0 | 2,0 | 4,0 |
| | Posaconazol | 1,0-2,0 | 2,0 | 2,0 |
| | Terbinafina | 0,03-0,125 | 0,06 | 0,125 |

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CIM₅₀: valor de CIM capaz de inibir 50% das amostras testadas; CIM₉₀: valor de CIM capaz de inibir 90% das amostras testadas.

Nos isolados de *S. brasiliensis* provenientes felinos, a terbinafina também demonstrou ser o antifúngico mais efetivo (CIM₉₀=0,125 µg/mL), seguido pela anfotericina B e posaconazol (CIM₉₀=2,0 µg/mL). No entanto, os isolados de felinos apresentaram valor de CIM₉₀ mais elevados para o itraconazol (CIM₉₀=4,0 µg/mL) (Tabela 5).

Tabela 5 – Perfil de susceptibilidade antifúngica *in vitro* dos 20 isolados de felinos frente anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina.

| Espécie (n) | Antifúngicos | Varição de CIM µg/mL | CIM₅₀ | CIM₉₀ |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <i>S. brasiliensis</i> (20) | Anfotericina B | 0,5-2,0 | 1,0 | 2,0 |
| | Itraconazol | 1,0-4,0 | 2,0 | 4,0 |
| | Posaconazol | 0,5-2,0 | 2,0 | 2,0 |
| | Terbinafina | 0,03-0,125 | 0,06 | 0,125 |

Legenda: CIM – Concentração inibitória mínima; CIM₅₀: valor de CIM capaz de inibir 50% das amostras testadas; CIM₉₀: valor de CIM capaz de inibir 90% das amostras testadas.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial da esporotricose, em sua maioria, é realizado a partir de cultura, seguido da identificação do agente etiológico por caracteres morfológicos. Entretanto, as culturas crescem lentamente, a caracterização morfológica para identificação de espécies não é uma ferramenta acurada e o manejo terapêutico acaba sendo protelado.

A espécie *S. schenckii* s. str., por exemplo, apresenta na micromorfologia, em geral, conídios sésseis, alongados e triangulares, sendo esse último formato mais raro, porém exclusivo da espécie em questão (MARIMON *et al.*, 2007). Por outro lado, a espécie *S. brasiliensis* geralmente apresenta conídios agrupados na parte apical dos conidióforos, conferindo o aspecto de “margarida”. Ademais, *S. brasiliensis* sabidamente pode apresentar fenótipos distintos: um fenótipo designado como albino, na qual não é observada produção de melanina e o outro fenótipo melanizado, característica do gênero (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

No nosso estudo, apenas um isolado albino foi recuperado e identificado como *S. brasiliensis*. Nesse caso, o paciente apresentou esporotricose linfocutânea, a medicação de escolha para o tratamento foi o itraconazol, e o paciente obteve um desfecho clínico favorável, sem nenhuma intercorrência. Oliveira e colaboradores (2019) retrataram um caso em que foi isolado duas espécies de *S. brasiliensis* geneticamente e biologicamente distintas em uma única lesão do paciente, e que estas espécies variaram em sua produção de melanina. No modelo murino, o fenótipo albino surpreendentemente se mostrou mais patogênico quando comparado ao isolado melanizado, apresentando uma esporotricose mais grave, com altos níveis de infiltrados inflamatórios e alterações em todos os órgãos nos achados histopatológicos. É notável que apesar da melanina ser um fator de virulência importante, esta não é determinante para predizer unicamente a patogenicidade da espécie (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Nossos achados, portanto, discordam dos achados de Oliveira *et al.* (2019).

Os critérios morfológicos que diferenciam as espécies são bastante sutis e sua variação pode levar a erros na identificação da espécie, portanto a morfologia foi utilizada em nosso trabalho apenas para identificação definitiva de gênero e presuntiva de espécie. Ademais, não conhecíamos a epidemiologia da distribuição

de espécies no estado do Espírito Santo, dificultando ainda mais trabalhar apenas com esse recurso.

Uma vez confirmado o gênero *Sporothrix*, no nosso estudo, foi realizada a identificação molecular por meio de PCR espécie-específica direcionada ao gene da calmodulina. Dessa forma, foi possível observar que as espécies *S. schenckii* s. str. e *S. brasiliensis* estão presentes no Espírito Santo, o que nos faz compreender que duas rotas distintas de transmissão ocorrem no estado. A via sapronótica, sendo comumente associado ao *S. schenckii* s. str. como o principal agente responsável, enquanto por outro lado, *S. brasiliensis* intimamente associada à transmissão animal-animal e animal-humano, sendo esta última mais efetiva na disseminação da doença, pois a maioria dos pacientes relataram contato prévio com felinos doentes positivos para esporotricose. A identificação de espécies por ensaios de biologia molecular é a opção mais rápida e efetiva (MORGADO *et al.*, 2022). Vários trabalhos na literatura apontam essa metodologia como uma ferramenta potente para identificação de espécies em surtos (RODRIGUES *et al.*, 2016; GREMIÃO *et al.*, 2017; LOPES-BEZERRA *et al.*, 2018; CAROLIS *et al.*, 2022), desde quando validada por Rodrigues *et al.* (2015a), não sendo diferente em nosso trabalho.

Em um estudo anterior realizado por Araujo *et al.* (2015), *S. globosa* também foi identificada no estado do Espírito Santo. Além disso, os autores identificaram *S. schenckii* s. str. como a espécie mais prevalente. Com isso, conseguimos sugerir uma mudança epidemiológica da esporotricose no estado na última década, no qual a espécie *S. brasiliensis* se expandiu exponencialmente em todo o estado, especialmente na região metropolitana.

A fim de se obter respostas quanto à influência da genética populacional e epidemiologia molecular de fungos patogênicos, alguns estudos foram realizados para avaliar a estrutura da população através da sexualidade em fungos de interesse clínico, como em *Histoplasma* spp. e *Paracoccidioides* spp., (RODRIGUES *et al.*, 2020b; ROBERTO *et al.*, 2021). Com a mesma finalidade, Teixeira e colaboradores (2015) avaliaram a distribuição geográfica de genes *MAT* de isolados de *S. schenckii* s. str. e *S. brasiliensis* em alguns estados do território brasileiro. Nas duas espécies, os autores detectaram a presença de apenas um dos idiomorfos (*MAT1-1* ou *MAT1-2*) no genoma de cada cepa, sugerindo que são todas heterotáticas. Além disso, os autores relataram que as espécies de *Sporothrix* têm

razões aproximadamente iguais dos idiomorfos *MAT1-1* e *MAT1-2*, sugerindo também a presença de acasalamentos aleatórios dentro de cada espécie.

Ainda em relação ao estudo de Teixeira *et al.* (2015), nos estados do Rio Grande do Sul e Minas Gerais, a frequência de isolados *MAT1-1* foi significativamente maior em *S. brasiliensis*, enquanto os isolados *MAT1-2* foram dominantes no Rio de Janeiro. Neste contexto, levando em consideração que o estado do Espírito Santo faz fronteira com Minas Gerais e Rio de Janeiro, podemos sugerir com os nossos dados que a população de *S. brasiliensis* do Espírito Santo provavelmente migrou do Rio de Janeiro, pois a maioria dos isolados possui o *locus* *MAT1-2*, estando presente em 92% das cepas. Entretanto, a população de *S. brasiliensis* com *locus* *MAT1-1* se mostrou fora dos padrões observados na literatura.

Em contraste, *S. schenckii* *s. str.* pareceu ter uma proporção de 1:1 de ambos *mating-types* nos estados de São Paulo, Paraná e Goiás (TEIXEIRA *et al.*, 2015). Em relação aos isolados identificados como *S. schenckii sensu stricto* (n=17) no nosso estudo, há predominância do idiomorfo *MAT1-2* (70,6%), diferente do padrão relatado na literatura para isolados do Rio de Janeiro para a espécie em questão.

Os altos níveis de clonalidade efetiva e endemidade encontrada em *S. brasiliensis* podem ter mais a ver com a expansão do gene *MAT*. Segundo Teixeira *et al.* (2015), o fungo pode ter interações específicas com o hospedeiro, enquanto *S. schenckii* pode gerar diversidade genética populacional através da recombinação sexual. Curiosamente, esses dois fungos podem causar a mesma doença enquanto apresentam diferentes estruturas populacionais. É de conhecimento geral que a reprodução sexual aumenta a taxa de adaptação a novos ambientes, aumentando as taxas de mutação na descendência fúngica. Os nossos resultados demonstram que a caracterização do tipo de acasalamento em ambas as espécies revelou uma razão enviesada entre os idiomorfos *MAT1-1:MAT1-2*, com predominância de isolados *MAT1-2*. Como a amplificação clonal pode enviesar as frequências do tipo acasalamento, nossos resultados sugerem que os genótipos de *S. brasiliensis* durante os surtos na população felina são predominantemente clonais, o que não implica necessariamente a ausência de sexo, mas indica o surgimento de um genótipo bem-sucedido.

Pensando em tipos de acasalamento como um importante determinante de virulência, Della Terra e colaboradores (2017) observaram que ambos os idiomorfos estão diretamente associados à virulência em *Sporothrix* spp., pois podem ser distribuídos uniformemente na natureza (1:1), desviando em amostras clínicas com a maioria de um único *locus* sendo detectado, mas nenhuma diferença significativa foi encontrada em modelos murinos de infecção. No entanto, mais estudos devem ser realizados para confirmar esta hipótese sobre a adaptação ecológica em *Sporothrix*.

No estado do Espírito Santo, a esporotricose felina vem progredindo com grande velocidade por todo o estado, sendo a população de felinos afetada em sua maior parte por machos não castrados, com hábito semi-domiciliar e de áreas urbanas. A espécie *S. brasiliensis* parece ser a única responsável pela doença nesses animais, corroborando, portanto, com o fato de a transmissão zoonótica estar intimamente ligada a esta espécie em questão (REDIGUIERI *et al.*, 2022). O primeiro relato de esporotricose ocorreu em 1898, entretanto, até o ano de 2007, a espécie *S. brasiliensis* ainda era desconhecida (ETCHECOPAZ *et al.*, 2021).

Essa mesma expansão de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis* ocorre nas demais regiões brasileiras, como notavelmente ocorreu no estado do Rio Grande do Sul. Através da análise de dados de vigilância epidemiológica durante um período de 5 anos, Sanchotene *et al.* (2015) observaram uma mudança no cenário nesse estado, em que até o ano de 2010 era detectado 0,75 novos casos de esporotricose por mês e, em 2014, esse número passou a 3,33 novos casos por mês (SANCHOTENE *et al.*, 2015). Um estudo mais recente, realizado no Paraná, também demonstrou a crescente propagação da doença, em que a taxa de incidência da esporotricose aumentou de 0,27 casos/100.000 pacientes em 2011, para 30,4 casos/100.000 em 2021, relatando transmissão zoonótica em 98,3% dos casos (COGNIALLI *et al.*, 2022). A expansão da esporotricose em áreas urbanas no Espírito Santo foi observada principalmente a partir de 2015, e coincidentemente, estão relacionadas à esporotricose zoonótica e o envolvimento dos felinos como principais vetores. A partir de então, não observamos desaceleração da doença, mas ainda há desconhecimento dela por parte da população.

Nosso estudo, encontramos um perfil de pacientes em que o sexo feminino é o mais afetado, principalmente pela transmissão zoonótica. Além disso, o tempo máximo de diagnóstico desde os primeiros sinais e sintomas foi de 8 meses. No

estudo conduzido por Caus *et al.* (2019) no nosso estado, os autores realizaram um levantamento de casos de esporotricose diagnosticados no HUCAM em 30 anos (1982-2012), mesmo hospital de procedência dos pacientes incluídos neste estudo. Nesse período, 171 pacientes foram diagnosticados, sendo a maioria do sexo masculino (80,7%). Destes indivíduos, a maioria exercia atividades relacionadas à contato direto com plantas e solo, como jardinagem e agricultura (68,4%). A forma linfocutânea foi a mais comum (n=120/70,2%), seguido pela cutâneo-fixa (n=49/28,6%) e extracutânea (n=2/1,2%). O tempo decorrido do aparecimento da lesão até o diagnóstico definitivo dos pacientes variou entre 15 dias até 10 anos. Dessa forma, a esporotricose que antes era associada às atividades ocupacionais e de lazer, hoje está associada ao contato com felinos infectados por *Sporothrix* spp. Esse estudo reflete a mudança do cenário clínico da esporotricose no estado do Espírito Santo e o avanço da esporotricose felina.

O cenário demográfico e evolução clínica dos pacientes diagnosticados com esporotricose, atualmente, difere dos estudos mais antigos e reflete em grande parte o que já vem ocorrendo no país independente da região, ou seja, a doença mais prevalente em mulheres que tem um maior contato com felinos domésticos, apresentado o quadro de lesão linfocutânea (RABELLO *et al.*, 2021; POESTER *et al.*, 2022; VEASEY *et al.*, 2022). Recentemente, em um estudo realizado no Rio Grande do Norte por Bento *et al.* (2021), por exemplo, foram diagnosticados 122 pacientes com esporotricose, sendo a maioria dos pacientes do sexo feminino (70,5%). Desses pacientes, 71 deles (58,2%) apresentaram a forma linfocutânea da micose, corroborando com os dados do nosso estudo.

No nosso estudo, 12 casos utilizando itraconazol como monoterapia não foi suficiente, necessitando de terapia combinada com iodeto de potássio em 11 deles. Em um caso mais grave, a anfotericina B foi o fármaco alternativo. O tratamento de escolha para esporotricose tem focado no uso de itraconazol, sendo observada remissão da doença e cura clínica em grande parte das casuísticas publicadas (BENTO *et al.*, 2021; RABELLO *et al.*, 2021; CABEZA *et al.*, 2022). Em contrapartida, O iodeto de potássio tem sido utilizado como tratamento da esporotricose a mais de 100 anos (XUE *et al.*, 2009). Entretanto, alguns efeitos colaterais como gosto metálico, náuseas, vômitos, inapetência são observados. Com o passar do tempo, o itraconazol começou a ser utilizado como alternativa em casos

refratários, antifúngico de primeira linha de tratamento atualmente (SANDHU E GUPTA, 2003; BELDA *et al.*, 2021). No nosso estudo, o iodeto de potássio como monoterapia foi uma estratégia utilizada em casos não responsivos ao itraconazol, entretanto, o azólico foi o principal fármaco utilizado. De acordo com o estudo realizado no ES por Caus e colaboradores (2019), o iodeto de potássio foi estabelecido com sucesso terapêutico em 97,7% dos pacientes (n=168/171), seguido por itraconazol e terbinafina para os demais casos até o ano de 2012.

De acordo com os nossos resultados, foi possível demonstrar que existe variabilidade intraespecífica entre os isolados de *S. brasiliensis* no estado do Espírito Santo, em que os diferentes genótipos formam subgrupos dentro da mesma população. Entretanto, verificamos que a grande parte da população de *S. brasiliensis* em nosso estado é clonal, com dois grandes subgrupos de isolados provenientes de todas as regiões do Espírito Santo estudadas e que estes derivam do estado vizinho, Rio de Janeiro, considerado epicentro da doença no país.

No que diz respeito à diversidade genética de microrganismos, o AFLP é uma poderosa ferramenta molecular utilizada desde a década de 90 como impressão digital do DNA, sendo aplicada inclusive para estudos de variabilidade genética no reino Fungi (VOS *et al.*, 1995; ROSENDAHL E TAYLOR, 1997). Em um estudo recente realizado por Carvalho e colaboradores (2021b), a fim de obter uma visão mais dinâmica dos surtos de esporotricose, origem dos isolados e variabilidade genética das espécies de *Sporothrix*, foi utilizado a técnica de AFLP com três marcadores distintos. Desse modo, os autores demonstraram que o clado com as principais espécies clinicamente relevantes apresentaram uma alta diversidade genética, o que explica a dispersão e adaptação das espécies em ambientes distintos por todo o mundo. Além disso, os dados reforçam a progressão da doença e expansão de diversos genótipos distintos de *S. brasiliensis* por todo o país, acordando, que o estado do Rio de Janeiro é o provável centro de origem da doença (CARVALHO *et al.*, 2021b).

Apesar de existir essa diferença intraespecífica dentro da população de *S. brasiliensis*, Teixeira e colaboradores (2014) demonstraram que de acordo com a genômica populacional e a distribuição do tipo de acasalamento há uma predominância de um único clone de acasalamento nas epidemias, especialmente

no Rio de Janeiro, e a ausência ou limitação do sexo poderia favorecer o acúmulo de genes repetitivos os genomas dos microrganismos (TEIXEIRA *et al.*, 2014).

O teste de suscetibilidade *in vitro* é uma importante ferramenta para monitorar resistência a antimicrobianos. Espinel-Ingroff e colaboradores (2017) realizaram um estudo multicêntrico a fim de definir valores de CIM e seus respectivos pontos de corte epidemiológicos para espécies clinicamente relevantes do gênero *Sporothrix*. Em relação à susceptibilidade antifúngica de isolados de *S. brasiliensis* provenientes de felinos, assim como acontece em isolados clínicos humanos, os valores de CIM podem variar de acordo com a região.

Dos 20 isolados de felinos que selecionamos para avaliar o perfil de susceptibilidade no nosso estudo, percebemos que itraconazol foi o antifúngico com maiores valores de CIM, seguido por posaconazol, anfotericina B e terbinafina, sendo este último o mais efetivo com valores de CIM variando entre 0,03 µg/mL a 0,125 µg/mL. Além disso, não verificamos variação entre o perfil de sensibilidade de diferentes regiões do estado, demonstrando ser o mesmo independente da região testada. Há uma série de casos de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis* com resistência ao itraconazol em diversos locais do país, sendo o antifúngico majoritariamente escolhido como tratamento de primeira escolha (NAKASU *et al.*, 2021).

Maschio-Lima *et al.* (2021) avaliaram 189 casos de esporotricose felina causada por *S. brasiliensis* em São José do Rio Preto, São Paulo. Na investigação, a terbinafina (CIM₅₀= 0,25 µg/mL, CIM₉₀= 1,0 µg/mL), cetoconazol (CIM₅₀= 0,5 µg/mL, CIM₉₀= 1,0 µg/mL) e itraconazol (CIM₅₀= 0,5 µg/mL, CIM₉₀= 1,0 µg/mL), demonstraram melhor atividade antifúngica *in vitro*. Por outro lado, anfotericina B e iodeto de potássio demonstraram menor eficácia, apresentando valores de CIM mais elevados (CIM₅₀= 2,0 µg/mL, CIM₉₀= 8,0 µg/mL e CIM₅₀= 125 mg/mL, CIM₉₀= 250 mg/mL, respectivamente). Em outro estudo, realizado com 47 isolados de felinos no Rio de Janeiro, área hiperendêmica da esporotricose no Brasil, Machado (2015) observou que a terbinafina foi o antifúngico mais efetivo (CIM₅₀= 0,03 µg/mL, CIM₉₀= 0,06 µg/mL). Já entre os azólicos, o cetoconazol apresentou valores de CIM₅₀ igual a 0,5 µg/mL e CIM₉₀ igual 1,0 µg/mL, enquanto o itraconazol exibiu valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ mais elevados (1,0 µg/mL e 2,0 µg/mL, respectivamente). Apesar do valor inferior de CIM do cetoconazol, na prática, este antifúngico demonstrou uma

resposta terapêutica inferior quando comparado ao itraconazol. Já a anfotericina B apresentou valores de CIM₅₀= 1,0 µg/mL e CIM₉₀= 2,0 µg/mL (MACHADO, 2015). Podemos verificar que o perfil do teste de suscetibilidade pode variar de uma região para outra, e, até então, não tínhamos dados de susceptibilidade aos antifúngicos no estado para a esporotricose felina.

Em nosso estudo, o maior valor de CIM encontrado foi de 8 µg/mL, proveniente de um isolado da espécie *S. schenckii s. str.* do ano de 2016 e dois isolados provenientes da espécie *S. brasiliensis* do ano de 2018 e 2020 de humanos. Na prática clínica, os isolados provenientes da espécie *S. brasiliensis* foram tratados com itraconazol sem demais intercorrências, e o isolado de *S. schenckii s. str.* foi tratado com iodeto de potássio como primeira escolha, obtendo sucesso terapêutico. Podemos perceber que não somente os novos, mas também os antigos isolados demonstram valores elevados de CIM em relação ao itraconazol. Por isso, novos estudos são necessários para explorar mais profundamente a resistência das espécies de *Sporothrix* frente a este fármaco, já que a dispensação do mesmo tem sido frequente. Vale ressaltar que a resistência ao itraconazol já vem sendo descrita em todas as espécies do clado clinicamente relevante do gênero *Sporothrix*.

Em um estudo realizado por Vettorato *et al.* (2018), em Porto Alegre – Brasil, uma paciente do sexo feminino foi infectada por *S. schenckii s. str.* e teve como primeira opção de tratamento o itraconazol. No teste de susceptibilidade *in vitro*, observaram valores de CIM para este fármaco igual a 16,0 µg/mL, entretanto, a terapia não foi suspensa. Após 48 dias de tratamento, a paciente não demonstrou evolução clínica favorável, por esse motivo, o itraconazol foi substituído pela terbinafina na dosagem de 500 mg/dia, já que apresentou resultados satisfatórios *in vitro* (CIM= 0,25 µg/mL). Após 4 meses de tratamento a paciente evoluiu para cura clínica, sem recidiva da doença.

Já em um caso de infecção por *S. globosa* por via sapronótica em Minas Gerais – Brasil, o tratamento de escolha foi cetoconazol tópico e itraconazol 200 mg/dia ao longo de 2 anos, mas não demonstrou eficácia e evolução clínica favorável. Após a correta identificação do agente, a terapia inicial foi substituída pelo iodeto de potássio por 6 meses, evoluindo a cura (FISCHMAN *et al.*, 2012).

O desconhecimento da doença pela maioria da população e a ausência de medidas adequadas de controle no estado do Espírito Santo tem aumentado a possibilidade de atingir grupos populacionais em situação de vulnerabilidade, podendo evoluir para casos mais graves de esporotricose, bem como possíveis surtos. Dessa forma, nosso estudo contribuiu para uma melhor compreensão da evolução da história da doença no estado, aumentando o conhecimento científico sobre a biologia do fungo em nosso meio.

6. CONCLUSÃO

- A identificação por critérios morfológicos não é suficiente para a diferenciação de espécies pertencentes ao gênero *Sporothrix*, sendo a PCR espécie-específica resolutive para todas as identificações realizadas neste estudo.
- Os isolados de *S. brasiliensis* do Espírito Santo são predominantemente clonais e possivelmente derivam do estado do Rio de Janeiro.
- *Sporothrix brasiliensis* é responsável pela maioria dos casos de esporotricose humana e felina no estado do Espírito Santo. Em relação ao perfil epidemiológico dos pacientes inseridos no trabalho, concluímos que ele segue o padrão da esporotricose transmitida por felinos no Brasil.
- Existem rotas distintas de transmissão da esporotricose no Espírito Santo (sapronótica e zoonótica).
- Não há correlação entre as formas clínicas observadas no estudo e a diversidade genética intra e interespecífica encontrada entre os isolados de *Sporothrix*.
- A terbinafina demonstrou ser o antifúngico mais efetivo *in vitro*, apesar de ser raramente utilizada na prática clínica.
- Não há diferenças no perfil de susceptibilidade a antifúngicos *in vitro* entre os diferentes grupos genéticos observados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-PAES, Rodrigo *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**, v. 14, n. 3, p. 244, 2007.

ANTUNES, Tatiana de Ávila *et al.* Esporotricose cutânea experimental: Avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 706-710, 2009.

ARAUJO, Mariceli L. *et al.* Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. **Mycoses**, v. 58, n. 8, p. 485-490, 2015.

ARENAS, Roberto *et al.* Sporotrichosis: From KOH to Molecular Biology. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 62, 2018.

Arendrup, Maiken Cavling *et al.* EUCAST definitive document E. DEF 9.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentration for conidia forming moulds. **European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2015.

ARINELLI, Andrea *et al.* Ocular sporotrichosis: 26 cases with bulbar involvement in a hyperendemic area of zoonotic transmission. **Ocular immunology and inflammation**, v. 28, n. 5, p. 764-771, 2020.

BARROS, Monica Bastos de Lima *et al.* Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 455-460, 2010.

BARROS, Mônica Bastos de Lima *et al.* *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011.

BATISTA-DUHARTE, Alexander *et al.* Therapeutic and prophylactic tools for sporotrichosis: current strategies and future tendencies. In: **Sporotrichosis**. Springer, Cham, p. 147-177, 2015.

BELDA, Walter; DOMINGUES PASSERO, Luiz Felipe; STRADIOTO CASOLATO, Ana Thereza. Lymphocutaneous Sporotrichosis Refractory to First-Line Treatment. **Case Reports in Dermatological Medicine**, v. 2021, 2021.

BONIFAZ, Alexandro; TIRADO-SÁNCHEZ, Andrés. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.

BENTO, Aurélio *et al.* The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 8, p. e0009693, 2021.

BrCAST-EUCAST documento definitivo E. DEF 9.3.2 Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para fungos filamentosos formadores de conídios. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, 2020.

BERNARDES-ENGEMANN, A. R. *et al.* Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 43, n. 6, p. 487-493, 2005.

BOSCARATO, André Giarola *et al.* Esporotricose equina e hipotireoidismo iatrogênico. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1-6, 2016.

CABALLERO, Armando; GARCÍA-PEREIRA, María Jesús; QUESADA, Humberto. Genomic distribution of AFLP markers relative to gene locations for different eukaryotic species. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 528, 2013.

CABEZA, Elisa *et al.* Clinical and Epidemiological Characteristics of Sporotrichosis in a Reference Center of Uruguay. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 3, p. 322, 2022.

CALLENS, Steven FJ *et al.* Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child. **Journal of tropical pediatrics**, v. 52, n. 2, p. 144-146, 2005.

CAROLIS, Elena; POSTERARO, Brunella; SANGUINETTI, Maurizio. Old and New Insights into *Sporothrix schenckii* Complex Biology and Identification. **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 297, 2022.

CARVALHO, Jamile Ambrosio *et al.* Genome-wide mapping using new AFLP markers to explore intraspecific variation among pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 14, n. 7, p. e0008330, 2020.

CARVALHO, Jamile Ambrósio *et al.* A new duplex PCR assay for the rapid screening of *mating-type* idiomorphs of pathogenic *Sporothrix* species. **Fungal Biology**, 2021a.

CARVALHO, J. A. *et al.* Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. **Studies in Mycology**, v. 100, p. 100129, 2021b.

CASTELLANI, A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. p. 24:270-6, 1939.

CAUS, Antonio LO *et al.* Epidemiological and Clinical Aspects of Sporotrichosis in Espírito Santo State, Southeast Brazil: A Study of Three Decades (1982–2012). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 100, n. 3, p. 706-713, 2019.

CHAKRABARTI, Arunaloke *et al.* Global epidemiology of sporotrichosis. **Medical mycology**, v. 53, n. 1, p. 3-14, 2015.

CLSI. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2*. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, (2008).

COGNIALLI, Regielly Caroline Raimundo *et al.* UMA DÉCADA DE ESPOROTRICOSE DE TRANSMISSÃO FELINA (ETF) EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO DE CURITIBA, PARANÁ, BRASIL (2011-2021). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 26, p. 101727, 2022.

CRUZ BAHIANSE ROCHA, Isabela *et al.* Molecular-based assessment of diversity and population structure of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Espírito Santo-Brazil. **Mycoses**, v. 64, n. 4, p. 420-427, 2021.

DELLA TERRA, Paula Portella *et al.* Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 8, p. e0005903, 2017.

DELLA TERRA, Paula Portella *et al.* Development and evaluation of a multiplex qPCR assay for rapid diagnostics of emerging sporotrichosis. **Transboundary and emerging diseases**, 2021.

DÍAZ, Ismael A. Conti. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, n. 2, p. 113-116, 1989.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 10, p. e01057-17, 2017.

Espírito Santo (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. PORTARIA Nº 054-R, DE 31 DE MARÇO DE 2020. Acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação compulsória e dá outras providências.

Disponível em:
<<https://saude.es.gov.br/Media/sesa/coronavirus/Portarias/PORTARIA%20054-R%20-%20LISTA%20NACIONAL%20DOEN%C3%87AS%20DE%20NOTIFICA%C3%87%C3%83O%20COMPULS%C3%93RIA.pdf>> Acesso em: 05 jul. 2020.

ETCHECOPAZ, A. N. *et al.* Sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Argentina: Case report, molecular identification and in vitro susceptibility pattern to antifungal drugs. **Journal de mycologie medicale**, p. 100908, 2019.

ETCHECOPAZ, Alejandro *et al.* *Sporothrix brasiliensis*: a review of an emerging south american fungal pathogen, its related disease, presentation and spread in Argentina. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 3, p. 170, 2021.

EYER-SILVA, Walter A. *et al.* Palate ulcer, uvular destruction and nasal septal perforation caused by *Sporothrix brasiliensis* in an HIV-infected patient. **Medical mycology case reports**, v. 23, p. 16-19, 2019.

FALQUETO, Aloisio; BRAVIM MAIFREDE, Simone; ARAUJO RIBEIRO, Mariceli. Unusual clinical presentation of sporotrichosis in three members of one family. **International journal of dermatology**, v. 51, n. 4, p. 434-438, 2012.

FERNÁNDEZ, G.A; LÓPEZ, P. V. A. Mycosis and nocardiosis implantation: Sporotrichosis, Chromoblastomycosis, Mycetomas and Nocardiosis. Casuistics in the Central Laboratory of Public Health, Paraguay, period 1997-2019. **Revista del Nacional (Itaiguá)**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 2020.

FISCHMAN, O. *et al.* Atypical clinical presentation of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* resistant to intraconazole. In: **Mycoses**. 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL, p. 207-208, 2012.

FREITAS, Dayvison FS *et al.* Sporotrichosis in the central nervous system caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 4, p. 663-664, 2015.

GEORG, L. K. Details - Public Health Image Library (PHIL). 1964. Disponível em: <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=3063>. Acesso em: 05 jun. 2021.

Gerência De Doenças Transmitidas Por Vetores e Zoonoses – GDTVZ. Boletim Epidemiológico Esporotricose 001/2018. Rio de Janeiro, 18 de maio de 2018. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br>>. Acesso em: 19 nov. 2020.

Gerência De Doenças Transmitidas Por Vetores e Zoonoses – GDTVZ. Boletim Epidemiológico Esporotricose no Estado do Rio de Janeiro – Anos 2019 e 2020. Rio de Janeiro, 21 de abril de 2021. Disponível em: <<http://www.riocomsaude.rj.gov.br>>. Acesso em: 05 jun. 2021.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira *et al.* Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006077, 2017.

GUIMARÃES, Ticiano Machado; GUIMARÃES, André Barreto. Esporotricose felina: Relatos de caso. **PUBVET**, v. 16, p. 191, 2021.

HAN, Hock Siew; KANO, Rui. Feline sporotrichosis in Asia. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-10, 2020.

HU, Sindy *et al.* Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1414-1418, 2003.

KANO, Rui *et al.* *Sporothrix schenckii* (*sensu stricto* *S. globosa*) mating type 1-2 (MAT1-2) gene. **The Journal of dermatology**, v. 40, n. 9, p. 726-730, 2013.

KAUFFMAN, Carol A. Central nervous system infection with other endemic mycoses: rare manifestation of blastomycosis, paracoccidioidomycosis, talaromycosis, and sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 3, p. 64, 2019.

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual review of genetics**, v. 31, n. 1, p. 245-276, 1997.

LEGABÃO, Barbara Cipulo *et al.* The zoonosis sporotrichosis can be successfully treated by photodynamic therapy: a scoping review. **Acta Tropica**, p. 106341, 2022.

LI, Wenjun *et al.* Organization and evolutionary trajectory of the *mating type* (*MAT*) locus in dermatophyte and dimorphic fungal pathogens. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 1, p. 46-58, 2010.

LOPES-BEZERRA, Leila M.; SCHUBACH, Armando; COSTA, Rosane O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 78, n. 2, p. 293-308, 2006.

LOPES-BEZERRA, Leila M. *et al.* Sporotrichosis between 1898 and 2017: The evolution of knowledge on a changeable disease and on emerging etiological agents. **Medical mycology**, v. 56, n. suppl_1, p. S126-S143, 2018.

LUTZ, Adolpho; SPLENDORE, Alfonso. Sobre uma micose observada em homens e ratos: Contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Revista Médica de São Paulo**, v. 21, p. 443-450, 1907.

MACEDO, P. M. *et al.* New posology of potassium iodide for the treatment of cutaneous sporotrichosis: study of efficacy and safety in 102 patients. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 4, p. 719-724, 2015.

MACHADO, Ana Caroline de Sá. **Susceptibilidade a antifúngicos de isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de gatos do Rio de Janeiro**. Tese de Doutorado. 2015.

MADRID, Isabel Martins *et al.* Esporotricose canina: relato de três casos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 1, p. 105-108, 2007.

MADRID, Hugo *et al.* *Sporothrix globosa*, a pathogenic fungus with widespread geographical distribution. **Revista iberoamericana de micologia**, v. 26, n. 3, p. 218-222, 2009.

MAHAJAN, Vikram K. Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. **Dermatology research and practice**, v. 2014, 2014.

MAKRI, Nikoleta *et al.* First case report of cutaneous sporotrichosis (*Sporothrix* species) in a cat in the UK. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 6, n. 1, p. 2055116920906001, 2020.

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

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

MARIMON, Rita *et al.* In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 732-734, 2008.

MASCHIO-LIMA, Taiza *et al.* Clinical and epidemiological aspects of feline sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* and in vitro antifungal susceptibility. **Veterinary Research Communications**, v. 45, n. 4, p. 171-179, 2021.

MIALSKI, Rafael *et al.* Chronic meningitis and hydrocephalus due to *Sporothrix brasiliensis* in immunocompetent adults: a challenging entity. **Open forum infectious diseases**. Oxford University Press, p. ofy081, 2018

MONTEIRO, Maria Candida *et al.* Could the determination of *Aspergillus fumigatus* mating type have prognostic value in invasive aspergillosis?. **Mycoses**, v. 61, n. 3, p. 172-178, 2018.

MORGADO, Debora Salgado *et al.* Global distribution of animal sporotrichosis: a systematic review of *Sporothrix* sp. identified using molecular tools. **Current Research in Microbial Sciences**, p. 100140, 2022.

NAKASU, Ceres Cristina Tempel *et al.* Feline sporotrichosis: a case series of itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 163-171, 2021.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista *et al.* Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v. 172, n. 4, p. 257-267, 2011.

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**, v. 114, 2019.

OROFINO-COSTA, Rosane *et al.* Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 92, n. 5, p. 606-620, 2017.

OSTAFIŃSKA, Agnieszka *et al.* Six new species of *Sporothrix* from hardwood trees in Poland. **MycoKeys**, v. 82, p. 1, 2021.

PAIXÃO, Ariane Gomes *et al.* The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS. **AIDS research and therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2015.

POESTER, Vanice Rodrigues et al. Treatment of Human Sporotrichosis Caused by *Sporothrix brasiliensis*. **Journal of Fungi**, v. 8, n. 1, p. 70, 2022.

RABELLO, Vanessa Brito Souza et al. The Historical Burden of Sporotrichosis in Brazil: a Systematic Review of Cases Reported from 1907 to 2020. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1-14, 2021.

RANGEL-GAMBOA, Lucía et al. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. **Sabouraudia**, v. 54, n. 3, p. 248-255, 2015.

REDIGUIERI, Bruno Carneiro et al. Clinical, Epidemiological, and Epizootic Features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil. **EcoHealth**, p. 1-11, 2022.

REIS, Érica Guerino dos. **Avaliação da resposta terapêutica ao iodeto de potássio na esporotricose felina**. Tese de Doutorado. 2011.

RESTREPO, Carlos M.; LLANES, Alejandro; LLEONART, Ricardo. Use of AFLP for the study of eukaryotic pathogens affecting humans. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 63, p. 360-369, 2018.

Rio de Janeiro (Estado). Secretaria de Estado de Saúde. Resolução SES nº 674 de 12 de julho de 2013. Redefine a relação de doenças e agravos de notificação compulsória no âmbito estadual. Publicado no DOE em 16 de julho de 2013. Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/4364979/4115670/ResolucaoSESN674DE12.07.2013.pdf>>. Acesso em: 05 jun. 2021.

ROBERTO, T. N. et al. Exploring genetic diversity, population structure, and phylogeography in *Paracoccidioides* species using AFLP markers. **Studies in mycology**, v. 100, p. 100131, 2021.

RODRIGUES, Anderson Messias. **Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii***. Tese de Doutorado. 2010.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. **Medical Mycology**, v. 51, n. 4, p. 405-412, 2013.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging microbes & infections**, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2014.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Molecular diagnosis of pathogenic *Sporothrix* species. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 12, p. e0004190, 2015a.

RODRIGUES, Anderson M. *et al.* Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 1385, 2015b.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 7, 2016.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. **Mycopathologia**, p. 1-30, 2020a.

RODRIGUES, Anderson Messias *et al.* The global epidemiology of emerging *Histoplasma* species in recent years. **Studies in Mycology**, v. 97, p. 100095, 2020b.

ROSA, C. S. *et al.* Sporotrichosis therapy. **Science and Animal Health**, v. 5, n. 3, p. 212-228, 2017.

ROSENDAHL, S.; TAYLOR, J. W. Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP™. **Molecular ecology**, v. 6, n. 9, p. 821-829, 1997.

ROSSOW, John 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**, v. 6, n. 4, p. 247, 2020.

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

SANDHU, K.; GUPTA, S. Potassium iodide remains the most effective therapy for cutaneous sporotrichosis. **Journal of dermatological treatment**, v. 14, n. 4, p. 200-202, 2003.

SILVA-VERGARA, Mario Leon et al. Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endo-cardial and ocular involvement in an HIV-infected patient: Case report. **Mycoses**, 2012.

SONG, Y. et al. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 27, n. 3, p. 313-318, 2013.

STOPIGLIA, Cheila Denise Ottonelli et al. Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. **Journal of basic microbiology**, v. 54, n. 6, p. 578-584, 2014.

TEIXEIRA, Marcus M. et al. Comparative genomics of the major fungal agents of human and animal Sporotrichosis: *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-22, 2014.

TEIXEIRA, Marcus et al. Asexual propagation of a virulent clone complex in a human and feline outbreak of Sporotrichosis. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 2, p. 158-169, 2015.

TURGEON, B. Gillian *et al.* Proposed nomenclature for mating type genes of filamentous ascomycetes. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 1, p. 1-5, 2000.

VEASEY, John Verrinder *et al.* Epidemiological and geographical distribution profile of urban sporotrichosis in the city of São Paulo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 97, p. 228-230, 2022.

VETTORATO, Rodrigo *et al.* Sporotrichosis by *Sporothrix schenckii* sensu stricto with itraconazole resistance and terbinafine sensitivity observed *in vitro* and *in vivo*: case report. **Medical mycology case reports**, v. 19, p. 18-20, 2018.

VOS, Pieter *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic acids research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.

WALLER, Stefanie Bressan *et al.* Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 73-80, 2021.

WILSON, Andi M. *et al.* Pheromone expression reveals putative mechanism of unisexuality in a saprobic ascomycete fungus. **PloS one**, v. 13, n. 3, p. e0192517, 2018.

XU, Wenqi *et al.* The influence of the mating type on virulence of *Mucor irregularis*. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

XUE, Siliang *et al.* Oral potassium iodide for the treatment of sporotrichosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 2009.

ZHANG, Y. *et al.* Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 35, n. 1, p. 1-20, 2015.

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

ZHANG, Mingrui *et al.* Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction for fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*. **Medical Mycology**, v. 58, n. 1, p. 61-65, 2020.

ZHAO, Lipei *et al.* Genetic variation of *Sporothrix globosa* isolates from diverse geographic and clinical origins in China. **Emerging microbes & infections**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2017.



Universidade Federal
do Espírito Santo



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SPOROTHRIX SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO** Registrada sob o n.º 14/2020 sob a responsabilidade de **SARAH GONÇALVES TAVARES**

que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (excreto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 167.6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia 06 de novembro de 2020.

Vigência da autorização: novembro/2020 a outubro/2024

Finalidade: Pesquisa

Espécie(s): Gatos (*Felis catus*)

Linhagem(ns)/raça(s): Sem especificação

Peso: Acima de 300 gramas

Idade: Acima de 1 mês

Sexo: Ambos

Número de animais: 383

Origem: Estado do Espírito Santo (Centro de Controle de Zoonoses/CCZ ou domicílio de tutores)

Vitória-ES, 09 de novembro de 2020

Raquel Spinassé Dettrogni

Vice-coordenadora da CEUA-UFES

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

Avenida Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória/ES – CEP 29043-910 - Telefone: (27) 33335-7026 – ceua@ufes.br – www.ceua.ufes.br

ANEXOS

Anexo I – Comitê de ética no uso de animais

“Identificação polifásica e diversidade genética de *Sporothrix* spp. isolados de humanos e felinos no estado do Espírito Santo”.

Anexo II – Comitê de ética em humanos

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SPOROTHRIX SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO

Pesquisador: SARAH GONCALVES TAVARES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 31080020.3.0000.5060

Instituição Proponente: Centro de Ciências da Saúde

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.032.820

Apresentação do Projeto:

O projeto vai tratar da IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SPOROTHRIX SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO.

Serão utilizadas amostras biológicas de pacientes atendidos no Ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) de pacientes atendidos no Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes (HUCAM), no período de junho de 2020 a março de 2021. As amostras serão semeadas em Ágar Sabouraud Dextrose (DAS) e enviadas para o Centro de Investigações em Micologia Médica (CIMM)/UFES, onde serão identificadas mediante crescimento e isolamento do fungo.

Objetivo da Pesquisa:

Segundo o pesquisador responsável, os objetivos da pesquisa são:

"Objetivo Primário:

O presente estudo tem como objetivos principais identificar as espécies de *Sporothrix* no estado do Espírito Santo aplicando a abordagem polifásica (características fenotípicas e moleculares), assim como avaliar a diversidade genética dos isolados.

Objetivos Secundários:

1) Verificar a distribuição geográfica e a prevalência das espécies de *Sporothrix* provenientes de

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.032.820

isolados humanos incluídos no estudo.

2) Analisar a diversidade genética dos isolados de *Sporothrix* incluídos no estudo utilizando marcadores de AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado), a fim de verificar rotas de transmissão, variabilidade intra e interespecífica entre isolados de humanos.

3) Correlacionar a diversidade intraespecífica dos isolados de *Sporothrix* com as formas clínicas dos pacientes envolvidos no estudo.

4) Determinar por meio de PCR os idiomorfos sexuais em *Sporothrix* (i.e. MAT1-1 e MAT1-2) e relacionar com as diferentes estruturas populacionais destes patógenos durante surtos e epidemias.

5) Traçar o perfil de susceptibilidade a antifúngico in vitro dos isolados de *Sporothrix* frente a itraconazol, posaconazol, terbinafina e anfotericina B e verificar se há correlação com os perfis genéticos gerados pela técnica de AFLP."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com SARAH GONCALVES TAVARES, os riscos e benefícios do projeto IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE *SPOROTHRIX* SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO são:

" Riscos:

O procedimento de coleta do material a ser analisado será realizado com o auxílio de um swab estéril, objeto sem superfície de corte, não invasivo. Nos casos de coleta com swab (instrumento com algodão na ponta parecido com cotonete) pode haver um discreto desconforto, assim como o risco de gerar medo e ansiedade que serão diminuídos também pelo atendimento por pesquisador treinado e acompanhado pelo coordenador e orientador da pesquisa. Por outro lado, o risco referente à exposição do nome do voluntário se resolve com a assinatura do termo de sigilo e responsabilidade da não exposição das identidades dos voluntários assinados pelos coordenadores responsáveis pela pesquisa.

Benefícios:

Esse estudo contribui para o bem-estar e saúde do paciente, pois permite que a doença seja diagnosticada de forma correta e que seja feita a identificação da espécie de *Sporothrix* spp. que lhe está causando a patologia, auxiliando no tratamento a ser seguido. Mediante o quadro de resistência ao tratamento, facilitará o replanejamento de nova abordagem terapêutica"

Os riscos e benefícios estão de acordo com a Res. CNS N° 466/12.

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Página 02 de 04

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.032.820

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

No projeto IDENTIFICAÇÃO POLIFÁSICA E DIVERSIDADE GENÉTICA DE SPOROTHRIX SPP. ISOLADOS DE HUMANOS E FELINOS NO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO do pesquisador SARAH GONCALVES TAVARES constam os seguintes documentos:

Folha de rosto: apresentada

Projeto detalhado: apresentado

TCLE: apresentado

Termo de Sigilo e Confidencialidade: apresentado

Termo de anuência da instituição onde a pesquisa será realizada: apresentado

Biorrepositório: apresentado

Cronograma: apresentado

Orçamento: apresentado

Recomendações:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--|---|------------------------|-------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1526823.pdf | 15/05/2020 16:38:58 | | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | anuenciahucam.pdf | 15/05/2020 16:38:21 | SARAH GONCALVES TAVARES | Aceito |
| Cronograma | Cronogramacorrigido.pdf | 14/05/2020 11:53:39 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projetodetalhadocorrigido.pdf | 14/05/2020 11:53:03 | SARAH GONCALVES TAVARES | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de | TCLECORRIGIDO.pdf | 14/05/2020 11:52:40 | SARAH GONCALVES TAVARES | Aceito |

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

UF: ES

Telefone: (27)3335-7211

Município: VITORIA

CEP: 29.040-091

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

UFES - CENTRO DE CIÊNCIAS
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO



Continuação do Parecer: 4.032.820

| | | | | |
|---|--|------------------------|-------------------------------|--------|
| Ausência | TCLECORRIGIDO.pdf | 14/05/2020 11:52:40 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Folha de Rosto | folhaDeRostoc.pdf | 23/04/2020 20:35:03 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | AnuenciaFalqueto.pdf | 23/04/2020 20:33:35 | SARAH GONCALVES TAVARES | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TermoSCFalqueto.pdf | 23/04/2020 20:30:41 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE_IS ABELA.pdf | 22/04/2020 17:02:31 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | TERMO_DE_CONFIDENCIALIDADE_S ARAH.pdf | 22/04/2020 17:00:18 | SARAH GONCALVES | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Biorepositorio.pdf | 22/04/2020 16:56:37 | SARAH GONCALVES TAVARES | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

VITORIA, 18 de Maio de 2020

Assinado por:

Maria Helena Monteiro de Barros Miotto
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Marechal Campos 1468

Bairro: S/N

CEP: 29.040-091

UF: ES

Município: VITORIA

Telefone: (27)3335-7211

E-mail: cep.ufes@hotmail.com

Anexo III – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo (n=132) de acordo com a região e município de origem (continua).

| Código | Espécie | Mating-type | Região | Município | Ano isolamento |
|---------------|------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| B 01 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Sudoeste Serrana | Afonso Cláudio | 2016 |
| B 02 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Caparaó | Ibatiba | 2016 |
| B 09 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-1</i> | Sudoeste Serrana | Venda N. do Imigrante | 2016 |
| B 37 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-1</i> | Metropolitana | Guarapari | 2016 |
| B 116 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Central Serrana | Santa Maria de Jetibá | 2017 |
| B 118 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-1</i> | Litoral Sul | Iconha | 2017 |
| B 119 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-1</i> | Sudoeste Serrana | Domingos Martins | 2017 |
| B 120 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | 2017 |
| B 121 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Sudoeste Serrana | Domingos Martins | 2017 |
| B 129 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2017 |
| B 130 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2017 |
| B 142 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Sudoeste Serrana | Afonso Cláudio | 2018 |
| B 144 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Iconha | 2018 |
| B 149 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 151 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Rio Doce | Ibiraçu | 2018 |
| B 153 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Anchieta | 2018 |
| B 159 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Sudoeste Serrana | Domingos Martins | 2018 |
| B 162 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 163 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 167 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-1</i> | Caparaó | Iúna | 2018 |
| B 168 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-1</i> | Sudoeste Serrana | Venda N. do Imigrante | 2018 |
| B 176 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 179 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 180 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-1</i> | Sudoeste Serrana | Venda N. do Imigrante | 2018 |
| B 181 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 182 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Litoral Sul | Anchieta | 2018 |
| B 192 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 195 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 196 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 197 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Guarapari | 2018 |
| B 199 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 200 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-1</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 211 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Central Sul | Muqui | 2018 |
| B 212 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | 2018 |
| B 213 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 214 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 215 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2018 |
| B 216 | <i>S. schenckii</i> | <i>MAT1-2</i> | Rio Doce | Ibiraçu | 2018 |
| B 219 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Cariacica | 2018 |
| B 238 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 239 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |

Anexo III – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo (n=132) de acordo com a região e município de origem (continuação).

| Código | Espécie | Mating-type | Região | Município | Ano isolamento |
|---------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| B 240 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 241 | <i>S. schenckii</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 242 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 243 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 244 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 245 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2019 |
| B 246 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Guarapari | 2019 |
| B 247 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 249 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 250 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 253 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 255 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 333 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 335 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Guarapari | 2019 |
| B 336 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 337 | <i>S. schenckii</i> | MAT1-1 | Sudoeste Serrana | Laranja da Terra | 2019 |
| C 477 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 338 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 339 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 340 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 341 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Central Sul | Mimoso do Sul | 2019 |
| B 342 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-1 | Centro-Oeste | Gov. Lindenberg | 2019 |
| B 343 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 344 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 345 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 346 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Guarapari | 2019 |
| B 347 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 348 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Litoral Sul | Anchieta | 2019 |
| B 349 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 350 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2019 |
| B 351 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Guarapari | 2019 |
| B 352 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2019 |
| B 439 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 440 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2019 |
| B 441 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2019 |
| B 442 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2019 |
| B 443 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Rio Doce | Aracruz | 2019 |
| B 460 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-1 | Sudoeste Serrana | Afonso Cláudio | 2019 |
| B 462 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2019 |
| B 463 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 464 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |

Anexo III – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo (n=132) de acordo com a região e município de origem (continuação).

| Código | Espécie | Mating-type | Região | Município | Ano isolamento |
|---------------|------------------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| B 465 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Rio Doce | Aracruz | 2020 |
| B 493 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 494 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-1 | Metropolitana | Guarapari | 2020 |
| B 495 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 496 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 497 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Guarapari | 2020 |
| B 498 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2020 |
| B 499 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 501 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 502 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 503 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-1 | Nordeste | São Mateus | 2020 |
| B 504 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 513 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 514 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 515 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 516 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 517 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 518 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 519 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 520 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Central Sul | Muqui | 2020 |
| B 521 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 522 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2020 |
| B 524 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 525 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 526 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 527 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Sudoeste Serrana | Afonso Cláudio | 2020 |
| B 528 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2020 |
| B 529 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 530 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2020 |
| B 531 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 532 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vitória | 2020 |
| B 533 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Viana | 2020 |
| B 535 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Rio Doce | Ibiraçu | 2020 |
| B 536 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2020 |
| B 537 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 538 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Central Serrana | Santa Teresa | 2020 |
| B 539 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Cariacica | 2020 |
| B 540 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 541 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2020 |
| B 542 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 543 | <i>S. brasiliensis</i> | MAT1-2 | Metropolitana | Serra | 2020 |

Anexo III – Distribuição geográfica dos casos de esporotricose humana incluídos no estudo (n=132) de acordo com a região e município de origem (conclusão).

| Código | Espécie | Mating-type | Região | Município | Ano isolamento |
|---------------|------------------------|--------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|
| B 544 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2020 |
| B 547 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Rio Doce | Aracruz | 2020 |
| B 552 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Viana | 2021 |
| B 553 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2021 |
| B 554 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2021 |
| B 555 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | 2021 |
| B 558 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Sudoeste Serrana | Venda N. do Imigrante | 2021 |
| B 559 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vitória | 2021 |
| B 603 | <i>S. brasiliensis</i> | <i>MAT1-2</i> | Metropolitana | Vila Velha | 2021 |

Anexo IV – Produções científicas durante o período de mestrado



Received: 15 October 2020 | Revised: 10 December 2020 | Accepted: 12 December 2020

DOI: 10.1111/myc.13230

ORIGINAL ARTICLE

mycoses WILEY

Molecular-based assessment of diversity and population structure of *Sporothrix* spp. clinical isolates from Espírito Santo-BrazilIsabela da Cruz Bahiense Rocha¹ | Paula Portella Della Terra² |
Rodrigo Cardoso de Oliveira³ | Raphael Lubianca Zanotti⁴ | Aloísio Falqueto^{1,4} |
Zoiilo Pires de Camargo² | Anderson Messias Rodrigues² | Sarah Santos Gonçalves¹¹Infectious Diseases Postgraduate Program, Center for Research in Medical Mycology, Federal University of Espírito Santo (UFES), Espírito Santo, Brazil²Laboratory of Emerging Fungal Pathogens, Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Discipline of Cellular Biology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil³Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico⁴Cassiano Antônio Moraes University Hospital (HUCAM), UFES, Espírito Santo, Brazil

Correspondence

Sarah S. Gonçalves, Center for Research in Medical Mycology (CIMM), Department of Pathology, Federal University of Espírito Santo-UFES, 1468, Marechal Campos Avenue, Vitória-ES, CEP 29.040-090, Brazil.

Funding information

São Paulo Research Foundation, Grant/Award Number: FAPESP 2017/27265-5; the National Council for Scientific and Technological Development, Grant/Award Number: CNPq 433276/2018-5; Federal University of Espírito Santo (UFES)

Abstract

Background: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by *Sporothrix* species that affects humans and animals. Little information on the genetic diversity and population structure of the pathogen is available for Brazil, which is needed to design effective strategies to tackle the advance of sporotrichosis in endemic areas.**Objectives:** We assessed the genetic diversity and mating-type distribution of *Sporothrix* isolates recovered from human and feline cases of sporotrichosis in Espírito Santo-Brazil to better understand the population structure, epidemiology and diversification of this pathogen, as well as to explore the possible routes of transmission involved in the ongoing outbreaks.**Methods:** In all, 75 *Sporothrix* isolates were identified with phenotypic characteristics. Then, fungal DNA extraction was performed, and the species-specific PCR technique was applied, using markers directed to the calmodulin gene. The mating-type idiomorph of species was identified by PCR using primers targeting the MAT1-1 and MAT1-2 loci.**Results:** Among the 75 *Sporothrix* isolates, 76% were confirmed as *S. brasiliensis* and 24% as *S. schenckii sensu stricto*. *S. brasiliensis* was more prevalent in the metropolitan area and *S. schenckii s. str.* in the mountainous region of the state. In both species, the presence of the two sexual idiomorphs was detected, suggesting that they are heterothallic species.**Conclusions:** Our data suggest that sporotrichosis takes on an epidemic-urban character involving *S. brasiliensis*. This species in Espírito Santo is likely to originate from Rio de Janeiro, as most isolates harbour the same MAT 1-2 locus. We confirm that *S. brasiliensis* has significantly broadened its area of occurrence, an essential feature of emerging pathogens.

KEYWORDS

epidemiology, identification, *Sporothrix schenckii*, Sporotrichosis



Note

Paracoccidioidomycosis due to *Paracoccidioides brasiliensis* S1 associated with acquired immunodeficiency syndrome: A case report



Paulo Mendes Peçanha^a, Isabela Cruz Bahiense^a, Wdson Luis Lima Kruschewsky^a, Cláudia Biasutti^b, Carlos Urbano Gonçalves Ferreira Júnior^b, Breno Gonçalves Pinheiro^c, Simone Bravim Maifrede^a, Zoilo Pires de Camargo^c, Anderson Messias Rodrigues^c, Tânia Regina Grão-Velloso^a, Aloisio Falqueto^a, Sarah Santos Gonçalves^{a,*}

^a Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, Brazil

^b Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes-UFES, Brazil

^c Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 June 2020

Accepted 14 September 2020

Available online 13 December 2020

Keywords:

Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioides brasiliensis S1

Co-infection

HIV

ABSTRACT

Background: Paracoccidioidomycosis (PCM) is an endemic disease in Latin America. In immunocompetent hosts, PCM occurs in two main clinical forms: acute and chronic. However, in HIV-infected patients PCM may show up simultaneous manifestations of acute and chronic forms.

Case report: We present the case of a patient diagnosed with HIV who had disseminated skin lesions and generalized lymphadenopathy, as well as respiratory and central nervous system involvement. The PCM diagnosis was confirmed by direct KOH examination, double immunodiffusion and the isolation of the fungus in samples of an abscess in the subcostal region. The isolate was identified as *Paracoccidioides brasiliensis* S1 by species-specific PCR using primers for protein-coding gene *GP43* (exon 2) followed by PCR-RFLP of the alpha-tubulin gene.

Conclusions: There are few data in literature reporting species-specific molecular identification of *Paracoccidioides* in HIV/PCM patients. Therefore, this case report may contribute to improve the knowledge about this severe disease, its causative cryptic species, and its consequences to patients.

© 2020 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Paracoccidioidomycosis por *Paracoccidioides brasiliensis* S1 asociado al síndrome de inmunodeficiencia adquirida: A propósito de un caso

RESUMEN

Antecedentes: La paracoccidioidomycosis (PCM) es una enfermedad endémica en Latinoamérica. En los pacientes inmunocompetentes, la PCM cursa con dos principales formas: aguda y crónica. Sin embargo, los pacientes infectados por el VIH pueden presentar manifestaciones simultáneas de las dos formas clínicas.

Caso clínico: Se presenta el caso de un paciente VIH-positivo, con lesiones cutáneas diseminadas, linfadenopatía generalizada y afectación del sistema nervioso central y respiratorio. El diagnóstico de PCM se confirmó mediante un examen directo con KOH, doble inmunodifusión y el aislamiento del hongo en cultivo, a partir de muestras de un absceso en la región subcostal. La cepa aislada se identificó como *Paracoccidioides brasiliensis* S1 mediante PCR especie-específica del gen codificador de la proteína GP43 (exón 2), seguida de PCR-RFLP del gen de la alfa-tubulina.

Palabras clave:

Paracoccidioidomycosis

Paracoccidioides brasiliensis S1

Coinfección

VIH

* Corresponding author.

E-mail address: sarah.tavares@ufes.br (S.S. Gonçalves).

<https://doi.org/10.1016/j.riam.2020.09.003>

1130-1406/© 2020 Asociación Española de Micología. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Original Contribution

Clinical, Epidemiological, and Epizootic Features of *Sporothrix brasiliensis* in Espírito Santo, Brazil

Bruno Carneiro Redigueri,¹ Isabela da Cruz Bahiense,¹ Jamile Ambrósio de Carvalho,² Gustavo Rocha Leite,¹ Aloísio Falqueto,¹ Anderson Messias Rodrigues,² and Sarah Santos Gonçalves¹

¹Department of Pathology, Center for Research in Medical Mycology (CIMM), Federal University of Espírito Santo - UFES, 1468, Marechal Campos Avenue, Vitória, Espírito Santo CEP 29.040-090, Brazil

²Laboratory of Emerging Fungal Pathogens, Department of Microbiology, Immunology, and Parasitology, Discipline of Cellular Biology, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo CEP 04.023-062, Brazil

Abstract: We verified the clinical–epidemiological, microbiological, and molecular aspects of feline sporotrichosis in Espírito Santo, Brazil, as well as demonstrated the degree of reliability of the cytopathological examination in diagnosis, when compared to fungal culture. From March 2019 to April 2020, 154 suspicious cats were evaluated by collecting data and biological samples. The Cohen’s kappa coefficient and the Chi-square independence defined the degree of agreement and the accuracy parameters, respectively. The inter-observer agreement was high (*Kappa* coefficient = 0.96). Sensitivity, specificity, predictive (positive and negative), and accuracy values were 95.0, 97.0, 99.1, 84.2, and 95.5%, respectively. All isolates evaluated were identified as *Sporothrix brasiliensis* by species-specific PCR. A digital image bank (Padlet) was created with different types of clinical forms and positive slide profiles. We concluded that the cytopathological technique used demonstrated a high degree of reliability. We report an overwhelming occurrence of *S. brasiliensis* during epizooties in ES.

Keywords: Sporotrichosis, *Sporothrix*, ES, Feline, Panoptic, PCR species specific

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a cosmopolitan implantation mycosis caused by *Sporothrix schenckii* and related species, included in this genus. It mainly affects human’s skin and subcutaneous tissue and other homeothermic animals, especially cats (Rodrigues et al. 2015). The first human case was de-

scribed in 1898 by Benjamin Schenck in Baltimore, USA (Espinel-Ingróff 1996).

Considered the most important species of the genus, *S. schenckii* is a saprophytic thermodimorphic fungus naturally found as filamentous fungi in plants, soil, wood, decaying organic matter, and animal excreta, at 25–30 °C, or incubated at this temperature. Differently, at 35–37 °C, in vitro or infecting humans and animals, the microorganism changes to its parasitic yeast form (Kauffman 1999; Lopes-Bezerra et al. 2006; Rodrigues et al. 2018).

Traditionally, sporotrichosis has a classical sapronotic route of transmission characterized by traumatic implan-

Supplementary Information: The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10393-022-01578-8>.

Correspondence to: Sarah Santos Gonçalves, e-mail: sarah.tavares@ufes.br

Published online: 21 February 2022