



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

CLÁUDIA ELISE FERRAZ SILVA

ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO:
apresentação clínica, identificação e sensibilidade das espécies,
avaliação dos testes diagnósticos e resposta terapêutica

Recife - PE
2018

CLÁUDIA ELISE FERRAZ SILVA

**ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO:
apresentação clínica, identificação e sensibilidade das espécies,
avaliação dos testes diagnósticos e resposta terapêutica**

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

Área de concentração: Medicina Tropical.

Orientadora: Prof.: Dra. Vera Magalhães

Coorientador: Prof.: Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto

Recife - PE
2018

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Cláudia Elise Ferraz.
Esporotricose humana em Pernambuco: apresentação clínica, identificação e sensibilidade das espécies, avaliação dos testes diagnósticos e resposta terapêutica / Cláudia Elise Ferraz Silva. – 2018.
196 f.: il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientadora: Vera Magalhães da Silveira.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2018.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Esporotricose. 2. Sporothrix. 3. Surto. 4. Diagnóstico. 5. Brasil. I. Silveira, Vera Magalhães da (Orientadora). II. Título.

618.9 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2019-025)

CLÁUDIA ELISE FERRAZ SILVA

ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO: apresentação clínica, identificação e sensibilidade das espécies, avaliação dos testes diagnósticos e resposta terapêutica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito final para a obtenção do título de Doutora em Medicina Tropical.
Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 30/08/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Rejane Pereira Neves (Presidente da Banca/Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Angela Cristina Rapela Medeiros (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof^a. Dr^a. Márcia Almeida Galvão Teixeira (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof^a. Dr^a. Silvana Maria de Moraes Cavalcanti (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof^a. Dr^a. Matilde Campos Carréra (Examinadora Externa)
Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP)

Dedico este trabalho a meus pais que me ensinaram o valor do conhecimento; ao meu esposo Gilson pelo incentivo, amor e toda dedicação à família; aos meus filhos Heitor e Miguel, para que no futuro compreendam que a dedicação abre portas e nos torna melhores pro mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que me confiaram o cuidado de sua saúde, aceitaram participar deste estudo e ainda contribuíram para o meu engrandecimento.

À Prof^a. Vera Magalhães por ter me acolhido como orientanda, pelo incentivo constante e intervenções sempre sensatas, objetivas e pertinentes.

Ao Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, pelo apoio desde a ideia do projeto envolvendo a micologia até o suporte laboratorial e orientações da pesquisa.

Ao colega Carlos Tibúrcio Valeriano, por toda a parceria e prontidão na coleta dos exames dos pacientes, avaliação de exames micológicos e identificação molecular.

A todos que fazem parte da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, principalmente na pessoa do Prof. Luiz Gonzaga de Castro, pelo apoio e estímulo incessantes.

Aos amigos e colegas dermatologistas da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da UFPE, pela compreensão e apoio incontestáveis, mesmo na sobrecarga de atendimentos.

Aos residentes de Dermatologia, pelo apoio na coleta de dados e por abraçarem o nosso ambulatório especializado de Esporotricose com muita dedicação e eficiência.

A meus preceptores e professores, que tanto contribuíram na formação da médica que sou hoje, especialmente na pessoa do Prof. Josemir Belo, grande professor, incentivador e amante do estudo dos fungos e da Dermatologia.

Ao setor de Patologia do Hospital das Clínicas da UFPE, especialmente na pessoa de Dra Daniela Takano, pelas análises histopatológicas dos nossos pacientes.

Ao Laboratório de Micologia Médica do Centro de Ciências Biológicas da UFPE, na pessoa de Prof. Rejane Pereira Neves, pelo suporte laboratorial para realização dos exames micológicos.

À Plataforma de Sequenciamento do Departamento de Genética da UFPE pela infraestrutura para a execução da análise genômica.

Ao professor Edmilson Mazza, pela disponibilidade e análise estatística do material.

Aos professores da Pós-Graduação em Medicina Tropical, doutores e pesquisadores, pelo conhecimento transmitido.

À minha família, pela compreensão pelos momentos de ausência, estresse e reclusão.

Ao meu amor, Gilson, por tudo. Não cheguei aqui sozinha.

'Quem leva a vida sou eu.' (LENINE, 2015).

RESUMO

A esporotricose é uma doença infecciosa causada por fungos do Complexo *Sporothrix*, sendo considerada uma doença emergente, em várias regiões do Brasil, principalmente sob a forma de epidemias e surtos zoonótico. O trabalho tem o objetivo de determinar as características clínicas, epidemiológicas, a eficiência dos testes diagnósticos e a resposta terapêutica dos casos de esporotricose humana em Pernambuco, Nordeste do Brasil, diagnosticados no período de março de 2017 a março de 2018, além de identificar genotipicamente as espécies e sua susceptibilidade antifúngica. Trata-se de estudo transversal aninhado à coorte prospectiva com 98 pacientes com esporotricose atendidos no ambulatório especializado de hospital universitário no Nordeste do Brasil. Os casos de esporotricose predominaram no sexo feminino (73,5%). A forma linfocutânea representou 67,3% dos casos e a cutânea fixa, 27,6%. Contato com gatos em domicílio foi relatado em 77,6% dos casos, e trauma com felinos sabidamente doentes relatada em 81,6,7%. Manifestações de hipersensibilidade ocorreram em 25,5% dos casos. O tempo médio de doença até o diagnóstico foi de 41,8 dias. Itraconazol foi introduzido em 92,9% dos casos, com tempo médio de tratamento de 18,7 semanas, sendo menor naqueles com reações de hipersensibilidade. Houve maior positividade da cultura a partir dos fragmentos de pele do que dos exsudatos (61% x 24%, respectivamente). A concordância entre os exames micológicos, considerando-se os diferentes espécimes, foi baixa na análise da cultura ($K=0,19$, IC 95% 0,04 a 0,34) e razoável do exame direto ($K=0,27$, IC 95% de 0,10 a 0,44), demonstrando que a obtenção tanto de fragmento de lesão quanto da secreção para exame micológico agrega sensibilidade ao diagnóstico. A identificação molecular de 26 isolados, baseada no sequenciamento parcial do gene da calmodulina, revelou a presença do *S. brasiliensis* em 90,9%. Foi demonstrada alta eficácia da terbinafina e do itraconazol, *in vitro*. O surto de esporotricose humana em Pernambuco tem caráter zoonótico, afeta mais mulheres sob a forma linfocutânea da doença, sendo acompanhado de uma alta frequência de manifestações de hipersensibilidade e resposta favorável ao itraconazol. A obtenção de mais de um espécime clínico para exame micológico agregou sensibilidade ao diagnóstico. O *S. brasiliensis* parece ser responsável pela grande maioria dos casos, o que pode justificar os quadros atípicos da doença. *In vitro*, a terbinafina e o itraconazol demonstraram alta eficácia contra os isolados de *Sporothrix*, informação relevante para abordagem terapêutica na região.

Palavras-chave: Esporotricose. *Sporothrix*. Surto. Diagnóstico. Brasil.

ABSTRACT

Sporotrichosis is an infectious disease caused by fungi of the *Sporothrix* Complex, being considered an emerging disease, in several regions of Brazil, mainly in the form of epidemics and zoonotic outbreaks. This study has objective to determine the clinical and epidemiological characteristics, the efficiency of diagnostic tests and the therapeutic response of human sporotrichosis cases in Pernambuco, Northeastern Brazil, diagnosed in the period from March 2017 to March 2018, in addition to identifying genotypes and their antifungal susceptibility. Cross-sectional study nested to the prospective cohort with 98 patients with sporotrichosis treated at the specialized outpatient clinic of a university hospital in Northeastern Brazil. Sporotrichosis cases predominated in females (73.5%). The lymphocutaneous form represented 67.3% of the cases and the cutaneous fixed, 27.6%. Contact with cats at home was reported in 77.6% of cases, and trauma with felines reported in 81.6.7%. Manifestations of hypersensitivity occurred in 25.5% of the cases. The mean duration of illness until diagnosis was 41.8 days. Itraconazole was introduced in 92.9% of cases, with an average time of treatment of 18.7 weeks, lower in those hypersensitivity reactions. There was a higher positivity of the culture from the skin fragments than from the exudates (61% x 24%, respectively). The agreement between the mycological examinations, considering the different specimens, was low in the culture analysis ($K = 0.19$, 95% CI 0.04 to 0.34) and reasonable in the direct examination ($K = 0.27$, 95% CI of 0.10 to 0.44), demonstrating that obtaining both lesion fragment and secretion for mycological examination adds sensitivity to diagnosis. Molecular identification of 26 isolates, based on partial sequencing of the calmodulin gene, revealed the presence of *S. brasiliensis* in 90.9%. High efficacy of terbinafine and itraconazole was demonstrated *in vitro*. The outbreak of human sporotrichosis in Pernambuco is zoonotic, affects more women in the lymphocutaneous form of the disease, and is accompanied by a high frequency of manifestations of hypersensitivity and favorable response to ITC. Obtaining more than one clinical specimen for mycological examination added sensitivity to the diagnosis. *S. brasiliensis* seems to be responsible for the vast majority of cases, which may justify atypical disease. *In vitro*, terbinafine and itraconazole demonstrated high efficacy against *Sporothrix* isolates, relevant information for a therapeutic approach in the region.

Keywords: Sporotrichosis. *Sporothrix*. Outbreak. Diagnosis. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Principais diferenças morfofisiológicas entre as espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> . Adaptado de Marimon et al, 2007 e Rodrigues et al.	32
Figura 1 -	Fluxograma para diagnóstico da esporotricose no Ambulatório de Dermatologia, HC-UFPE.....	68
Figura 2 -	Fluxograma de seguimento clínico e tratamento dos pacientes com esporotricose	69
Figura 1 -	Formas clínicas da esporotricose. A e B: Forma fixa; C e D: Forma linfocutânea.....	86
Figura 2 -	Lesões em dorso, face e membro superior em uma mesma paciente com esporotricose cutânea disseminada.....	86
Figura 3 -	Pacientes com esporotricose e manifestações de hipersensibilidade. A. Eritema nodoso, artrite em joelho E em paciente com lesão fixa de esporotricose em coxa; B: Eritema multiforme; C: Síndrome de Sweet.....	86
Figura 1 -	A. Exame microscópico direto clarificado com KOH demonstrando estruturas leveduriformes hialinas e ovais; B. Colônia de <i>Sporothrix</i> sp. em Ágar Sabouraud a 30°C por 10 dias apresentando superfície velutínea e escurecimento periférico; C. Micromorfologia com hifas hialinas septadas e delicadas com conidióforos originando-se de conídios hialinos primários em arranjo de buquê.....	102
Gráfico 1 -	Avaliação da positividade do exame micológico direto e cultura a partir de diferentes espécimes (secreção e fragmento de pele), para diagnóstico na esporotricose humana, isolados ou agrupados (N=85).	104
Figura 1 -	Relações filogenéticas do gene codificador da calmodulina entre amostras clínicas de <i>Sporothrix</i>	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características sociodemográficas dos 98 pacientes diagnosticados com esporotricose no ambulatório especializado do Setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, entre março de 2017 a março de 2018.....	84
Tabela 2 - Características clínicas dos 98 pacientes com esporotricose.....	85
Tabela 3 - Avaliação da presença de manifestações de hipersensibilidade segundo a forma clínica, duração dos sintomas e imunossupressão.....	87
Tabela 4 - Tempo de tratamento (em semanas) segundo a forma clínica, presença de manifestações de hipersensibilidade e imunossupressão.....	88
Tabela 1 - Caracterização da amostra de casos de esporotricose humana atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife- Brasil, de março de 2017 a março de 2018.....	101
Tabela 2 - Resultado dos testes diagnósticos dos casos de esporotricose humana atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife- Brasil, de março de 2017 a março de 2018.....	102
Tabela 3 - Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia da cultura de secreção e exame direto da secreção e do fragmento em relação à cultura de fragmento - considerado padrão-ouro neste estudo – para diagnóstico de esporotricose.....	103
Tabela 4 - Concordância entre o exame direto e cultura micológica nos diferentes espécimes biológicos. (n=85)	103
Tabela 1 - Resultados da análise genotípica pelo sequenciamento parcial do gene CAL de 26 isolados de <i>Sporothrix</i> spp.	114
Tabela 2 - Valores de MIC de seis drogas anti-fúngicas contra 26 isolados do Complexo <i>Sporothrix schenckii</i> (24 de <i>S. brasiliensis</i> e 2 de <i>S. schenckii</i>)	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (<i>Amplified fragment length polymorphism</i>)
Aids	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>)
AMB	Anfotericina B
BHI	Infusão de cérebro e coração (<i>Brain Heart Infusion</i>)
CAL	Calmodulina
CD4+	Grupo de diferenciação de membrana 4 (<i>Cluster of Differentiation</i>)
CIM	Concentração inibitória mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Ensaio Imunoenzimático (<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FLC	Fluconazol
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
IL	Interleucina
IPEC	Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas
ITC	Itraconazol
ITS	Região de transcrição interna (<i>internal transcribed spacer</i>)
KTC	Cetoconazol
SSKI	Solução saturada de iodeto de potássio
PAS	Ácido periódico de Schiff (<i>Periodic acid-Schiff</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)

PDA	Meio Potato Dextrose Ágar
RAPD	DNA polimórfico randomicamente amplificado (<i>Random amplified polymorphic DNA</i>)
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossomal (<i>ribosomal deoxyribonucleic acid</i>)
RFLP	Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (<i>ribosomal ribonucleic acid</i>)
S2-R2	Primer usado para reconhecer o gene codificador da quitina sintase
SNC	Sistema nervoso central
Th1	Linfócitos T auxiliares do subtipo 1 (T-helper 1)
Th2	Linfócitos T auxiliares do subtipo 2 (T-helper 2)
TLR	Receptor do Tipo Toll (Toll-like receptor)
TRB	Terbinafina
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VRC	Voriconazol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	HISTÓRICO.....	18
2.2	EPIDEMIOLOGIA.....	19
2.2.1	Distribuição geográfica	19
2.2.2	Distribuição por idade e sexo.....	23
2.2.3	Transmissão e fontes de infecção	24
2.3	O AGENTE.....	26
2.3.1	Agente etiológico e taxonomia.....	26
2.3.2	Isolamento e cultivo.....	30
2.3.3	Identificação das espécies.....	31
2.3.4	Ecologia.....	32
2.3.5	Distribuição geográfica das espécies.....	33
2.3.6	Peculiaridades de cada espécies.....	33
2.3.7	Perfil de susceptibilidade antifúngica.....	36
2.4.	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	40
2.4.1	Formas clínicas.....	41
2.4.2	Manifestações de hipersensibilidade.....	43
2.5	DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE.....	44
2.5.1	Exame direto.....	44
2.5.2	Cultura micológica.....	45
2.5.3	Exame histopatológico.....	46
2.5.4.	Testes intradérmicos.....	47
2.5.5	Outros testes.....	47
2.5.6	Exames de imagem	49
2.6	TRATAMENTO	49
2.6.1	Tratamento farmacológico	49
2.6.2	Terapêutica não-farmacológica.....	59
2.6.3	Situações especiais.....	60
2.7	VACINAS.....	62
2.8	ESPOROTRICOSE EM ANIMAIS.....	62

2.8.1	Esporotricose felina	62
2.9.2	Esporotricose em cães.....	63
3	OBJETIVOS.....	65
3.1	OBJETIVO GERAL.....	65
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	65
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1	DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E PERÍODO.....	66
4.2	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	66
4.2.1	Critérios de inclusão.....	66
4.2.2	Critérios de exclusão.....	66
4.3	COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS.....	66
4.3.1	Método de coleta.....	66
4.3.2	Instrumento de coleta de dados	69
4.3.3	Biópsia de pele	69
4.3.4	Exame histopatológico.....	70
4.3.5	Exame micológico.....	70
4.3.6	Definição das espécies.....	71
4.3.7	Teste de susceptibilidade antifúngica.....	72
4.4	DEFINIÇÃO DE TERMOS E CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS.....	72
4.4.1	Definição de termos	72
4.4.2	Definição de variáveis.....	74
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	77
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	78
6	RESULTADOS.....	80
6.1	ARTIGO 1 – SURTO DE ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL: EPIDEMIOLOGIA, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E RESPOSTA TERAPÊUTICA	80
6.2	ARTIGO 2 – COMPARAÇÃO DIAGNÓSTICA ENTRE O EXAME MICROSCÓPICO DIRETO E CULTURA MICOLÓGICA A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS NA ESPOROTRICOSE HUMANA	98
6.3	ARTIGO 3 – SURTO DE ESPOROTRICOSE HUMANA NO NORDESTE DO BRASIL: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA	110

7	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS	124
	APÊNDICES.....	136
	APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE	
	E ESCLARECIDO	136
	APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS.....	138
	APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS.....	142
	APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS.....	161
	APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 3 EM INGLÊS	177
	ANEXO A – PARECER COSUBSTANCIADO DO CEP DO CENTRO DE	
	CIÊNCIAS DA SAÚDE/UFPE	192

1 INTRODUÇÃO

A esporotricose tem emergido como uma grande infecção fúngica nas duas últimas décadas devido a mudanças na epidemiologia, distribuição, evolução taxonômica e múltiplos surtos (CHAKRABARTI et al., 2015). Embora apenas excepcionalmente esteja associada à mortalidade, a esporotricose causa morbidade considerável (CHAKRABARTI et al, 2015; FREITAS et al., 2015). Esta doença está intimamente ligada a diferentes formas de atividades humanas, *habitats*, estilos de vida e apresenta interação tanto ambiental como zoonótica (DE ALMEIDA-PAES et al., 2011).

A esporotricose apresenta-se com notada endemicidade na América Latina, principalmente no sudeste do Brasil (CHAKRABARTI, et al, 2015). Apesar da infecção clássica estar associada à inoculação traumática do solo, plantas ou materiais orgânicos contaminados com o fungo, existem poucas áreas que apresentam casos de transmissão a partir de animais infectados (DA ROSA et al, 2005; FLEURY, et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2013). Na Região Metropolitana do Rio de Janeiro, no Brasil, há situação hiperendêmica de esporotricose humana envolvendo contato com gatos infectados desde 1998, com mais de 5.000 casos diagnosticados (CHAKRABARTI et al., 2015). *Sporothrix brasiliensis* é a espécie responsável pela epidemia em curso no Rio de Janeiro e, nesta população, parece desencadear manifestações mais exuberantes, acompanhados de quadros de hipersensibilidade e até disseminação da doença em indivíduos imunocompetentes . (FREITAS et al, 2015; ALMEIDA-PAES et al, 2014). Há relatos de transmissão zoonótica se estendendo aos estados de São Paulo, Espírito Santo e Rio Grande do Sul, mas em número bem inferior ao estado do Rio de Janeiro (FLEURY, et al, 2001; OLIVEIRA et al, 2013). Outras áreas aparentemente livres de esporotricose felina não estão bem caracterizadas no Brasil (GREMIÃO et al, 2017).

No Nordeste do Brasil e no estado de Pernambuco, casos esporádicos de esporotricose já foram relatados, em sua maioria, de forma ocupacional, acometendo indivíduos de área rural. Nos últimos dois anos, há a percepção de aumento do número de pacientes com esporotricose em Recife, com indivíduos relatando contato com gatos doentes. Esta mudança do perfil de atendimento coincidiu com o aumento na detecção de casos de esporotricose felina e motivou a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco a emitir portaria, em 2015, incluindo a esporotricose na lista de doenças de notificação compulsória (PERNAMBUCO, Portaria SES/PE, 2015). Contudo, as medidas de vigilância e notificação foram pouco divulgadas para os serviços que promovem assistência médica, gerando poucos dados.

Diante da mudança de perfil epidemiológico que parece se apresentar a esporotricose na nossa região e a falta de dados referentes aos casos no estado de Pernambuco, é imperativo reconhecer as características clínicas e epidemiológicas da doença, assim como determinar as espécies envolvidas e seu perfil de sensibilidade antifúngica, a fim de estabelecer tratamento oportuno e medidas preventivas adequadas. Identificar essas tendências epidemiológicas associadas à emergência de resistência medicamentosa é fundamental para orientar o ajuste da terapia antifúngica e estimular o desenvolvimento de novas drogas para tratar a esporotricose.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A esporotricose, doença causada pelo fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* *lato sensu*, é prevalente nas áreas tropical e subtropical de todo o mundo (CHAKRABARTI et al., 2014). Pacientes usualmente adquirem a infecção como uma “micose de implantação”, causada por uma inoculação transcutânea traumática na qual conídios do fungo são inoculados no hospedeiro (MAHAJAN, 2014). A infecção pode progredir para infecção cutânea crônica, subcutânea e/ou, eventualmente, infecção profunda envolvendo vasos linfáticos, fáscia, músculos, cartilagens e ossos. Entre as doenças fúngicas dimórficas, a esporotricose destaca-se pelas seguintes características: ser uma doença fúngica endêmica; ter endemicidade generalizada com agentes etiológicos amplamente distribuídos no meio ambiente; ser a única infecção provocada por um agente dimórfico em que o sistema pulmonar não é a principal via de infecção; sua ecologia, epidemiologia e características clínicas variam nas diferentes regiões demográficas; única doença causada por fungo dimórfico que pode mostrar substancial transmissão zoonótica (CHAKRABARTI et al., 2014).

A heterogeneidade morfológica das lesões (nódulos, placas, lesões noduloulcerativas, ulceradas, nodulocísticas, lesões verrucosas, fistulosas, edema subcutâneo ou massas) frequentemente torna o diagnóstico clínico difícil, particularmente em regiões não endêmicas, levando a um atraso na definição diagnóstica e um curso clínico protraído, causando morbidade significativa e impacto na saúde pública (MAHAJAN, 2014).

Na grande maioria dos casos, o tratamento torna-se imperativo já que a resolução espontânea é uma exceção (MORRIS-JONES, 2002). Esporotricose extracutânea é considerada micose emergente em pacientes que vivem com HIV/aids (CHANG S, HERSH AM, NAUGHTON G, 2013; PAIXÃO et al., 2015). Embora a esporotricose cause morbidade considerável, apenas excepcionalmente está associada à mortalidade (MAHAJAN, 2014)

2.1 HISTÓRICO

O primeiro caso comprovado de esporotricose foi descrito por Schenck, em 1898, nos Estados Unidos. Em 1900, Hoktoen e Perkins relataram um caso com as mesmas características clínicas, quando isolaram um agente fúngico e o denominaram *Sporothrix schenckii*. Em 1903, foi observado o primeiro caso na França e o fungo isolado foi chamado de *Sporothricum beumannii*, por Beurmann e Ramond. O fungo isolado do caso original de Schenck perdeu seu pigmento com o tempo e quando foi examinado pelos autores franceses foi considerado como espécie distinta do organismo isolado por Beurmann e Matruchot. Em 1906 e 1912,

Beurmann e Gougerot reuniram cerca de 200 casos de esporotricose e realizaram uma grande revisão da doença quanto aos seus aspectos etiológicos, clínicos, patológicos, patogênicos e de tratamento, quando firmou-se o uso dos iodetos para tratamento.(DONADEL KW, REINOSO YD, OLIVEIRA JC, 1993).

No Brasil, o primeiro caso foi observado por Terra e Rabelo, em 1912. Nos anos subsequentes surgiram os primeiros relatos de esporotricose na Bahia, Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Acre e Pernambuco. (DONADEL et al., 1993).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

A história natural da esporotricose tem mudado gradualmente em frequência, modo de transmissão e distribuição demográfica e geográfica. Isto parece ocorrer, em parte, devido a fatores ambientais, urbanização crescente e melhora no diagnóstico. Contudo, a falta de infraestrutura para diagnóstico laboratorial e de pesquisas em muitos países subdesenvolvidos não permite um conhecimento acurado quanto à distribuição e fontes ambientais do fungo e da doença (BARROS; DE ALMEIDA PAES; SCHUBACH, 2011).

2.2.1 Distribuição geográfica

A exata prevalência da esporotricose é desconhecida, tendo sido descrita nos cinco continentes, com maior prevalência em zonas tropicais e temperadas. Apesar da onipresença do *Sporothrix* sp. no ambiente, a esporotricose já foi relatada inúmeros países, como os Estados Unidos, América do Sul (Brasil, Colômbia, Guatemala e México, Peru), Europa (Portugal, França, Espanha), Ásia (China, Índia, Japão) e Austrália (MAGAND, et al., 2009; BARROS et al., 2011; DIAS et al., 2011; OJENDA et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014), com principais áreas de endemicidade no Japão (TAKENAKA et al., 2009), Índia (METHA et al., 2007), México (MACOTELA-RUIZ et al., 2006), Brasil (BARROS et al., 2004; SCHUBACH et al., 2005; SCHUBACH et al., 2004), Uruguai (CONTI et al., 1989) e Peru (KOVARIK et al., 2008).

Uma grande epidemia de esporotricose aconteceu entre os anos de 1938 e 1947, na região de Witwatersrand, na África do Sul, onde cerca de 3.300 mineradores tiveram diagnóstico da doença. A contaminação da madeira -não tratada - pelo fungo *S. schenckii* foi associada a este grande número de casos na época, apesar desta ligação não ter sido definitivamente feita naquele momento. Recentemente, realizou-se estudo transversal para identificar fatores associados à esporotricose. Govender et al. identificaram que um em cada cinco trabalhadores de uma mina de ouro sul-africana tinha esporotricose linfocutânea. A partir

de amostras clínicas e de fontes ambientais como solo e madeira, foram isoladas espécies de *Sporothrix*. Após a recomendação de tratar a madeira e intensificar o uso de equipamentos de proteção individual, novos casos da doença deixaram de ocorrer no local (GOVENDER et al., 2015). A epidemia de HIV na África do sul não está associada a um maior número de casos de esporotricose nesta população. (KENYON et al., 2013)

Em países como China, Vietnã e outras áreas da Ásia, onde o clima é favorável ao crescimento do *Sporothrix*, a prevalência de casos deve ser muito maior que a estimada na literatura (BARROS et al., 2011). No Japão, no período de 1946 a 1982, cerca de 155 casos eram relatados a cada ano, mas houve queda gradual na incidência para 50 casos/ano (CHAKRABARTI et al., 2015; TSUJI et al., 2017).

Recente estudo descreveu características clínicas e fatores de risco em surto de nove casos ocorrido no norte da Austrália. Nesta região, todos os casos foram atribuídos à espécie *S. schenckii sensu stricto*, que contaminava o feno de áreas rurais locais. (MCGUINNESS et al., 2016).

Até o início do século XX, infecção por esporotricose era comum na França. Esta doença declinou após duas décadas e hoje ocorre apenas esporadicamente neste continente. Casos autóctones em vários países europeus foram relatados em 2009, na França (MAGAND et al., 2009) e em 2008 na Itália (CRISEO et al., 2008), em Portugal (DIAS, et al.; 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014) e Espanha (OJEDA, et al., 2011) de forma pontual e incomum.

Nos Estados Unidos, surtos já foram relatados no Vale do Mississippi associados à inoculação traumática de galhos de pinheiros e manipulação de musgo (POWELL et al., 1978). Pequenos surtos isolados foram relatados entre 1952 e 2011. (REES, 2011; GREMIÃO, 2017).

Em certas regiões endêmicas na América do Sul, como no Peru, a incidência varia de 48 a 98 casos por 100.000 habitantes, chegando a atingir, na infância, média de incidência de 156 por 100.000 pessoas (PAPPAS et al., 2000; LYON et al., 2003). Na área montanhosa de Jalisco e Puebla, a esporotricose é hiperendêmica com prevalência de 25 casos por 100.000 habitantes (BONIFAZ et al., 2013). Entre 2011 e 2014, quatro casos de esporotricose humana relacionada a gatos foi relatada em Buenos Aires, Argentina (FERNÁNDEZ et al., 2015).

Em contraste com outras regiões do mundo, o número de casos de esporotricose no Brasil é muito alto. Nas duas últimas décadas, o sudeste brasileiro foi afetado por uma grande epidemia de esporotricose, com surto que começou no Rio de Janeiro e vem se expandindo para

outras regiões (RODRIGUES et al., 2013; BARROS et al., 2008; MONTENEGRO et al., 2014). De 1997 a 2011, mais de 4 mil casos de esporotricose humana foram relatadas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Rio de Janeiro, principal centro de referência para tratamento desta micose no Brasil (SILVA et al., 2012). De 1998 até 2015, 4.703 gatos foram diagnosticados com a doença, mostrando que a epidemia está relacionada ao adoecimento desses animais e transmissão zoonótica (VIANA et al., 2015; GREMIÃO et al., 2017).

Barros et al. descreveram aproximadamente 2.200 humanos e 3.244 casos felinos de esporotricose diagnosticados entre 1998 e 2009, no Rio de Janeiro, Brasil. (BARROS et al., 2010). Durante os anos de 2013 a 2016 foram notificados 3.377 casos suspeitos de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro, com mediana de 782 casos ao ano. (SVS/SES/RJ, 007/2016). Esses dados mostram enorme discrepância quando comparados a apenas 13 casos humanos de esporotricose observados entre 1987 e 1997 (SCHUBACH et al., 2008).

Devido à alta incidência de esporotricose felina, o Rio de Janeiro é atualmente considerado hiperendêmico para esporotricose associada a gatos. (RODRIGUES et al., 2016). O agente etiológico envolvido nesta situação epidêmica é o fungo *Sporothrix brasiliensis*, uma espécie do complexo *Sporothrix schenckii* altamente patogênica (RODRIGUES et al., 2014). O Estado do Rio de Janeiro, a esporotricose humana não apresenta, atualmente, um aumento no número absoluto de casos, mas sim uma expansão geográfica da doença no estado, refletindo um aumento do número de municípios com notificação de casos (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO – SVS/SES 007/2016).

A recente epidemia no Rio de Janeiro e no Rio Grande do Sul distingue o Brasil de outras áreas da América Latina e do mundo (COLES et al., 1992; RODRIGUES et al., 2014; CAMACHO et al., 2015). Os surtos nessas regiões brasileiras ocorrem associados à esporotricose felina e são caracterizados pela existência de casos agrupados, com muitos relatos de infecções humanas e animais em um curto período de tempo, algumas vezes envolvendo vários membros de uma mesma família concomitantemente. (RODRIGUES et al., 2013, RODRIGUES et al., 2014; BARROS et al., 2004).

Casos de esporotricose felina e de transmissão zoonótica também têm sido relatados em outros estados brasileiros, principalmente o Rio Grande do Sul e São Paulo, contudo com número de casos bem inferior quando comparado ao Rio de Janeiro (ARAÚJO et al., 2015; RODRIGUES et al., 2013).

Estudo retrospectivo transversal envolvendo 25 casos de esporotricose atendidos em instituição de ensino do Estado de São Paulo, no período de 2003 a 2013, mostraram que 40% dos casos estiveram associados ao contato com gatos doentes. A alta incidência em trabalhadores rurais (44%), empregados domésticos (16%) e veterinários (12%) denotam o caráter ocupacional da doença nestes profissionais, que se expõem a pequenos traumas com animais, plantas e no manejo do solo (MARQUES et al., 2015).

Apesar de estar numa região próxima ao epicentro da epidemia zoonótica do Rio de Janeiro, o estado do Espírito Santo ainda revela maior prevalência da transmissão clássica, onde os sujeitos são infectados por inoculação traumática acidental durante a manipulação de material vegetal contaminado, e nesse contexto, o *Sporothrix schenckii* foi o principal agente etiológico detectado. A epidemia transmitida por gatos neste estado ainda é escassa, apesar da proximidade geográfica e características climáticas semelhantes (DE ARAÚJO et al., 2015).

A esporotricose é também a micose subcutânea mais frequente do homem no Rio Grande do Sul. Em estudo publicado por Lopes et al, comparou-se a epidemiologia dos casos de esporotricose humana de 1987-97 com aqueles de décadas anteriores, observando que nas décadas de 1960-70, o número de pacientes afetados da zona urbana caiu, enquanto os da zona rural aumentaram proporcionalmente. Isso provavelmente ocorreu devido à crescente urbanização das cidades, com diminuição de espaços abertos para recreação, como pátios, quintais e terrenos baldios (LOPES et al., 1999). Na década de 1990, evidenciou-se decréscimo da incidência da micose - de 11,7 casos/ano na década de 1950 a 3,1 casos/ano no final da década de 1990 - havendo alteração no perfil da infecção, com diminuição de casos em pacientes residentes na zona rural, em crianças, em mulheres e agricultores, passando a serem mais frequentes em profissões variadas, associadas ao lazer rural, como pescarias e caçadas. (LOPES et al., 1999).

Áreas geográficas livres de esporotricose felina não estão bem caracterizadas (RODRIGUES, 2014). No Nordeste do Brasil, Pernambuco (ARAÚJO, 2016), Rio Grande do Norte (FILGUEIRA et al., 2009), Paraíba (NUNES et al., 2013) e Alagoas (MARQUES-MELO et al., 2014) já relatam casos de esporotricose animal, alguns estabelecendo transmissão zoonótica. A esporotricose ainda é um assunto pouco explorado nesta região. No Recife, no estado de Pernambuco, vem sendo observado aumento na detecção de casos de esporotricose felina, o que motivou a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco a emitir portaria, em 2015, incluindo a esporotricose humana na lista de doenças de notificação compulsória (PORTARIA

SES/PE 279 DE 23/07/2015). Contudo, a esporotricose ainda é um assunto pouco explorado nesta região.

2.2.2. Distribuição por idade e sexo

Embora grupos etários específicos e/ou sexos estejam supostamente mais susceptíveis à esporotricose, a esporotricose pode afetar qualquer pessoa independentemente da idade ou sexo. Na maioria das regiões, a diferença na distribuição etária e por sexo reflete a ocupação do indivíduo e sua exposição ao fungo. Hábitos ocupacionais e recreativos específicos para diferentes populações podem aumentar o risco de infecção (CHAKRABARTI et al., 2015).

Entre os casos estudados no Japão por Takenaka et al. (TAKENAKA et al., 2009), 70% dos casos de esporotricose envolviam maiores de 50 anos de idade, afetando igualmente os sexos. No Brasil existem dois padrões de transmissão: através de animais (predominantemente gatos infectados) e através de vegetação contaminada. Especialmente no estado do Rio de Janeiro, há predominância da esporotricose em mulheres maiores de 40 anos, de baixo nível socioeconômico e que participam de atividades domésticas são mais freqüentemente infectadas devido à sua exposição ao cuidar de animais doentes em casa (SCHUBACH et al., 2008; BARROS et al., 2008). Na Colômbia e áreas rurais do sudeste do Brasil, há uma maior prevalência em homens acima dos 50 anos, que trabalham em atividades de agricultura (ALVES et al., 2010). Já no nordeste da Índia e no Japão, as funções agrícolas são mais exercidas pelas mulheres, o que reflete uma prevalência maior da infecção neste grupo (GORDON et al., 1980; BHUTIA et al., 2011). Por outro lado, na África do Sul, os homens são mais afetados que as mulheres, numa taxa de 3:1, por haver uma maior exposição a atividades ao ar livre e de mineração (VISMER et al., 1997). No Uruguai, a esporotricose ocorre mais frequentemente entre homens e caçadores de tatu, que são infectados a partir de arranhões recebidos durante a caça (RODRIGUES et al., 2014).

Curiosamente, nos Andes peruano, as crianças têm incidência três vezes maior que os adultos. Em estudo realizado no Peru, com casos de esporotricose ocorridos entre 1995 e 1997, 60% dos afetados eram crianças menores de 15 anos de idade (PAPPAS et al., 2000). Contudo o trabalho não mostrou associação entre idade, sexo e exposição ao fungo e o risco de desenvolver a doença. Estudos de caso-controle indicam que jogos em áreas de cultivo e em pisos sujos das casas são os modos possíveis de exposição destas crianças (NEYRA et al., 2005; LYON et al., 2003).

2.2.3. Transmissão e fontes de infecção

O modo de transmissão da esporotricose é quase sempre decorrente da implantação traumática de conídios do *S. schenckii sensu lato* de uma fonte contaminada. Tipicamente, a infecção desenvolve-se após inoculação do fungo na pele ou mucosa a partir de plantas, musgo, feno e outros tipos de matéria orgânica em decomposição. Alternativamente, a infecção pode ocorrer durante a transmissão entre animais (gato $\pm$ gato ou gato $\pm$ cão) e transmissão zoonótica (gato $\pm$ humano). Esta última está principalmente associada a arranhaduras e/ou mordidas de gatos infectados. Contudo, o *Sporothrix* já foi isolado em unhas, cavidades oral e nasal de felinos aparentemente saudáveis (SCHUBACH et al. 2001; SCHUBACH et al., 2002).

O reino vegetal constitui a maior fonte de contágio. O fungo já foi isolado em feno, palha, espinhos de roseira, capim, arbustos, mofo de esfingínea, cana-de-acúcar, cactos, espigas de milho, grama, tulipas, batatas, espigas de trigo e *Sphagnum moss* (tipo de musgo). Portanto qualquer planta, árvore ou flor de área endêmica pode ser considerada suspeita (DONADEL et al., 1993). Os seres humanos geralmente adquirem a infecção cutânea durante atividades ao ar livre como as relacionadas à agricultura, jardinagem, criação de animais e atividades profissionais (CHAKRABARTI et al., 2015).

Profissionais de laboratório podem se infectar acidentalmente com o *Sporothrix sp.* A partir da manipulação de culturas, materiais contaminados e animais infectados e podem desenvolver doença semelhante àquelas de inoculação espontânea. (DONADEL et al., 1993).

Embora animais não sejam a principal fonte de infecção para os humanos, na maioria dos lugares do mundo, transmissão zoonótica tem sido relatada a partir de mordidas e arranhaduras de gato, picadas de insetos, manipulação de peixes, mordidas de cães, ratos, répteis e cavalos (REED et al., 1993; FLEURY et al., 2001). Gatos têm sido um importante veículo de disseminação do *Sporothrix* ao longo da epidemia de esporotricose no Brasil, cujo agente responsável é o *S. brasiliensis* (em 97% dos casos), conforme resultado de análise de amostras de origem humana e animal, indicando um grupo de risco peculiar nestes casos (FLEURY et al., 2001; REIS et al., 2009; BASTOS et al., 2003; RODRIGUES et al., 2013).

Nos casos de esporotricose extracutânea, a via de infecção pode ser pulmonar. Numa revisão de 86 casos de esporotricose pulmonar, 74% tratavam-se de infecção pulmonar primária e 28% dos casos apresentavam envolvimento multifocal, sugerindo que a infecção ocorreu por inalação dos conídios fúngicos (AUNG et al., 2013) Casos de esporotricose pulmonar esporádicos têm sido descritos em pacientes imunodeprimidos, especialmente naqueles com

HIV/aids, embora indivíduos imunocompetentes mais raramente possam adquirir a infecção por esta via (AUNG et al., 2103; CALLENS et al., 2006).

Cerca de 10-62% dos pacientes com esporotricose não relatam qualquer história de trauma, pois este geralmente é discreto ou de pequena significância, ocorre algumas semanas antes do desenvolvimento da doença, podendo ser frequentemente esquecido (MAHAJAN et al., 2005). A transmissão inter-humana não é descrita (BARROS et al., 2011).

Em todo o mundo, há relatos de surtos de esporotricose de variadas dimensões. Uma das maiores epidemias de esporotricose descrita, foi a que ocorreu em mais de 3.000 mineradores na África do Sul nas décadas de 1930-40, com possível contaminação da estrutura de madeira dos telhados das minas pelo *S. schenckii sensu lato*. Um grupo de 53 pescadores foram acometidos pela doença em três anos na Guatemala como resultado da injúria provocada por peixes contaminados (CHAKRABARTI et al., 2015).

Na Flórida, nove casos da infecção ocorreram entre 56 funcionários de um centro de jardinagem local; estudo de caso-controle deste surto mostrou que o adoecimento ocorreu naqueles com contato maior que 20 horas por semana com musgo. (HAJJEH, 1997). Também nos Estados Unidos, em Wisconsin e outros 14 estados, um grande número de trabalhadores florestais envolvidos com a coleta de esfagno (um tipo de musgo) e embalagem de mudas de pinheiro foram infectados pelo musgo contaminado fornecido da Pensilvânia. (GROTTE et al., 1981; COTE et al., 1988).

Na China, um único surto de esporotricose foi relatado em 15 lactentes menores de 10 meses. Não havia história de trauma ou contato com animais, e a provável fonte de infecção foi o contato com espigas de milho contaminadas usadas pelas famílias para cozinhar e se aquecer no período de inverno (SONG et al., 2011).

- *Transmissão zoonótica*

Das micoses endêmicas, no Brasil, a esporotricose distingue-se por sua suposta prevalência de transmissão animal-humano. Contudo, não está claro como a fase leveduriforme do fungo é capaz de infectar os humanos, já que geralmente sua fase micelial é que é o propágulo infeccioso natural. Apesar de haver esta lacuna de compreensão, há evidências claras em vários estudos corroborando a transmissão a partir de gatos infectados. (RODRIGUES et al., 2013; SCHUBACH et al., 2005).

Alguns animais têm sido relacionados à transmissão zoonótica de *Sporothrix* spp. Os animais mais comumente descritos são os gatos, que desenvolvem a doença, muitas vezes com

quadros graves e evolução para o óbito, veiculando o parasita pela arranhadura, mordedura e exsudato de lesões. No meio silvestre, os tatus podem apresentar a infecção e atuar como transmissores do fungo pela arranhadura, apesar do fungo não ter sido ainda isolado de sua pele. Outros casos humanos relatados têm sido associados a picadas de mosquitos, abelhas, cobras, bicadas de papagaios ou mordidas de ratos, cavalos, cachorros e peixes. Os indivíduos que por profissão ou hábitos de vida lidam com essas situações são os mais predispostos à infecção como floristas, jardineiros, fazendeiros, horticultores, mineiros, feirantes, veterinários e tratadores de animais (RIPPON et al., 1988;; SCHUBACH et al., 2000; SCHUBACH et al., 2001; LACAZ, 2002; BARROS et al., 2004).

As maiores casuísticas brasileiras com a transmissão clássica pelo solo ou matéria orgânica são provenientes dos estados de São Paulo, com 235 casos humanos confirmados até o ano de 1953 (Sampaio et al., 1954) e Rio Grande do Sul, com 646 casos humanos acumulados em diferentes casuísticas entre os anos 1957 e 2002 (Londero; Ramos, 1989; Lopes et al., 1999; da Rosa et al., 2005). Nas últimas duas décadas, a epidemia que ocorre no sudeste do Brasil tem como fonte de infecção os gatos doentes por esporotricose (SCHUBACH et al., 2005). A clonalidade do *S. brasiliensis* e a presença desta espécie em região restrita do país suportam a hipótese de uma fonte comum para esta grande epidemia (RODRIGUES et al., 2013).

Em estudo realizado no Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, no Rio de Janeiro, Brasil, mostrou que 83% dos pacientes com esporotricose relatavam contato com gatos, e 56% afirmaram ter sido vítimas de mordidas ou arranhaduras por animais doentes. Nestes, houve isolamento do *S. schenckii lato sensu* na cavidade nasal ou pele (SCHUBACH et al., 2008). Outro estudo realizado no Rio de Janeiro constatou que o *S. brasiliensis* é altamente prevalente entre gatos (96,9%) e o genótipo dos isolados fúngicos dos gatos foram idênticos aos de *S. brasiliensis* dos seres humanos (RODRIGUES et al., 2013). Tatus infectados podem ser outra fonte de transmissão zoonótica, forma relatada nos casos que ocorreram entre caçadores de tatus, no Uruguai.

2.3 O AGENTE

2.3.1 Agente etiológico e Taxonomia

Desde o seu isolamento por Benjamin Schenck em 1898, a posição taxonômica das espécies de *Sporothrix* permanece um enigma. Smith, micologista, identificou o mesmo fungo isolado por Schenck como um “*Sporotricha*” e Howars confirmou sua natureza dimórfica em 1961 (CHAKRABARTI et al., 2015). O fungo foi denominado *Sporothrix schenckii*, e Guarro

et al.(1999) o classificaram na divisão *Ascomycota*, classe *Pyrenomycetes*, ordem *Ophistomatales*, família *Ophistomataceae*.

Desde os primeiros relatos e, por mais de cem anos, considerou-se que o gênero *Sporothrix* era composto somente por uma espécie patogênica: *Sporothrix schenckii*. Este sempre foi reconhecido como uma espécie uniforme em suas características fenotípicas. Em todos os casos em que esta espécie foi estudada, após isolamentos a partir de materiais obtidos de lesões no homem e nos animais, ou mesmo do meio ambiente e oriundos de todos os lugares no mundo, os critérios utilizados para a classificação do gênero e de suas espécies sempre foram baseados em aspectos fenotípicos: como as características coloniais, pigmentação, a morfologia microscópica e o seu termodimorfismo, quando ele se torna leveduriforme a 37° C e micelial em cultivos à temperatura ambiente. (DA CRUZ et al., 2013). Com a utilização rotineira desses novos procedimentos como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o sequenciamento de genomas, a sistemática de vários grupos de fungos vem passando por profundas transformações e diversas espécies novas têm sido propostas. Em anos recentes, foram identificadas várias sequências gênicas que passaram a ser utilizadas como marcadores moleculares de fungos, destacando-se entre elas a calmodulina, a beta-tubulina, a quitina sintase e o fator de alongação (EF-1a) (MARIMON et al., 2007; KANO et al., 2001; MARIMON et al., 2006; KANO et al., 2008). Diversas outras técnicas têm sido empregadas para a identificação do *S. schenckii*, destacando-se entre elas a imunofluorescência, a eletroforese em campo pulsado e RFLP mitocondrial (TAKEDA et al., 1991; ISHIZAKI et al., 2009). É indispensável juntar diferentes características, morfológicas, ecológicas, bioquímicas, fisiológicas, nutricionais, genéticas e outras, numa análise multifatorial para definir e classificar as espécies fúngicas, especialmente na micologia médica.

A heterogeneidade morfológica e genética de cepas de *S. schenckii* isoladas a partir de material patológico foi registrada em diversos trabalhos publicados ao longo dos últimos anos (ISHIZAKI et al., 2004; MESA-ARANGO et al.; 2002). Uma combinação de filogenia, morfologias e eco-epidemiologia permitiu grandes avanços na compreensão da taxonomia da espécie *Sporothrix*, exibindo estilos de vida distintos incluindo membros sapróbios tais como, agentes patogênicos humano / animal e simbioses de insetos.

Em 1979, Know-Chung foi a primeira a relatar a heterogeneidade das cepas do *S. schenckii lato sensu*. Notaram que os isolados provenientes das lesões cutâneas fixas e linfocutâneas diferiam em seu crescimento a 37 ° C e virulência em modelos animais. Contudo,

esta heterogeneidade só foi melhor estabelecida por métodos mitocondriais e de análise DNA ribossômico (CHAKRABARTI et al., 2015).

Baseados na filogenia do DNA e tipos de isolados de DNAr, as cepas de *Sporothrix* foram separadas em dois grupos: o grupo A compreendia a maioria dos isolados dos Estados Unidos e América Latina e o grupo B, os isolados da Ásia. (ISHIZAKI et al., 2009).

A primeira observação indicando que o *S. schenckii* seria um complexo de espécies distintas foi feita com base em análise filogenética empregando uma combinação de sequências de DNA de três loci (quitina sintase, beta- tubulina e calmodulina) obtidas com o estudo de sessenta cepas de *S. schenckii* isoladas de diversos países (MARIMON et al., 2006). Recentes estudos moleculares avaliaram a diversidade genética do *S. schenckii*, e têm demonstrado que a existência de diferentes aglomerados de cepas estaria relacionada a diferentes origens geográficas (GALHARDO et al., 2008; MARIMON et al., 2006; O'REILLY et al., 2006). Posteriormente, foi constatado que bastaria uma análise sequencial do *locus* calmodulina para reconhecer todas as espécies de interesse médico que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2007).

Depois da análise de parâmetros fenotípicos e genotípicos estudados em 127 culturas de *S. schenckii*, isoladas de casos clínicos em várias regiões do mundo, foi proposta a criação de três novas espécies, além do *S. schenckii*: *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* (MARIMON et al., 2007). A distinção entre estas espécies foi baseada nos seguintes aspectos:

- a) sequenciamento do gene da calmodulina;
- b) perfil de assimilação de fontes de carbono (sacarose, rafinose e ribitol) tendo como meio básico o Yeast Nitrogen Base (YNB);
- c) diâmetro médio das colônias, após incubação nas temperaturas de 20, 30, 35 e 37° C por 21 dias no meio Ágar batata dextrose (PDA);
- d) morfologia dos conídios nos cultivos em meio PDA.

Contudo, em 2008, foi proposto que a variante morfológica denominada *S. schenckii* var. *luriei* fosse transformada em uma nova espécie com a denominação de *S. luriei* com base nas seguintes características: assimila ribitol e não assimila rafinose e sacarose; produz colônias com diâmetro de 51mm a 30° C, de 35-36 mm a 35° C e 21 mm a 37° C; produz conídios simpodiais e sésseis, ovóides e hialinos. (MARIMON et al., 2008).

Com base nos recentes estudos sobre a genômica e com base nos conceitos modernos da taxonomia polifásica que inclui, além do sequenciamento de DNA, informações sobre morfologia, nutrição e fisiologia, a antiga espécie *S. schenckii* passou a ser considerada como um complexo de espécies crípticas. Desta maneira, o complexo *S. schenckii* passou a ser constituído pelas seguintes espécies: três espécies crípticas clinicamente relevantes (*S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*), duas espécies de fungos ambientais (*S. mexicana* e *S. albicans*), enquanto o original *S. schenckii* passou a ser conhecido como *S. schenckii stricto sensu* (MARIMON et al., 2007; MARIMON et al., 2008). Essas foram associadas às demais espécies já existentes *S. schenckii* e *S. albicans*, recentemente renomeada como *S. pallida* (MEYER et al., 2008). A espécie *S. pallida* apresenta uma característica peculiar que é a presença apenas de conídios hialinos. Posteriormente, Marimon et al. sugeriram que *S. schenckii* var. *luriei* deveria, também, ser considerada uma nova espécie, *S. luriei*, após estudos baseados na mesma metodologia proposta um ano antes (MARIMON et al., 2008a).

Uma análise filogenética baseada no rDNA e no gene da β -tubulina de *S. albicans*, *S. pallida* e *S. nivea* revelou grande semelhança entre as três espécies, sendo proposto que fossem classificadas como *S. pallida*. Os autores demonstraram também que a análise do sequenciamento parcial da β -tubulina é recomendada em estudos taxonômicos de *Sporothrix* spp. isoladas do ambiente (MEYER et al., 2008).

Considerando os novos critérios de identificação das espécies do complexo *S. schenckii*, dois grupos de pesquisadores brasileiros reestudaram as culturas mantidas em suas micotecas. Em São Paulo, Rodrigues estudou 161 cepas de *Sporothrix* spp. provenientes de amostras clínicas e ambientais de diversas regiões do Brasil e de outros países (RODRIGUES et al., 2010). Demonstrou-se que as espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* e *S. schenckii* tinham ampla distribuição geográfica no país e registraram, também, que a espécie *S. brasiliensis* foi isolada com alta frequência em gatos nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, sugerindo que este animal poderia ser um importante reservatório na epidemiologia da esporotricose. No Rio de Janeiro, Oliveira et al. (2011) desenvolveram um trabalho semelhante ao analisarem 246 culturas isoladas no Rio de Janeiro, no período de 1998 e 2008 e, como resultado, reclassificaram 230 delas como *Sporothrix brasiliensis*, 15 como *S. schenckii* e 1 como *S. globosa*. Subsequentemente, outras investigações sugeriram a inclusão de outras espécies de origem ambiental, como o *S. bruneneoviolacea*, *S. dimorphospora* e *S. pallida*.

Em 2016, Rodrigues et al. propuseram a denominação de *Sporothrix chilensis* sp. nov. para acomodar isolados provenientes de onicomicose, e de origem ambiental do Chile, e que

raramente causam a doença humana. A análise de multigenes da região ITS ½+5.8s, beta-tubulina, calmodulina, e o fator de alongação (EF-1α) revelou que o *S. chilensis* é um membro do complexo *Sporothrix pallida*, e se encontra mais próximo do ponto de vista taxonômico com o *S. mexicana*, uma espécie rara com origem no solo, usualmente não patogênica para os seres humanos. Um modelo murino de esporotricose disseminada revelou um leve potencial patogênico, com invasão de pulmão. O *S. chilensis* embora não seja um patógeno primário, infecção acidental por este fungo pode ter um impacto na população de imunossuprimidos (RODRIGUES et al., 2016).

Com a introdução de espécies distintas com rotas similares mas com diferentes graus de virulência, formas de transmissão e padrões de sensibilidade a antifúngicos, a identificação das espécies do complexo *Sporothrix* torna-se obrigatória (RODRIGUES et al., 2016).

2.3.2. Isolamento e Cultivo

Embora a observação de elementos fúngicos na microscopia direta de tecidos ou de fluidos possa sugerir um diagnóstico de esporotricose, a confirmação pelo isolamento e identificação da espécie é indispensável. Para isso é necessário cultivar o material suspeito em meios de cultura seletivos (acrescidos de cloranfenicol e cicloheximida) (CRUZ et al., 2013). Como as espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii* são dimórficas, o material que for coletado de lesões deverá ser semeado em dois meios de cultura diferentes: ágar infusão de cérebro e coração, com incubação a 37°C e no meio de ágar Sabouraud dextrose, que deverá ser incubado a 25°C. Em certos casos, a conversão para a fase leveduriforme requer diversas subculturas e incubação prolongada a 37°C. Assim procedendo, o crescimento do fungo será de dois tipos:

a) leveduriforme nos cultivos a 37°C, característica que é semelhante à observada quando o fungo se encontra parasitando o tecido animal. Nestas condições, o crescimento terá consistência cremosa e sua cor será creme (CRUZ et al., 2013) e, na microscopia, suas células serão predominantemente alongadas, mas também com presença de células ovóides e arredondadas;

b) micelial quando a incubação tiver sido feita a 25°C. Este tipo de crescimento corresponde ao que se observa no meio ambiente na superfície de vegetais. Neste caso, o fungo crescerá formando colônia enrugada, aderente ao meio de cultura, constituída por uma película muito resistente formada por um denso entrelaçado de suas hifas, apresentando às vezes um micélio aéreo. Um dos aspectos considerados importantes para a caracterização do *S.*

schenckii é a pigmentação de suas colônias que, em seu início, tem a cor creme e, depois vai escurecendo, gradativamente, até se tornar cinza, depois cinza escuro e, finalmente, negra. Esta pigmentação escura está associada à produção de melanina (MADRI et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2010) que é universalmente reconhecida como um fator de virulência produzido por diversos fungos patogênicos.

2.3.3 Identificação das espécies

O diagnóstico das micoses, em sua maioria, é demorado porque depende do cultivo e identificação do agente etiológico, que em geral, cresce lentamente. A caracterização morfológica, bioquímica e sorológica pode não ser conclusivos em virtude da presença de uma quantidade limitada de células fúngicas nos materiais patológicos coletados ou mesmo quando não é possível obter o crescimento do fungo, algumas vezes pela predominância de outros microorganismos na lesão.

O estudo pioneiro utilizando a metodologia de detecção de DNA para o diagnóstico de infecções fúngicas foi relatado por Sandhu et al. (1995), no qual os autores desenvolveram 21 *primers* específicos com alvo para a grande subunidade do ácido ribonucleico ribossomal (rRNA) de diversos fungos, incluindo *Sporothrix* spp. Os resultados apresentaram um alto nível de especificidade (SANDHU et al., 1995). Estudos prévios utilizando a análise do DNA mitocondrial apresentaram heterogeneidade de perfis em cepas de *Sporothrix* spp. (SUZUKI et al., 1988; TAKEDA et al., 1991). Diversos estudos taxonômicos moleculares utilizando diferentes metodologias, como a *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) de diferentes genes alvos, *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), sequenciamento do DNA da região de transcrição interna do rRNA (ITS), reação em cadeia da polimerase (PCR) com alvo no gene da enzima topoisomerase II, *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), e M13 PCR *fingerprinting* demonstraram que isolados de *S. schenckii lato sensu* apresentavam polimorfismos, sugerindo que poderiam não ser apenas uma espécie (OLIVEIRA et al., 2014a).

Com base nos critérios filogenéticos, o complexo *S. schenckii* foi considerado um conjunto composto por seis espécies crípticas que são indistinguíveis macroscopicamente e muito semelhantes quanto às suas características microscópicas. Como a identificação genotípica das espécies demanda procedimentos nem sempre acessíveis aos laboratórios de rotina, foram definidos critérios fisiológicos e nutricionais para a distinção clássica entre as espécies (MARIMON et al., 2007) (Quadro 1).

Quadro 1. Principais diferenças morfofisiológicas entre as espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Adaptado de Marimon et al, 2007 e Rodrigues et al.

Espécies	Conídios sésseis pigmentados	Colônias maiores que 50mm em PDA a 30°C por 21 dias	Crescimento a 37° C	Teste de assimilação de sacarose	Teste de assimilação de rafinose
<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. luriei</i>	Não	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Sim	+	+
<i>S. albicans</i>	Não	Sim	Sim	+	-

(CRUZ et al., 2013)

Análises moleculares a partir do sequenciamento parcial do gene da calmodulina detectam e identificam as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* em amostras de culturas ou de espécimes clínicos (RODRIGUES et al., 2015).

No contexto atual as espécies capazes de provocar esporotricose humana distribuem-se em dois grupos: o complexo *S. Schenkii* com as espécies *S. schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*; e o complexo *Sporothrix pallida*, com *S. mexicana*, *S. pallida* e o *S. chilensis*, grupo de menor patogenicidade (RODRIGUES et al., 2016).

2.3.4 Ecologia

Embora o *S. schenckii* seja onipresente no solo, em madeira decomposta, musgo, feno e espigas de milho, sua ecologia permanece pobremente compreendida. O *S. schenckii lato sensu* está incorporado à família *Ophiostomales*. cujos membros estão associados principalmente a cascas de besouros ou patógenos vegetais (ZIPFEL et al., 2006; ROETS et al., 2010). *S. schenckii lato sensu* nunca foi considerado como patógeno vegetal; falham em obter crescimento em plantas vivas, provavelmente devido à atividade antifúngica das mesmas (MASOKO et al., 2008; MASOKO et al., 2010), mas conseguem proliferar em abundância na madeira em diversos estágios de decomposição. Já foi demonstrado que *S. schenckii* apresenta conidiogênese prolífica quando uma madeira está presente em um meio de cultura (FINDLAY et al., 1986). Vismer e Eicker estudaram 37 espécies exóticas de árvores indígenas a fim de

determinar aquelas com maior facilidade de crescimento do fungo e notou que o *S.schenckii* cresceu melhor nas *Acacia melanoxylon*, *Cinnamomum camphora*, *Eucalyptus grandis*, *E. sideroxylon* e *Ginkgo biloba* (VISMER et al., 1994).

S. schenckii lato sensu cresce em ambientes com temperatura de 22-27 °C e 90% de umidade. Material orgânico no solo possivelmente ajuda neste crescimento já que a proliferação do fungo requer solo rico em celulose, temperatura em torno dos 30°C, pH entre 3,5 e 9,5 e alta umidade (NORIEGA et al., 1993). Assim, o *S. Schenckii lato sensu* tem nichos ecológicos altamente específicos dentro de países e, em algumas regiões, tem sido descrito como endêmico. Todavia, esses nichos ainda não são claramente compreendidos.

O fungo cresce sob a forma micelial no ambiente, produzindo muitos conídios. Durante atividades ocupacionais e recreativas, os seres humanos geralmente adquirem a infecção por implantação traumática do agente. A doença também é prevalente em animais de sangue quente, como gatos, cães, tatus, aves e papagaios. Já foi isolado em peixes e golfinhos (HADDAD et al., 2008).

2.3.5 Distribuição geográfica das espécies

As espécies de *Sporothrix* também diferem em distribuição geográfica. *Sporothrix globosa* é distribuída mundialmente e suas espécies têm sido reconhecidas na Europa, EUA, América do Sul e Ásia. *Sporothrix brasiliensis* é uma espécie emergente restrita ao Brasil e altamente patogênica para animais (RODRIGUES et al., 2013). *Sporothrix luriei* foi descrito a partir de infecções humanas na África, Itália e Índia e uma infecção canina no Brasil (CHAKRABARTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2011). *Sporothrix mexicana* tem sido recuperada do ambiente na Austrália, México e Portugal e foi relatado como causador de infecções humanas ocasionais (RODRIGUES et al, 2013).

2.3.6 Peculiaridades de cada espécie

Nos últimos anos, a aplicação do conceito da filogenética em espécies biológicas de agentes patogênicos tem revelado diferentes linhagens que refletem a divergência das espécies. O delineamento destes grupos filogenéticos e o desenvolvimento de métodos mais simples para a sua identificação são considerados importantes, uma vez que mostram comportamentos patológicos e respostas antifúngicas distintas (MARIMON et al., 2008).

Até o momento, não são bem conhecidas as diferenças clínicas e de suscetibilidade antifúngica entre as espécies. A identificação detalhada das espécies nos casos de esporotricose trazem informações relevantes que podem ser úteis para pesquisas futuras. Considerando as

mudanças taxonômicas ainda recentes, muitas informações referentes à cada espécie são oriundas de relatos e série de casos e alguns estudos transversais.

A definição de cada espécie era inicialmente determinada por caracterização fenotípica, que pode, em alguns casos, ter resultado ambíguo ou ser discordante com a identificação molecular com base no sequenciamento do gene da calmodulina. Este último é considerado o melhor método para definição das espécies

- ***Sporothrix brasiliensis***

A espécie *Sporothrix brasiliensis* está comumente associada à infecção felina e sua maior virulência tem sido consistentemente mostrada durante surtos e epidemias de esporotricose. Uma característica própria do *S. brasiliensis* é a sua tendência a desencadear surtos e epidemias entre gatos, com alto potencial de transmissão zoonótica.

Infecções por *S. brasiliensis* apresentam-se com maior carga fúngica, invasividade e dano tecidual quando comparados a outros agentes do Complexo *Sporothrix* (FERNANDES et al., 2013). A virulência maior desta espécie parece estar ligada a uma resistência aumentada ao estresse oxidativo do hospedeiro (FREITAS et al., 2015), à produção elevada de melanina associada a uma maior resistência à fagocitose (ALMEIDA-PAES et al., 2015) e à presença da glicoproteína Gp60, componente de adesão extracelular do fungo (RODRIGUES et al., 2015).

O *S. brasiliensis* vem demonstrando maior susceptibilidade ao itraconazol quando comparada às demais espécies. (MARIMON et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; STOPIGLIA et al., 2014).

- ***Sporothrix globosa***

O *S. globosa*, assim como o *S. schenckii*, tem uma distribuição transoceânica. (MARIMON et al., 2006). Já foi isolado no Reino Unido, Espanha, Itália, China, Japão, Índia, Irã, México e Estados Unidos, Chile e Brasil. (CRUZ et al., 2012; MAHMOUDI et al., 2016) Como este fungo não cresce adequadamente a 37° C, ele não causa infecção cutânea disseminada ou extracutânea (CRUZ et al., 2012).

Em relato de caso japonês, o *S. globosa* foi identificado em paciente de 77 anos com doença linfocutânea em braço, adquirida após arranhadura de gato ocorrida quinze dias antes. A identificação se deu a partir do não crescimento do fungo de cultura a 37° C, nem sua conversão para forma leveduriforme. Análise genética de DNA por PCR identificou o isolado como *S. globosa*. Este caso foi tratado com iodeto de potássio (1,2g/dia) por 3 meses seguido

de itraconazol (200mg/dia) por 2 meses. (WATANABE et al., 2016). Ocorrência de esporotricose por *S. globosa* também foi descrita no Chile em idoso com forma linfocutânea, que se traumatizou com espinho de rosa, sendo tratado com itraconazol 200mg/dia por 4 meses (CRUZ et al., 2012). Há relatos de resistência *in vitro* e *in vivo* desta espécie ao itraconazol (MAHMOUDI et al., 2016; GOMPERTZ et al. 2016).

Metanálise recente estudou casos de esporotricose na Ásia a fim de avaliar as principais fontes e padrões epidemiológicos e especular sobre a origem evolutiva de *Sporothrix globosa*. Quase todos os casos de esporotricose causada por *S. globosa* na Ásia eram humanos. Em contraste com as demais espécies *Sporothrix* patogênicas, a transmissão felina foi excepcional; Na Ásia, *S. globosa* foi a espécie predominante. A baixa diversidade de *S. globosa* sugeriu uma divergência recente de baixa variabilidade da espécie ancestral, *S. Schenckii* (MOUSSA et al., 2017).

- ***Sporothrix pallida***

Patógeno predominantemente ambiental, mas já foi identificado em felinos e na superfície de insetos. (RODRIGUES et al. 2015). Tem baixo poder patogênico em mamíferos. A análise multilocus aumenta significativamente a resolução taxonômica entre espécies no clado clínico e é útil para reconhecer agentes raros do *Complexo S. pallida* como *S. pallida*, *S. mexicana* e *S. chilensis*. (LOPES-BEZERRA et al., 2018).

- ***Sporothrix mexicana***

Esporotricose por *S. mexicana* já foi descrita em Portugal em caso ocorrido em homem de 34 anos com múltiplas lesões polimórficas e úlceras em ambos os pés. Inicialmente as lesões foram confundidas com eczema disidrótico e abordado com corticosteróides tópicos. Fragmentos de tecido cutâneo foram submetidos à pesquisa micológica e a cultura revelou *Sporothrix* sp. Testes de assimilação da dextrose, sacarose, rafinose mostraram características fenotípicas típicas de *S. mexicana*. O DNA genômico foi obtido da fase leveduriforme e o sequenciamento parcial do gene da calmodulina foi baseado na reação de PCR utilizando os primers CL1 e CL2a, confirmando a espécie em questão. Pode-se considerar que a *S. mexicana* é uma espécie emergente causadora de esporotricose humana (DIAS et al., 2011).

- ***Sporothrix chilensis***

A combinação de filogenia, evolução, morfologias e ecologias tem permitido grandes avanços no entendimento da taxonomia das espécies *Sporothrix*, incluindo membros que exibem estilos de vida distintos, como sapróbios, patógenos humanos / animais e simbioses de insetos.

(RODRIGUES et al, 2016). Só recentemente foi proposta a espécie *Sporothrix chilensis* para acomodar saprófitas basais associadas ao solo e madeira em decomposição, e que apenas raramente provocam doença humana. O *S. chilensis* já foi isolado em caso clínico de onicomicose e principalmente em áreas ambientais do Chile.(RODRIGUES et al, 2016).

Análises multigênicas baseadas na região ITS1 / 2 p 5.8s, beta-tubulina, calmodulina e alongamento de translação 1a revelaram que *S. chilensis* é um membro do complexo *Sporothrix pallida*, do ponto de vista taxonômico mais próximo ao *Sporothrix mexicana*, uma espécie rara do solo, não patogênico para humanos. Embora *S. chilensis* não seja um patógeno primário, a infecção acidental pode ter um impacto na população imunossuprimida (RODRIGUES et al, 2016).

2.3.7 Perfil de Susceptibilidade Antifúngica

Existem resultados variados na literatura - com algumas discordâncias - entre os padrões de susceptibilidade antifúngica das drogas frente aos isolados do Complexo *Sporothrix*. Isto provavelmente se deve a diferenças nos genótipos dos isolados, variações nos tempos e temperaturas na incubação, modificações dos protocolos dos testes de susceptibilidade, a fonte dos isolados (ambiental, animal ou humano) e, eventualmente a sua origem geográfica (BORBA-SANTOS et al, 2015; MAHMOUDI et al., 2016; SILVEIRA et al., 2009; CLSI et al., 2008; GALHARDO et al., 2008; STOPIGLIA et al., 2014). Essa variação de susceptibilidade encontrada destaca a necessidade para a identificação detalhada das espécies e sua respectiva susceptibilidade antifúngica a fim de determinar o regime terapêutico mais apropriado para o indivíduo afetado. (MARIMON et al., 2008; MAHMOUDI et al., 2016; STOPIGLIA et al., 2014).

Embora a forma filamentosa seja a forma infectante do complexo *Sporothrix sp.*, a maioria dos estudos de sensibilidade antifúngica tem usado a forma filamentosa do fungo, provavelmente devido ao aumento do requerimento nutricional associadas à técnica de conversão de fase de crescimento (MARIMON et al., 2008; SILVEIRA et al., 2009; ALVARADO-RAMIREZ et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; MAHMOUDI et al., 2016). Entretanto, estudos vêm mostrando que a concentração inibitória mínima para a fase filamentosa e leveduriforme são diferentes (BORBA-SANTOS et al, 2015; MAHMOUDI et al., 2016). Assim, os testes de sensibilidade devem ser realizados em ambas as fases de crescimento (MAHMOUDI et al., 2016).

Os testes de susceptibilidade antifúngica seguem protocolos M27-A3 e M38-A2 para as formas leveduriforme e miceliais respectivamente (CLSI, 2008). Soluções das drogas são preparadas por dissolução de quantidade apropriada do pó dos antifúngico (itraconazol, terbinafina, voriconazol, anfotericina B), em DMSO e o fluconazol, em água deionizada. Em seguida os fármacos são diluídos de forma dupla, utilizando o meio RPMI 1640 (a um pH 7,0 tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico a 0,165M). A concentração das soluções das drogas e a densidade dos inóculos e suspensões conidiais devem ser ajustadas com base nos valores recomendados do CLSI (CLSI, 2008). Para determinar a viabilidade da levedura e dos conídios, 100 µl de cada suspensão é espalhada sobre ágar Sabouaud Dextrose (DAS) e incubado a 30° C por 5-7 dias. As microplacas devem ficar incubadas durante 46-50h a 35° C durante as fases micelial e de levedura.(MAHMOUDI, 2016; CSLI, 2008). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) para anfotericina, voriconazol e itraconazol são definidos como a concentração mínima que inibe 100% do crescimento do fungo; o CIM da terbinafina foi definido como a concentração mínima que inibe 80% do crescimento; e o CIM para fluconazol, que inibe 50% do crescimento, quando comparados aos controles livres de droga. (MAHMOUDI et al., 2008; STOPIGLIA et al., 2014).

Estudo de susceptibilidade antifúngica *in vitro* com 92 isolados de diferentes espécies mostrou que a terbinafina foi a droga mais efetiva, mostrando média geométrica (GM) CIM de 0,23 µg/ml para todas as espécies testadas, seguido o cetoconazol com GM CIM de 0,84 µg/ml (MARIMON et al., 2008). Entretanto o cetoconazol foi menos ativa contra *S. mexicana* (GM CIM 4 µg/ml) e *S. albicans* (GM CIM 3,2 µg/ml) do que contra as demais espécies. Logo, a atividade antifúngica do cetoconazol apresentou uma variabilidade de inibição maior que a terbinafina, a depender das espécies testadas. Itraconazol só mostrou boa atividade contra o *S. brasiliensis*, já que para as demais espécies testadas, mostrou altas CIMs.

Outros autores têm mostrado pobre atividade *in vitro* do itraconazol. Contudo, esta droga tem demonstrado eficácia em tratamentos clínicos (MARIMON et al., 2008). Fluconazol e voriconazol mostram pobre atividade inibitória contra espécies de *Sporothrix*, com GM CIM muito altos. Para voriconazol, os GM CIM variaram de 3.88 a 27,2 µg/ml, segundo Marimon et al. (2008) e McGinnis et al. (2001).

Das drogas usadas para infecção sistêmica, o posaconazol parece ser a mais efetiva, sendo a terceira droga antifúngica com maior atividade inibitória contra o *Sporothrix*., com GM CIM de 1,59 µg/ml (MARIMON et al., 2008). Em infecções generalizadas graves, constitui um agente terapêutico promissor, superior à anfotericina B e ao itraconazol, contra espécies de *S.*

brasiliensis, *S. albicans* e *S. schenckii*. (MARIMON et al., 2008). Estudos *in vivo* são necessários para confirmar esta atividade.

Em locais em que a esporotricose é incomum, como no Irã, já houve a determinação do perfil de susceptibilidade *in vitro* de nove isolados do complexo *Sporothrix*. A terbinafina também mostrou a maior atividade anti-*Sporothrix* com baixos CIMs, seguido pelo itraconazol e anfotericina. O fluconazol e o voriconazol tiveram altos CIMs (64->64 µg/ml e 8->16 µg/ml, respectivamente). Houve diferença estatística entre os CIMs das fases micelial e leveduriforme da anfotericina e terbinafina contra o *S. schenckii*, mas não contra a *S. globosa* (MAHMOUDI et al., 2016), como já relatado por Kohler et al. (2006) na fase filamentosa com as espécies de *S. schenckii*, que mostram CIMs mais altos frente à anfotericina.

Estudo de Oliveira et al, (2001), sobre susceptibilidade antifúngica de espécies identificadas no Rio Grande do Sul, Brasil, de isolados de gatos, cães e humanos, mostrou maior eficácia *in vitro* da terbinafina, cetoconazol e anfotericina, enquanto o fluconazol (CIM 32 a 128 µg/ml) e caspofungina (CIM de 8 a 32 µg/ml) fora menos ativos. O itraconazol foi efetivo contra espécies de *S. brasiliensis* e *S. albicans*, concordando com os achados de Marimon et al (2008); contudo os isolados de *S. schenckii* foram mais susceptíveis a esta droga do que mostrado por outros autores (OLIVEIRA, 2011). Estudo de Kohler et al. (2004) e Marimon et al.(2010) relataram ainda que isolados de origem animal são mais resistentes ao itraconazol que os de origem humana (KOHLE et al., 2004; MARIMON et al., 2010); dando suporte a esta observação, Oliveira et al. encontraram resistência ao itraconazol em duas das sete espécies de origem animal e nenhum dos 31 isolados de origem humana. Neste mesmo estudo, os CIMs da anfotericina e terbinafina foram similares em espécies isoladas de humanos ou animais e foi encontrada uma marcada resistência a azólicos do *S. luriei*. (OLIVEIRA et al, 2011).

Stopiglia et al. avaliaram a susceptibilidade antifúngica de 85 isolados do Complexo *Sporothrix*, provenientes de diferentes estados do Brasil (Minas Gerais n=15; Rio de Janeiro n=20; São Paulo n=19 e Rio Grande do Sul n=31). Terbinafina, cetoconazol e itraconazol mostraram baixos CIMs (0,01-0,5 µg/ml; 0,03-1,0 µg/ml e 0,03 -16,0 µg/ml, respectivamente), enquanto o fluconazol e voriconazol revelaram altos MICs (8-128 µg/ml e 1-16 µg/ml, respectivamente). Os isolados brasileiros mostraram susceptibilidade semelhante aos agentes antifúngicos testados, com exceção dos isolados de Minas Gerais e São Paulo, que apresentaram CIMs mais altos para cetoconazol, respectivamente (STOPIGLIA et al., 2014). Conforme já evidenciado em outros estudos (Mc GINNIS et al., 2001; ALVARADO-RODRIGUEZ et al., 2007; SILVEIRA et al., 2009), há uma vasta variabilidade da susceptibilidade frente à

anfotericina indicando que a susceptibilidade antifúngica é espécie dependente (STOPIGLIA et al., 2014). Curiosamente, o estudo de Stopiglia não mostrou diferença estatística no padrão de susceptibilidade das espécies do complexo *Sporothrix*, em desacordo com Marimon et al, (2008). No entanto, apesar do pouco número de isolados de *S. globosa*, estes foram obtidos no Brasil, enquanto Marimon et al. avaliaram isolados de diferentes países. Portanto, a diferença no perfil de susceptibilidade a agentes antifúngicos pode estar também relacionado à diferentes origens geográficas do fungo. (STOPLIGLIA et al., 2014).

Rodrigues et al., em 2014, avaliaram a diversidade genética e a susceptibilidade antifúngica, através da metodologia publicada pelo CLSI, de 68 agentes causadores de esporotricose, dos quais 65 eram de fonte humana. Os triazólicos itraconazol e o posaconazol mostraram melhor atividade contra o *S. brasiliensis*, com CIMs variando de 0,25 a 4 µg/ml e 0,5 a 2 µg/ml, respectivamente. As CIMs para o itraconazol foi menor na *S. brasiliensis* que quando comparado ao *S. schenckii* e *S. mexicana*. A CIM para o posaconazol foi discretamente maior contra o *S. schenckii* quando comparado o *S. brasiliensis*. Neste mesmo estudo, foi detectada moderada atividade da anfotericina B contra os isolados do *S. brasiliensis* com CIMs de 1 a 8 µg/ml, enquanto a caspofungina, a 5-fluorocitosina, o fluconazol e o voriconazol mostraram baixa atividade. Todas as drogas testadas demonstraram pobre eficácia *in vitro* contra *S. globosa* e *S. mexicana* (RODRIGUES et al., 2014).

O mecanismo molecular existente por trás do recente surgimento de fenótipos de *Sporothrix* resistentes a múltiplas drogas é desconhecido (RODRIGUES et al., 2014). No entanto, por analogia ao que vem sendo observado com infecções resistentes de outros fungos (como *Criptococcus* sp, *Candida* spp. e *Aspergillus*), a resistência pode decorrer, em parte, do uso prolongado e indiscriminado de triazóis (RODRIGUES et al., 2014). Resistência a azólicos pode ocorrer por diversos mecanismos, desde uma regulação positiva de genes transportadores de drogas que levaria a um efluxo de azóis, reduzindo o acúmulo da droga, a múltiplas alterações genéticas da enzima alvo impedindo a ligação ao azólico ou até pela alteração do metabolismo e superexpressão do ergosterol. Mais recentemente, estudos genéticos correlacionando a resistência antifúngica e a alteração no número de cópias cromossômicas e arquitetura genômica têm trazido visão ampliada sobre os mecanismos moleculares que regem o fenótipo da resistência aos azóis. (RODRIGUES et al., 2014). A existência de agentes do Complexo *Sporothrix* resistentes a múltiplos fármacos reforça a necessidade uma triagem de sensibilidade contínua. (RODRIGUES et al, 2014).

Apesar de haver efetividade no tratamento com a maioria das drogas utilizadas, a longa duração da terapia e sua possível toxicidade torna necessário explorar novas alternativas para o tratamento de infecções graves (MARIMON et al., 2008).

Os achados da maioria dos estudos reforçam a importância de identificar as espécies do *Sporothrix*, como proposto por Marimon et al. (2007). Avaliar os padrões de susceptibilidade antifúngica dos isolados de *Sporothrix* pode trazer implicações para a escolha apropriada da terapia antifúngica em diferentes grupos de risco epidemiológico, tendo um substancial impacto no resultado do tratamento clínico de cada caso de esporotricose. (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2014). É fundamental estabelecer a conexão entre os dados clínicos e *in vitro* de resistência entre as diferentes espécies de *Sporothrix* em novos estudos, assim como determinar os mecanismos moleculares envolvidos com os diferentes perfis de resistência a drogas as espécies de *Sporothrix* (RODRIGUES et al., 2014).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O exato período de incubação permanece desconhecido, podendo variar de poucos dias a alguns meses, com média em torno de 3 semanas (MAHAJAN et al., 2014). A pele e os vasos linfáticos locais são envolvidos primariamente após a inoculação do fungo, levando ao desenvolvimento de um pequeno nódulo ou pápula, indurada, que cresce progressivamente no sítio de inoculação, podendo ulcerar (cancro esporotricóide), sem provocar sintomas sistêmicos. Este pode permanecer como tal ou progredir para lesões múltiplas. (REED, 1993; KAUFFMAN, 2007; MAHAJAN et al., 2014). A partir daí, a esporotricose pode se apresentar sob várias formas clínicas: linfocutânea, cutânea fixa, cutânea disseminada e disseminada extracutânea.

A esporotricose extracutânea ou sistêmica ocorre por disseminação hematogênica a partir de um foco de inoculação primário, linfonodo ou mais comumente a partir da doença pulmonar em pacientes imunossuprimidos.

Em crianças, a manifestação da doença é similar, mas o envolvimento facial é mais frequente, desde 40-60% nesta faixa etária, a até 97% dos casos em algumas séries. (ROSA et al., 2005; BONIFAZ et al., 2007).

Alguns isolados do *Sporothrix* spp. no Brasil parecem suscitar quadro clínico distinto, com mais manifestações imunes (eritema multiforme e nodoso), lesões disseminadas e formas atípicas (GUTIERRESZ-GALHARDO et al., 2005; SCHUBACH et al. 2005).

2.4.1 Formas clínicas

A variação do espectro clínico da esporotricose tem sido atribuída a fatores como o modo de inoculação, o tamanho e a profundidade do inóculo, a imunidade do hospedeiro e virulência e termotolerância da linhagem. (DIXON et al., 1991; MAHAJAN et al., 2014).

- **ESPOROTRICOSE LINFOCUTÂNEA**

É a forma mais comum de esporotricose e representa cerca de 70-80% dos casos de esporotricose cutânea (MORRIS-JONES et al., 2002; MAHAJAN et al., 2014). As extremidades são afetadas mais frequentemente. Uma lesão nódulo-ulcerativa (cancro esporotricótico) no sítio de inoculação e uma série de nódulos similares ao longo do trajeto dos vasos linfáticos proximais, com ou sem adenopatia satélite, caracteriza esta forma clínica. As lesões secundárias que aparecem em trajeto linear variam de morfologia, desde pápulas eritematosas, a nódulos ou placas, com superfície lisa ou irregular, podendo ulcerar descarregando material seropurulento. São, em geral, assintomáticos, mas podem coçar ou tornarem-se dolorosos, com curso indolente semelhante à lesão primária. (MAHAJAN et al., 2014).

- **ESPOROTRICOSE CUTÂNEA FIXA**

Ocorre menos comumente e é caracterizada por lesões localizadas no sítio de inoculação. Representa cerca de 20% dos casos de esporotricose. Envolvimento facial ocorre mais frequentemente na esporotricose cutânea fixa que na variante linfocutânea, mas em algumas regiões da Índia, parece predominar em membros (RAMESH et al., 2011; MAHAJAN et al., 2014). As lesões são assintomáticas, eritematosas e apresentam-se sob forma de lesões papulosas, papulopustulosas, nódulos ou placas verrucosas e ocasionalmente como úlceras que não cicatrizam ou pequenos abscessos. Lesões satélites podem ser observadas.

As lesões podem se assemelhar a ceratoacantomas, celulite facial, pioderma gangrenoso, prurigo nodular, lúpus vulgar, sarcoma de partes moles, carcinomas basocelulares, erisipelóide ou rosácea (MAHAJAN et al., 2014).

Esta forma clínica ocorre frequentemente em hospedeiros com alta resistência em que lesões mínimas podem involuir espontaneamente ou persistir se não for introduzido tratamento. Tende a responder melhor a intervenções farmacológicas. (RATHI et al., 2003, MAHAJAN et al., 2014).

- ESPOROTRICOSE CUTÂNEA DISSEMINADA OU MULTIFOCAL

É uma variante raramente descrita, corresponde de 1 a 8% dos casos de esporotricose (BONIFAZ et al., 2017), caracterizada pela presença de pelo menos três lesões cutâneas envolvendo dois locais anatômicos diferentes e refletem o acometimento cutâneo após implantações traumáticas múltiplas do fungo ou mais raramente por propagação hematogênica, com ou sem fatores predisponentes para imunossupressão. (PAPPAS et al., 2000; DE LIMA BARROS et al., 2003; MAHAJAN et al., 2014).

Alguns autores sugerem que a diversidade clínica da esporotricose possa estar relacionada à virulência das espécies do complexo *Sporothrix* (BARROS et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013; SONG et al., 2013), no entanto outros acreditam que as manifestações clínicas dependam predominantemente do *status* imune do hospedeiro. Neste contexto, Zhang et al. isolaram uma cepa de *S. schenckii* de um paciente com esporotricose cutânea disseminada e identificaram uma supressão de 10 pb na região NTS, sugerindo que existam alguns isolados com maior virulência capazes de gerar casos disseminados. (ZANGH et al., 2011).

Em estudo retrospectivo de 1990-2015, Bonifaz et al. encontraram 24 casos de casos de esporotricose cutânea disseminada de um total de 124 casos estudados, sendo o diabetes descompensado e o alcoolismo crônico os fatores predisponentes mais frequentes para esta forma clínica de esporotricose. Essas condições justificam a deterioração imunológica relacionada à resposta celular, especialmente a disfunção de macrófagos. A associação com HIV/aids foi encontrada em 16,6% dos casos, ocorrendo em pacientes com contagem de células T CD4 < 200 células/mm³ (BONIFAZ et al., 2017). É importante enfatizar que 7,5% dos pacientes com HIV/aids e esporotricose desenvolveram a síndrome da reconstituição imune sistêmica, associada ao envolvimento do sistema nervoso central (MOREIRA et al., 2015).

Em uma grande série de casos relatada na China, esporotricose cutânea disseminada representou 1,75% de todos os casos de esporotricose (SONG et al., 2013). As manifestações cutâneas nesta variante podem não ser típicas. Observam-se pápulas eritematosas, vesicopústulas e nódulos subcutâneos, ulcerações e lesões crostosas hiperkeratóticas (CHANG et al., 2013). Em relato publicado por Patel et al., as manifestações dermatológicas de quadro de esporotricose disseminada foram inicialmente confundidas com o sarcoma de kaposi, pelo aspecto de placas purpúricas a enegrecidas no tronco (PATEL et al., 2016).

Esta forma cutânea também já foi relatada em pacientes com linfoma de Hodgkin, leucemia, terapias com corticosteroides e gravidez. (BARROS et al. 2012, SONG et al., 2013, BONIFAZ et al., 2017).

- **ESPOROTRICOSE EXTRACUTÂNEA E DISSEMINADA SISTÊMICA**

Esporotricose disseminada é uma forma clínica rara, porém grave da infecção e ocorre quando há envolvimento visceral de múltiplos órgãos, mais comumente em pessoas com imunossupressão. Embora pacientes infectados pelo HIV tenham risco aumentado de desenvolvimento potencial de infecções fúngicas profundas e disseminadas, a esporotricose é encontrada de forma relativamente incomum. Há poucos dados sobre a coinfeção esporotricose – HIV, contudo, quando ela ocorre, é mais frequentemente disseminada e com contagem de células T CD4 muito baixa. (MOREIRA et al., 2015).

Em 2012, Freitas descreveu 21 casos de esporotricose em pacientes com HIV no Rio de Janeiro, dos quais 7 manifestaram doença disseminada, sendo cinco com disseminação exclusivamente cutânea e um deles com meningoencefalite (FREITAS et al., 2012). Destes, quase todos os pacientes tinham contagem de CD4 menor que 200 células/mm³ (apenas dois tinham CD4 de 488 e 212). Em contraste, todos os casos de doença linfocutânea e fixa tinham CD4 maior que 200 (FREITAS et al., 2012).

Embora esta forma clínica predomine em doença imunodeprimidos, a esporotricose disseminada também tem sido relatada em pacientes imunocompetentes. (SHARON et al., 2013).

2.4.2 Manifestações de hipersensibilidade

Os primeiros relatos de manifestações de hipersensibilidade acompanhando episódios de infecção por esporotricose, surgiram após os anos 2.000, no Rio de Janeiro. De Lima Barros, em coorte, descreveu a presença de eritema nodoso e polimorfo em alguns pacientes, mas ainda considerado um fenômeno raro. Outros relatos foram publicados no sudeste do País (PAPAIORDANOU et al., 2015).. Em 2008, episódios de arite de joelho isolada, sem detecção de invasão fúngica local foi descrito acompanhando caso de esporotricose cutânea (OROFINO-COSTA et al. 2008).

Xavier et al., e, 2013, descreveram um caso de eritema nodoso intenso em paciente jovem com lesão fixa de esporotricose. Esta paciente foi conduzida com antifúngico (itraconazol) e antiinflamatórios não-hormonais.

O primeiro relato de Síndrome de Sweet associado à esporotricose foi realizado em 2011, quando duas mulheres de 47 anos desenvolveram placas eritematosa e purpúricas extensas em tronco e ombros durante infecção pelo *Sporothrix* (FREITAS, 2012). Fatores como a transmissão repetida e intensa do inóculo por gatos, a susceptibilidade do hospedeiro e o patógeno mais virulento poderiam explicar a existência de manifestações de hipersensibilidade (FREITAS, 2012).

A associação de manifestações atípicas, com reações de hipersensibilidade já foram descritas em associação com o *S. brasiliensis*.(ALMEIDA-PAES et al., 2014).

2.5 DIAGNÓSTICO DA ESPOROTRICOSE

Suspeição clínica é a base para o diagnóstico precoce de esporotricose, já que as lesões cutâneas fazem diagnóstico diferencial com tuberculose cutânea, leishmaniose tegumentar, nocardiose, cromomicose, blastomicose, paracoccidioidomicose e micobacterioses atípicas. Lesões ulceradas podem mimetizar também quadros de pioderma gangrenoso (MAHAJAN et al., 2014).

Mesmo que as lesões linfocutâneas tenham uma apresentação clássica em muitos casos, algumas doenças como micobacterioses atípicas, nocardiose e leishmaniose, podem produzir lesões semelhantes às observadas na esporotricose (SMEGO et al., 1999; KAUFFMAN et al., 2007). Analogamente, por causa da raridade de ocorrência e da semelhança com infecções por outros fungos ou micobactérias, o diagnóstico da infecção visceral de esporotricose muitas vezes ocorre de forma atrasada, (KAUFFMAN et al., 2007). Confirmação diagnóstica é fundamental para iniciar tratamento.

2.5.1 Exame Direto

Exame direto do esfregaço de secreção purulenta ou de espécime de biópsia cutânea, na maioria das vezes, não é diagnóstica, devido à escassez de células fúngicas. Citologia por aspiração por agulha fina de uma lesão, particularmente em sítios extracutâneos ou formas disseminadas, podem ocasionalmente mostrar granulomas epitelioides, estruturas leveduriforme PAS positivas conhecidas como corpos asteroides, e/ou células leveduriforme elípticas ou em forma de naveta ou charuto quando clarificadas com hidróxido de potássio ou

corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) ou pela metnamina de prata (método de Grocott-Gomori ou GMS) (MAHAJAN et al., 2014).

Civilla et al. demonstraram a presença de corpos asteroides de *S. schenckii* em quase 86% dos casos de 36 pacientes com esporotricose linfocutânea e em 6 pacientes com forma fixa. Aproximadamente 95% desses casos também tiveram culturas positivas para *Sporothrix*. (CIVILLA et al., 2004). Entretanto, a sensibilidade e especificidade do exame microscópico direto de amostras de tecido permanecem pouco estudada porque a maioria dos pesquisadores o considera uma ferramenta de diagnóstico inútil devido à pobreza de células fúngicas (MAHAJAN et al., 2014).

2.5.2 Cultura micológica

A cultura para *S. schenckii* em meio artificial permanece como o método *gold standard* para estabelecer o diagnóstico de esporotricose. Material de lesão cutânea pode ser aspirada ou raspada com lâmina de bisturi ou uma biópsia pode ser realizada para obter fragmento tecidual (KAUFFMAN et al., 2007).

O isolado clínico de *Sporothrix* pode crescer a partir de fragmento de biópsia de pele ou outras amostras (escarro, pus, líquido sinovial, material de drenagem óssea e líquido cefalorraquidiano) no meio Ágar Sabouraud dextrose (SDA) ou Mycosel a 25° C e o crescimento em fase filamentosa é visível após 3-5 dias a 2 semanas do cultivo. Em 89% dos casos, o isolamento do *S. schenckii* ocorre dentro de 8 dias, mas em alguns casos pode levar até 4 semanas para que ocorra o crescimento da colônia (PAPPAS et al., 2000).

A conversão para a fase de levedura é possível para identificar o *S. schenckii*, a formação dos conídios é característica na fase filamentosa (KAUFFMAN et al., 2007). Incubação de culturas a 37°C no ágar sangue cisteína-glicose ou infusão coração-cérebro pode produzir formas leveduriforme. As colônias cultivadas crescem inicialmente com cor creme em ASD a 25°C, têm superfície suave e úmida, mas tornam-se marrom-enegrecidas após algumas semanas devido à produção de melanina, que o protege da fagocitose e da morte por monócitos e macrófagos humanos e proteinases extracelulares (MORRIS-JONES et al., 2002; MAHAJAN et al., 2014).

Microscopicamente, o *Sporothrix* spp. apresentam hifas septadas de ramificações delicadas com conidióforos com extremidades afiladas que suportam conídios piriformes em arranjo de “flor”, ou como conídios individuais de parede grossa castanha escura anexadas diretamente à hifa, muitas vezes em padrão denso, em forma de “manga de camisa”. Na prática,

o *Sporothrix* sp. é geralmente identificado pela morfologia da colônia, aparência microscópica e dimorfismo de temperatura (capacidade de existir como filamento filamentoso a 25° C e como levedura a 37 °C) (MORRIS-JONES et al., 2002; KAUFMANN et al., 1999). A análise morfológica do microcultivo não é capaz de distinguir as diferentes espécies do complexo *Sporothrix*. (RODRIGUES et al., 2015).

2.5.3 Exame histopatológico

A histopatologia é usualmente inespecífica e mimetiza outras doenças granulomatosas (infecções fúngicas profundas, tuberculose cutânea, hanseníase, sarcoidose e granulomas de corpo estranho). As características histológicas variam de inflamação aguda ou crônica com formação de granulomas de células epitelióides com células gigantes de Langhans ou tipo corpo estranho em ambos os pólos, além de inflamação crônica granulomatosa inespecífica da derme no meio desse espectro (MAHAJAN et al., 2005). Revelam desde aspecto granulomatoso a processo inflamatório supurativo. (KAUFFMAN et al., 2007)

As principais características histopatológicas da esporotricose cutânea fixa incluem ulceração central da epiderme, hiperqueratose na borda, acantose e hiperplasia epidérmica que podem variar até uma extensa hiperplasia pseudoepiteliomatosa. Abscessos neutrofílicos podem ser vistos na derme e/ou epiderme. Usualmente há um denso infiltrado celular composto de linfócitos, plasmócitos e um número variável de histiócitos epitelióides, células gigantes e eosinófilos na derme média e superior com ou sem proliferação fibrocapilar. (HIRSCH et al., 1984)

Nódulos de esporotricose classicamente mostram três zonas concêntricas: uma zona necrótica central contendo debris amorfos e leucócitos polimorfonucleares (zona de supuração crônica), uma zona intermediária tuberculóide composta por células epitelióides, células gigantes (predominantemente células tipo Langhans) e uma outra zona periférica composta de numerosos plasmócitos, linfócitos e fibroblastos com hiperplasia capilar proeminente e proliferação (zona sifilóide). Em lesões antigas, este aspecto de zoneamento torna-se difícil de ser identificado (HIRSCH et al., 1984; MAHAJAN et al., 2005).

Elementos fúngicos são difíceis de serem visualizados devido ao pequeno número desses organismos no tecido (KAUFFMAN et al., 2007). Quando presentes, são visualizados com as colorações de PAS e GMS dentro destas zonas, nas secções histológicas. Apresentam-se sob a forma de células leveduriformes globosas, medindo 3-8 µm de diâmetro (em 84% dos casos), células em formato de cigarro medindo 1-2 x 4-5 µm (em 33% dos casos) ou formas

ovais a redondas ou leveduras em brotação simples dentro do citoplasma de células gigantes ou no centro de corpos asteroides. (MORRIS-JONES et al., 2002; RODRIGUES et al., 1998).

Corpos asteroides, de tamanho de 15-35 μm de diâmetro são comumente vistos em 40-85% dos casos de esporotricose crônica como estruturas extracelulares dentro dos abscessos. Embora observados mais frequentemente na variante linfocutânea, eles não diferem morfológicamente daqueles vistos na forma fixa de esporotricose (MORRIS-JONES et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 1998; DA ROSA et al., 2005). Fenômeno de Splendore-Hoepli ocorre quando um dos elementos fúngicos é envolvido por material eosinofílico irradiado centrifugamente em aspecto de “*sunburst*”, com sua porção central reagindo imunohistoquimicamente com um anticorpo anti-*Sporothrix schenckii* e talvez represente uma interação imunológica entre o hospedeiro e o patógeno (CIVILLA et al., 2004; HIRSH et al., 1984). Contudo, a presença de corpos asteroides ou fenômeno de Splendore-Hoepli não são patognomônicos e podem ser observados em outras doenças infecciosas e/ou granulomatosas. (CIVILLA et al., 2004).

2.5.4 Testes intradérmicos

O significado do teste intradérmico para detectar hipersensibilidade retardada à esporotriquina ou ao antígeno do peptídeo rhamnomann (PRM) permanece ambíguo. Eles são negativos nos casos de esporotricose grave ou disseminada e muitas vezes são positivos em pacientes curados ou em pessoas saudáveis vivendo em áreas endêmicas. (MAHAJAN et al., 2005). A sua principal utilização é em inquéritos epidemiológicos para estudos de prevalência em determinadas áreas geográficas, Vale destacar que esta técnica está cada vez mais em desuso. (RODRIGUES et al., 1996).

2.5.5 Outros testes

- Detecção de anticorpos, Testes moleculares e outros testes diagnósticos

O método *gold standard* para diagnóstico da esporotricose consiste no isolamento e identificação do fungo a partir do exsudato e/ou espécimes de biópsia. Entretanto, novas tecnologias podem oferecer vantagens sobre os métodos tradicionais por serem não invasivos e mais sensíveis para o diagnóstico diferencial de doenças infecciosas (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015). Apesar da necessidade do desenvolvimento de métodos moleculares mais específicos para o diagnóstico da esporotricose, e também para a identificação das diferentes espécies de *Sporothrix*, estes tipos de testes só vêm sendo utilizado em pesquisas clínicas, mas não na rotina assistencial.

O desenvolvimento de um teste sorológico, como o ELISA com o antígeno SsCBF é importante, pois pode ser usado como uma ferramenta complementar para os estudos moleculares, assim como na monitorização terapêutica. (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2005; OROFINO-COSTA et al., 2010). Além disso, poderia ser usado na prática médica, nos casos em que há necessidade de identificar a espécie envolvida ou na impossibilidade de isolar o agente, como nas formas atípicas e extra cutâneas da doença. Continuam tendo valor limitado na prática clínica por sua indisponibilidade para uso rotineiro. No entanto, podem ser úteis para suscitar suspeita de diagnóstico para, em seguida, partir para investigação mais invasiva e detalhada (MAHAJAN et al., 2014).

Estudo de Bernardes-Engeman et al. mostraram que o ELISA (enzyme-linked immunoabsorbent assay) detecta títulos IgG contra o antígeno da fração SsCBF - apresenta 90% de sensibilidade e 80% de especificidade com as diferentes amostras de soro de pacientes com manifestações clínicas de esporotricose já confirmadas pelo isolamento do agente (*gold standard*) (BERNARDES-ENGEMAN et al., 2005).

Análise de anticorpos por imunoblotting ou ELISA, aglutinação, testes de fixação de complemento, imunohistoquímicos, imunofluorescência, imunodifusão e técnicas de imunoeletroforese e detecção do *Sporothrix* por PCR (reação da cadeia da polimerase) ou PCR-RFLP (Reação da cadeia da polimerase- análise do polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição) do gene da calmodulina são úteis no diagnóstico de formas mais raras, como a extracutânea e as formas disseminadas (MAHAJAN et al., 2014).

A presença de altos títulos de anticorpos do fluido cerebrospinal maiores que os títulos séricos podem indicar meningite esporotricótica. O ELISA tem demonstrado sensibilidade de 90% e eficácia de 86% quando testada contra soro de pacientes com qualquer forma de esporotricose (MAHAJAN et al., 2014).

Em 2015, foi realizado estudo de validação, análise e aplicabilidade do ELISA para diagnóstico da esporotricose humana. Foram avaliadas 177 amostras de soro de pacientes com a doença, coletados no período de 1998 a 2008, no Rio de Janeiro. O ELISA mostrou baixa taxa de reação cruzada baseada nos valores de referência dos testes diagnósticos, além de alta acurácia, mesmo em pacientes pediátricos e indivíduos com HIV. A análise da curva ROC (Receiver Operating Characteristic) mostrou área sob a curva de 0,9154. (BERNARDES-ENGEMANN et al., 2015). Este estudo mostrou uma reprodutibilidade de 98% do teste. Resultados falsos-negativos podem ocorrer por várias razões, quer pela reatividade individual, quer pela combinação com uma anergia espécie-específica.

Nos últimos anos, novos métodos de diagnóstico têm sido introduzidos a fim de prescindir a necessidade dos métodos tradicionais de cultivo e acelerar a identificação do agente. Os métodos de detecção molecular podem ser mais práticos e mais rápidos. Até o presente momento, entretanto, foram poucas as propostas de métodos baseados em detecção molecular para o diagnóstico da esporotricose e, certamente, ainda há muito o que fazer para torná-los mais simples e baratos. Tomando por base o gene da quitina sintetase, foram desenvolvidos *primers* de oligonucleotídicos específicos para a detecção molecular do *S. schenckii* em biópsias de pacientes (KANO et al., 2001). Tendo como alvo iniciadores específicos para a sequência do gene rRNA 18S, foi possível, pela técnica de Nested-PCR, detectar DNA genômico de *S. schenckii* em amostras coletadas de pacientes (HU et al., 2003), tornando mais ágil o diagnóstico da esporotricose. Além disso, possibilitou o esclarecimento de casos clínicos em que tanto os testes histoquímicos como a cultura foram negativos (HU et al., 2003). Conjuntos de *primers* de oligonucleotídeos alvos para o gene da topoisomerase II foram utilizados para a identificação do *S. schenckii* por PCR (KAMBE et al., 2005). Sondas específicas de DNA foram empregadas na identificação de fungos dimórficos, incluindo o *S. schenckii*, isolados de casos clínicos pela detecção de produtos da amplificação de PCR por meio de ensaios imunoenzimáticos (LINDSLEY et al., 2001). PCR-RFLP do DNA mitocondrial é supostamente útil para identificação, determinar a taxonomia e epidemiologia do *Sporothrix*, mas disponíveis apenas em contexto de pesquisa. (ARENAS et al., 2005)

2.5.6 Exames de Imagem

Exames de imagem não são utilizados rotineiramente para o diagnóstico de esporotricose a menos que o envolvimento sistêmico seja suspeitado. Radiografias de tórax e tomografias computadorizadas podem ser úteis para avaliação de esporotricose pulmonar ou de outras áreas envolvidas (como osteoarticular). São úteis para orientar o manejo terapêutico por demonstrar outros sítios de acometimento, mas não são suficientes para dar diagnóstico específico de esporotricose. (MAHAJAN et al., 2014)

2.6 TRATAMENTO

2.6.1 Tratamento farmacológico

O prognóstico da esporotricose é excelente quando o diagnóstico é estabelecido e tratamento prontamente instituído. A doença precisa de tratamento farmacológico, apesar de haver relatos isolados de regressão espontânea (KAUFFMAN et al., 2007; RAMOS E SILVA et al., 2007). A terapia de escolha depende da forma clínica, localização da doença e status

clínico do indivíduo. Resolução espontânea é extremamente rara (KAUFFMAN et al., 1995; PAPPAS et al., 2000; MAHAJAN et al., 2014)

Não há estudos bem controlados para tratamento de esporotricose e vários consensos e recomendações de tratamento são empíricos e baseados em relatos de casos, revisões retrospectivas e ensaios não randomizados (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014). Baixo custo, facilidade na administração, perfil de segurança e o local da infecção (se localizada ou disseminada) frequentemente ditam a escolha da terapia. Infecções sistêmicas e graves irão requerer tratamento mais agressivo e, conseqüentemente, necessitam de uma maior vigilância quanto à toxicidade associada a drogas (MAHAJAN et al., 2014).

Resolução clínica da infecção ativa e a erradicação do *S.schenckii* nos tecidos continuam sendo os objetivos desejados dos tratamentos. A duração do tratamento costuma variar de 3-6 meses, mas o tempo de tratamento da esporotricose permanece arbitrário, devendo continuar por pelo menos 4-6 semanas após a remissão clínica completa para o sucesso da cura. Embora o tratamento seja prolongado e caro, a recuperação da pele do sítio acometido muitas vezes acontece sem cicatriz (MAHAJAN et al., 2014). No entanto, quando há comprometimento da função pulmonar (em pacientes com doenças pulmonares prévias), incapacidade grave da esporotricose osteoarticular crônica ou em quadros extensos de pele, pode haver sequelas cicatriciais (SHARMA et al., 2007; SHIMIZU et al., 2017). Pacientes com imunossupressão geralmente requerem terapia antifúngica supressora ao longo da vida (MAHAJAN et al., 2014; KAUFFMAN et al., 2007).

Até recentemente, antes da aprovação do itraconazol para tratamento da esporotricose, a solução saturada de iodeto de potássio era o tratameto padrão desde o momento em que foi introduzido no século 19 e até hoje, pode ser considerado como primeira escolhas em países com poucos recursos (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014).

Atualmente, os resultados bem-sucedidos do tratamento também podem ser guiados por um diagnóstico rápido e preciso, especialmente quando perfis antifúngicos dissimilares são observados entre diferentes espécies de *Sporothrix* (GREMIÃO et al., 2017).

- IODETO DE POTÁSSIO

O uso do iodeto de potássio para tratamento da esporotricose foi proposta por Sabouraud e usado em 1903. Em 1907 foi utilizado por de Beurmann como droga de escolha para esporotricose cutânea por ser efetiva, pouco dispendiosa e relativamente simples de usar (MAHAJAN et al., 2014)

É uma medicação administrada oralmente, de baixo custo e primeira escolha de tratamento para esporotricose humana não complicada, especialmente quando o alto custo do itraconazol torna-se impeditivo. Logo, vem sendo utilizado em áreas endêmicas de países em desenvolvimento, por ser uma medicação eficaz para as formas cutâneas e de preço mais acessível. (MAHAJAN et al., 2014; DE LIMA BARROS et al., 2011). Entretanto, ele não é efetivo para formas extracutâneas de esporotricose (KAUFFMAN, 2007; MAHAJAN et al., 2014). Apesar dos efeitos adversos associados a este composto, existe uma resposta terapêutica satisfatória (DE LIMA BARROS et al., 2011).

Mesmo sendo amplamente utilizado em diversos países do mundo, não há ensaios clínicos específicos demonstrando a efetividade do iodeto de potássio. Falha terapêutica é relatada apenas excepcionalmente e associada à não adesão ao tratamento. (SHARMA et al., 2003; MAHAJAN et al., 2014). Muitos relatos consideram a própria resposta terapêutica ao SSKI (solução saturada de iodeto de potássio) como um dado diagnóstico de esporotricose, na indisponibilidade do exame micológico (MORRIS-JONES et al., 2002; MAHAJAN et al., 2005; DA ROSA et al., 2005; PAPPAS et al., 2000; KAUFFMAN et al., 1999; KAUFFMAN et al., 1995). Também tem sido efetivo em casos não respondedores ao itraconazol (SANDHU et al., 2003; MAHAJAN et al., 2014). Contudo, nenhum *guideline* ou diretriz específica inclui o SSKI como primeira opção de tratamento.

Usualmente é administrado em via oral em solução saturada de iodeto de potássio (1g/ml → 20 gotas = 1 ml). Inicia-se com 5 gotas três vezes ao dia, em leite, água ou suco (para mascarar o sabor desagradável), aumentando-se gradualmente uma gota por dose até alcançar a mais alta dose bem tolerada, que fica em torno de 20-40 gotas (1,5 a 2g), três vezes ao dia. A resposta torna-se evidente após 2 semanas de uso e a cura ocorre em 4 a 32 semanas (MAHAJAN et al., 2005; MAHAJAN et al., 2010; SANDHU et al., 2003). Esta recomendação - de tomar a medicação com doses gradualmente maiores e 3x/dia - torna a adesão difícil, especialmente para aqueles pacientes que trabalham fora por muitas horas.

Para crianças pequenas, recomenda-se iniciar uma gota 3x/dia, até o máximo de 1gota/kg 3x ao dia ou 40-50 gotas 3x /dia (o que for menor) (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014). Cabezas et al. compararam a segurança e eficácia do uso do iodeto de potássio em dose única ou em três tomadas ao dia, em um estudo randomizado não cego com 57 pacientes pediátricos com cultura confirmatória de esporotricose cutânea. Iniciaram com dose de 150 mg/dia de SSKI em ambos os grupos. Os eventos adversos foram maiores no

grupo que usou dose única diária (61% x 42%), mas a cura foi comparável em ambos os grupos (CABEZAS et al., 1996).

O aumento gradual na dosagem do iodeto de potássio é feito para evitar intolerância gastrointestinal, que é o principal efeito colateral. Eventos adversos pelo uso de iodeto de potássio não são incomuns. Estudo publicado por Marques et al, 2015, mostrou que 28% dos pacientes tratados com esta medicação apresentaram efeitos como dor abdominal, náuseas e disfunções gustatórias (MARQUES et al., 2015). Outros estudos mostram que as reações adversas ocorrem em até 60% dos casos, com sintomas como diarreia, náuseas, vômitos, ardência na boca, sensação de gosto metálico, sialorreia, lacrimejamento, expectoração abundante, coriza, espirros, edema de glândulas salivares, erupção acneiforme e pustular, dor na lesão, cefaleia, prurido, gengivite, insônia, depressão, edema palpebral, problemas tireoidianos, cardíacos, iododerma e iodismo. Em geral, estas reações não são severas e a medicação pode ser suspensa por alguns dias e reinstituída em doses mais baixas sem efeitos colaterais subsequentes. Raramente precisa-se interromper definitivamente a droga, mas os diversos efeitos colaterais contribuem para uma má adesão ao tratamento (DE ROSAS et al., 2005; PAPPAS et al., 2000; MAHAJAN et al., 2014). O gosto metálico pode significar um limiar da dose máxima tolerável pelo paciente, devendo ser ajustada para uma dosagem um pouco menor. Outros efeitos adversos potenciais decorrentes da droga são irritabilidade, vasculites, psoríase pustulosa, edema pulmonar, urticária, angioedema, mialgia, linfadenopatia e eosinofilia (MAHAJAN et al., 2005; STERLING et al., 2000).

O hipotireoidismo associado à terapia com SKII é geralmente precipitado em pacientes que já apresentam algum defeito na autorregulação da função da tireóide mas que mantém alguma síntese do hormônio, como tireoidite de Hashimoto, cirurgias parciais ou terapia com iodo radioativo para doença de Graves. A glândula deixa de produzir o hormônio tireoidiano por feedback negativo pelo excesso de iodo (efeito Wolff-Chaikoff). O mecanismo de autorregulação é capaz de manter um *pool* de iodo orgânico na glândula tireoidiana que produz hormônio suficiente para manter o paciente eutireoideo (fenômeno de escape). Na ausência de um mecanismo de autorregulação, como acontece em pacientes de áreas com deficiência de iodo de longa data (bócio) ou devido à presença de focos de tireóide autônomas, há a síntese de hormônio em excesso, podendo evoluir para tireotoxicose (Doença de Jod-Basedow). No entanto, a menos que o paciente já saiba que tem doença tireoidiana prévia, estudos de função tireoidiana não são necessários para iniciar terapia com iodeto de potássio. A descontinuação

do tratamento com iodo tende a restaurar o funcionamento tireoidiano normal nos casos de hipotireoidismo iatrogênico (MAHAJAN et al., 2014)

Pacientes que usam inibidores da enzima conversora da angiotensina, diuréticos poupadores de potássio ou com insuficiência renal podem desenvolver toxicidade pelo potássio e precisam de monitorização durante o tratamento. Terapia com SSKI não deve ser reintroduzida em pacientes que desenvolvem “síndrome flu-like” ou hipersensibilidade ao SSKI, já que são sintomas que ocorrem mesmo em doses baixas. (MAHAJAN et al., 2014).

O exato mecanismo de ação contra o *Sporothrix* sp. ainda não foi bem elucidado. O iodeto de potássio não é fungicida *in vitro* e poderia atuar destruindo a parede do fungo por reação tecidual, estimulando a atividade microbicida do sistema leucocitário polimorfonuclear e aumentando sua ação proteolítica e movimentação celular (DONADEL et al., 1993). Possivelmente, inibe a formação de granulomas por mecanismos imunológicos e não-imunológicos, expondo o fungo às defesas do hospedeiro ou facilitando a ação de outros antifúngicos usados simultaneamente (COSKUN et al., 2004). No entanto, o iodeto de potássio não parece aumentar a morte do *S. schenckii* induzido por monócitos e neutrófilos. Curiosamente, o *S. schenckii* consegue crescer quando cultivado em placa com SSKI a 10%, mostrando que isoladamente, *in vitro*, não há efeito fungistático ou fungicida (HIRUMA et al., 1987). Sugeriu-se que o SSKI se converta em iodo *in vivo* pela mieloperoxidase das células polimorfonucleares, e exercer seu efeito fungicida pela inibição sobre a germinação das células fúngicas e destruição direta da ultraestrutura do *Sporothrix* sp. exposto ao iodo. (HIRUMA et al., 1987). Já Urabe e Nagashima sugeriram que o efeito fungicida exista na forma leveduriforme do fungo (URABE et al., 1986).

As principais desvantagens ao uso da medicação estão a resolução clínica lenta (de um a oito meses) e a efetividade limitada na esporotricose sistêmica e disseminada.

- ITRACONAZOL

Todos os azólicos inibem o sistema enzimático do citocromo P450 e a administração concomitante de drogas metabolizadas por essas enzimas (digoxina, fenitoína, warfarim, carbamazepina, fenobarbital, rifampicina, cisaprida, astemizol, triazolam, midazolam, sinvastatina, antagonistas H-2, agentes hipoglicemiantes orais) está contra-indicada devido a toxicidade potencialmente grave. Eles são também contra-indicados na gestação e em casos de hipersensibilidade aos azólicos. (MAHAJAN et al., 2014).

O itraconazol é um agente antifúngico do grupo dos azólicos, e na dose de 100-200mg/dia costuma ser efetivo e bem tolerado. Substituiu grande parte das indicações do iodeto de potássio e da anfotericina por sua taxa de eficácia variar de 90-100% nos casos de esporotricose cutânea e extracutânea (KAUFFMAN et al., 2000; MAHAJAN et al., 2014). Também é utilizado como droga de primeira linha de tratamento para esporotricose por promover resposta clínica e trazer menos efeitos colaterais. Esta medicação tem se mostrado efetiva, com baixa toxicidade e boa tolerância, principalmente em tratamentos de longo prazo (KAUFFMAN et al., 2007).

Esta droga inibe o citocromo enzimático P450 lanosterol 14alfa-demetilase, que converte o lansterol em ergosterol, principal esterol da parede celular fúngica. A concentração inibitória mínima (MIC) de 0,1 a 1,0 mg/L para leveduras é alcançado com a dose terapêutica recomendada, e tem concentração no estrato córneo 10 vezes maior do que os níveis plasmáticos. Apesar do alto custo, tornou-se a droga de escolha para tratamento da esporotricose humana (fixa e linfocutânea) e variedades osteoarticulares, com taxas de cura variando de 90-100% e 60-80%, respectivamente. (HU et al., 2003; KAUFFMAN et al., 2007).

De acordo com as diretrizes da Sociedade de Doenças Infecciosas Americana (ISDA), deve ser administrado por via oral na dose de 200-400mg/dia por um período de 3-6 meses, chegando a 1 anos para casos osteoarticulares e formas disseminadas. (KAUFFMAN et al., 2007). Resposta adequada sem recorrência ou efeitos adversos tem sido observada na esporotricose fixa e linfocutânea tratada com doses de até 100mg/dia, com duração máxima de 18 semanas, mas doses mais elevadas são geralmente mais adequadas (MAHAJAN et al., 2014). É uma alternativa aceitável em pacientes intolerantes ao SSKI ou quando o itraconazol está prontamente disponível, quando há recaídas ou falha terapêutica. (SANDHU et al., 2003. MAHAJAN et al., 2014).

Em contraposição, estudo brasileiro com 645 pacientes com esporotricose cutânea tratados com itraconazol oral obtiveram cura de 94,6% dos casos; destes, a grande maioria com dose de 100mg/dia, com apenas 54 casos necessitando de doses entre 200 a 400mg/dia. A média de tempo de tratamento foi de 12 semanas (4-64 semanas), com mediana em 10,5 semanas para pacientes com forma fixa e 12 semanas para forma linfocutânea (DE LIMA BARROS et al., 2011). Pacientes que tiveram eritema nodoso como manifestação de hipersensibilidade apresentaram cicatrização mais rápida. (DE LIMA BARROS et al., 2011).

Doses mais elevadas são geralmente recomendadas para pacientes respondedores pobres ou em recaídas, apesar de acompanharem maior frequência de efeitos adversos a medicamentos (DE LIMA BARROS et al., 2011).

Bonifaz et al. usaram terapia de pulso com itraconazol na dose de 400mg/dia por 7 dias a cada mês e obtiveram cura clínica e micológica em 4 dos seus 5 pacientes com esporotricose cutânea, após dois a cinco pulsos (BONIFAZ et al., 2008). Song et al. comparou a terapia diária oral (200mg) com a terapia de pulso de itraconazol (400mg/dia 7dias/mês), em estudo prospectivo randomizado, com 25 pacientes com diagnóstico de esporotricose cutânea em cada grupo (SONG et al., 2011). Embora os pacientes que receberam terapia contínua oral tenham mostrado maior taxa de cura após 48 semanas (95,8% x 81,8%), os resultados não foram estatisticamente significativos (SONG et al., 2011). No entanto, como poucos estudos avaliando a pulsoterapia com itraconazol para esporotricose estão disponíveis, esta modalidade de tratamento não está inserida nas recomendações ou consensos (SONG et al, 2011; BONIFAZ et al., 2008; MAHAJAN et al, 2014).

O Itraconazol foi moderadamente eficaz na esporotricose osteoarticular com taxa de cura de 73% em uma pequena série de 11 pacientes que tiveram recaída após cura inicial (CABEZAS, 1996). Já o estudo de Winn et al. mostrou eficácia em todos os seis pacientes com quadro osteoarticular. No entanto, recaídas ocorreram até 7 meses após o término de tratamento (de 6-18 meses). (CABEZAS, 1996; WINN, 1993; MAHAJAN, 2014; KAUFFMAN et al., 2007).

Náuseas, dor epigástrica, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, alterações da função hepática (raramente com hepatotoxicidade grave), cefaleia e edema periférico são alguns os efeitos adversos observados, sendo mais frequentes em doses mais altas do azólico. Em estudo brasileiro com 645 pacientes com esporotricose, eventos adversos estiveram presentes em 18 a 21,4% dos pacientes que usaram o itraconazol, sendo mais frequentes naqueles que receberam dose entre 200-400mg/dia. A náusea foi o sintoma mais comum. Dos 453 pacientes acompanhados laboratorialmente, 24,1% mostraram efeitos como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglicemia. Outras anormalidades associadas ao tratamento são o aumento das enzimas hepáticas, enzimas pancreáticas, uréia, creatinina e anemia (DE LIMA BARROS et al., 2011).

Nenhum ajuste é necessário em pacientes com disfunção hepatorrenal (MAHAJAN et al., 2014).

- FLUCONAZOL

É um medicamento antifúngico sintético bistriazólico de amplo espectro que inibe seletivamente o citocromo P450 fúngico que é necessário para a demetilação do esterol para ergosterol, componente essencial para a integridade da membrana citoplasmática fúngica. Isto leva a uma permeabilidade anormal da membrana, atividade enzimática na membrana e coordenação alterada da síntese de quitina.

Usado oralmente sozinha ou em combinação com o iodeto de potássio, o fluconazol pode ser uma outra opção terapêutica. Tem sido usado nos casos de esporotricose cutânea fixa ou linfocutânea em doses de 150 mg uma vez por semana a 200 mg diários. (GHODSI et al., 2000, CASTRO et al., 1993). Entretanto, doses maiores entre 400-600 mg/dia são geralmente recomendadas especialmente para as formas viscerais e osteoarticulares da esporotricose, mas a resposta é habitualmente pobre.

Terapias prolongadas com doses de 400-800 mg/dia por vários meses têm disso associadas a alopecia, além de outros efeitos como náuseas, vômitos, diarreias, dor abdominal, alterações das enzimas hepáticas, mas raramente motivam a descontinuação do tratamento.

O fluconazol é contra-indicado na gestação devido ao seu potencial teratogênico. Como a experiência com fluconazol na terapia da esporotricose é limitada e demonstrar efetividade moderada, ele é considerado uma opção de tratamento de segunda linha naqueles pacientes intolerantes ao itraconazol (MAHAJAN et al, 2014).

- CETOCONAZOL

O uso do cetoconazol para tratamento da esporotricose é desencorajado. (SHARMA et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014). Já foi observada falha completa de tratamento mesmo em doses elevadas de 400-600mg/dia por 7 a 9 meses (SHARKEY-MATHISM et al., 1993). Além da baixa eficácia, ainda inferior ao fluconazol, a hepatotoxicidade é outra limitação para o seu uso (MAHAJAN et al., 2014).

- TERBINAFINA

Terbinafina é uma alternativa para tratamento da esporotricose cutânea fixa e linfocutânea para os casos não responsivos ao itraconazol ou quando o itraconazol é não tolerado ou contra-indicado. É bem absorvida por via oral e tem baixa ligação ao citocromo enzimático microssomal P450 (cerca de 5% de sua capacidade total), não interferindo na biodisponibilidade de outras drogas metabolizadas por esta via (FRANCESCONI et al., 2009)

É altamente lipofílica e sua atividade antifúngica é mantida por algumas semanas após a interrupção do tratamento pelo depósito no tecido adiposo da droga. Seu efeito fungicida decorre de sua atuação inibitória sobre a enzima esqualeno epoxidase que resulta na inibição da síntese de ergosterol (MAHAJAN et al., 2014).

Tem demonstrado uma meia-vida longa e boa atividade in vitro contra *S. schenckii* (MIC de 0,0007-0,5 µg/ml). Contudo não há consenso de um esquema terapêutico ideal (dosagem e duração de tratamento) para a terbinafina. Em pequenas séries ou relatos de caso, tem sido utilizada sozinha ou em combinação com o SKII, com doses variando de 125mg a 1000mg/dia, por 4-37 semanas, a fim de obter cura clínica. (FRANCESCONI et al., 2009; HULL et al., 1992).

Francesconi et al, obtiveram cura de 96% dos 50 pacientes com esporotricose cutânea tratados com 250 mg/dia de terbinafina, sem recorrências. Estes pacientes estavam em tratamento simultâneo para hipertensão, diabetes mellitus, dislipidemias, arritmias, não sendo elegíveis ao uso de imidazólicos. Neste estudo, 12% dos pacientes tiveram efeitos adversos leves a moderados; apenas um paciente precisou suspender a droga por hipersensibilidade (FRANCESCONI et al., 2009).

A eficácia da dose de 250 mg/dia de terbinafina é supostamente comparável com a dose de 100mg/dia de itraconazol, com eficácia no tratamento de 92,7% e 92%, respectivamente, e duração média de uso equivalentes (11,5 e 11,8 semanas, respectivamente) (FRANCESCONI et al., 2011). Todavia, regimes de tratamento com doses ainda maiores de terbinafina parecem demonstrar superioridade. Terbinafina na dose de 500 mg 2x/dia por uma média de 13,9± 6,7 semanas curou 87% dos 35 pacientes quando comparados a 52% de 28 pacientes que receberam 250mg 2x/dia por 17,7±5,8 semanas, em um ensaio clínico multicêntrico, duplo-cego, randomizado (CHAPMAN et al., 2004). Atualmente é considerada categoria B na gestação.

- ANFOTERICINA B

A anfotericina B desoxicolato é um antibiótico macrolídeo lipofílico sintetizado a partir do *Streptomyces nodosus*, e está disponível em apresentação intravenosa. Esta droga se liga ao ergosterol e a outros esteróis da membrana citoplasmática fúngica causando aumento da permeabilidade da membrana dos fungos para íons monovalentes (sódio e potássio) e outras moléculas levando à morte celular; contudo a principal atividade fungicida deve-se à sua capacidade de provocar auto-oxidação da membrana citoplasmática e liberação de radicais livres letais (MAHAJAN et al, 2014).

É uma droga segura na gravidez (categoria B), sendo também escolha para tratamento de pacientes severamente comprometidos, como os casos de esporotricose cutânea disseminada, pulmonar, meníngea ou em pacientes imunodeprimidos. Também pode ser indicado para esporotricose osteoarticular extensa ou que estejam não responsivos ao itraconazol (KAUFFMAN et al., 2007)

É habitualmente usada na dose de 0,7-1,0mg/kg/dia, a depender da gravidade da doença e dos efeitos colaterais. A dose alvo cumulativa deve ser de 2 a 3g. (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014).

Sintomas como febre, calafrios, cefaleia, mal-estar e vômitos podem ocorrer durante a administração da anfotericina e podem ser atenuados com medicações antipiréticas e corticosteroides. Hipocalemia, hipomagnesemia e nefrotoxicidade são efeitos adversos comuns e requerem monitoramento regular. Toxicidade cardiovascular e de medula óssea são raras. (MAHAJAN et al., 2014).

Embora não existam diretrizes que determinem a resposta terapêutica à anfotericina, seu uso costuma ser recomendado numa fase inicial da terapia, até que seja alcançada uma resposta clínica favorável, quando a troca para o itraconazol possa ser viável até o término do tratamento (KAUFFMAN, 2007).

A formulação lipídica da anfotericina B pode ser utilizada na dose de 3-5mg/kg/dia como terapia inicial para troca subsequente para o itraconazol oral nas formas graves e com risco de morte como na esporotricose pulmonar, meníngea e disseminada. Não há dados fortes para escolher a formulação lipídica da anfotericina sobre a desoxicolato, com a possível exceção de que a formulação lipídica possa ser preferida nos casos de meningite. Existem dados em animais (não em humanos) observando que concentrações mais elevadas são alcançadas no tecido cerebral com a formulação lipídica da anfotericina quando comparada à forma desoxicolato. No entanto a relevância desta descoberta para o tratamento da esporotricose meníngea ainda é desconhecido. (KAUFFMAN et al., 2007). Após a estabilização clínica, recomenda-se trocar a medicação para o itraconazol 100mg 2x/dia por um tempo mínimo de 12 meses. (MAHAJAN et al., 2014).

- FLUCITOSINA

Esta droga sintética que atua sinergicamente com a anfotericina B com o objetivo de reduzir sua dose e toxicidade. A anfotericina B aumenta a permeabilidade da parede celular dos fungos e facilita a penetração da flucitosina. Sua deaminação para fluorouracil ocorre dentro

da célula fúngica que interfere no metabolismo do DNA e RNA deste organismo. A dose usual é de 50-150mg/kg/dia, divididos em quatro tomadas diárias por 6-12 semanas (MAHAJAN, 2014).

Cura tem sido relatada em casos de esporotricose disseminada com acometimento cutâneo e ósseo com a combinação de anfotericina (4,8g) e 5-fluorцитосина (8mg/dia) em 6 meses. Entretanto, seu uso a longo prazo não é recomendado devido a sérias reações adversas (intolerância gastrointestinal, toxicidade sobre a medula óssea e fotossensibilidade), além de já existirem outras alternativas medicamentosas disponíveis. (MAHAJAN et al., 2014).

- **NOVOS ANTIFÚNGICOS**

O uso do posaconazol e do ravuconazol em pacientes com esporotricose ainda é pouco estudado. Posaconazol mostrou boa atividade contra as cinco espécies do complexo *Sporothrix* sp., enquanto a atividade do ravuconazol é limitado apenas a estudos in vitro contra o *S. brasiliensis*. Equinocandinas não têm mostrado atividade contra o *S. schenckii*, e o voriconazol não está recomendado para o tratamento da esporotricose devido à sua limitada atividade in vitro contra o *Sporothrix* spp. (KAUFFMAN et al., 2007; MARIMON et al., 2008; PAPPAS et al., 2011).

2.6.2 Terapêutica não farmacológica

Tratamentos não farmacológicos, como a aplicação de termoterapia local, têm sido descritos com resultados variáveis. (RAMOS E SILVA et al., 2007)

- **TERMOTERAPIA**

O uso do calor local sobre a lesão de esporotricose cutânea foi introduzido por MacKinnon e Conti-Diaz, em 1962. Os efeitos de cura podem ocorrer devido ao efeito direto do calor sobre o fungo, que não cresce em temperaturas acima de 38,5 °C e/ou ao aumento da circulação sanguínea local, facilitando os mecanismos de defesa como fagocitose e reações antígeno-anticorpo. (DONALD et al., 1993; MAHAJAN et al., 2014; DOHERTY et al., 2010). A aplicação diária de calor local (42-43 °C) sobre a lesão de pele durante semanas utilizando compressas mornas, bolsa térmicas ou dispositivos que irradiam comprimentos de onda infravermelhos, é recomendada para tratamento de pequenas lesões, como nas formas cutâneas fixas e em gestantes (KAUFFMAN et al., 2007; COSTA et al., 2011; FERREIRA et al., 2012).

De um grupo de 14 pacientes, a taxa de cura deste método relatada foi de 71%, mas de forma geral, sua eficácia ainda não foi bem avaliada. (KAUFFMAN et al., 2007;

KAUFFMAN et al., 1995). No entanto, pode-se combinar a termoterapia ao uso de tratamentos farmacológicos, com o itraconazol ou SSKI. Recomenda-se aplicar o calor por 15-60 minutos várias vezes ao dia, até a completa resolução das feridas ou até introduzir tratamento antifúngico medicamentoso (KAUFFMAN et al., 1995).

Durante o período epidêmico de esporotricose no Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2005 a 2010, foram acompanhadas doze gestantes com esporotricose cutânea fixa e linfocutânea. Foram orientadas a fazer termoterapia três vezes ao dia. Oito pacientes obtiveram cura apenas com esta intervenção, duas necessitaram de itraconazol após o parto e duas pacientes perderam seguimento (FERREIRA et al., 2012).

- **INTERVENÇÕES CIRÚRGICAS**

A excisão cirúrgica geralmente não é recomendada, no entanto, procedimentos invasivos são necessários para obter amostras clínicas, como biópsias da pele ou osso, artrocenteses para biópsia de tecido sinovial, broncoscopia com lavado broncoalveolar para cultura e biópsia transbrônquica para estabelecer diagnóstico laboratorial (MAHAJAN et al., 2014).

Da mesma forma, a terapia cirúrgica algumas vezes torna-se inevitável no manejo da esporotricose osteoarticular, mesmo com terapia antimicrobiana prolongada. O dano ao tecido ósseo e cartilaginoso pode ser minimizado pela drenagem adequada das articulações infectadas ou pelo debridamento da área afetada, mas a artrodese pode ser necessária em casos avançados (HOWELL et al., 1997). Combinação de ressecção cirúrgica e anfotericina B nos casos de esporotricose pulmonar segmentar é considerada a melhor abordagem terapêutica, sendo superior a estas medidas isoladamente (KAUFFMAN et al., 2007). No entanto, excisão cirúrgica ou desbridamento de forma isolada não é eficaz nem recomendado. (MAHAJAN, 2014).

2.6.3 Situações especiais

- **Tratamento da esporotricose em gestantes**

O iodeto de potássio é classificado como droga categoria D em gestantes e está contraindicado em grávidas e no período de lactação, pelo risco de desenvolvimento de hipotireoidismo neonatal e/ou tireomegalia, a menos que os benefícios superem os riscos.

Não há relatos sobre o uso da terbinafina em gestantes com esporotricose. Apesar de ser considerada categoria B, seus efeitos sobre o feto ainda são desconhecidos. Em série de casos, Costa et al. acompanharam uma paciente que usou terbinafina 500mg/dia para

esporotricose cutânea e durante o tratamento engravidou, mantendo a terapia inadvertidamente por mais de 120 dias. Teve gestação saudável e feto normais. (COSTA et al., 2011).

Os azólicos devem ser totalmente evitados nesse período. Hipertermia/termoterapia pode ser usado nos casos de esporotricose que não requeiram tratamento urgente. No entanto, para casos de esporotricose mais extensas que precisem ser tratadas durante a gravidez, pode ser utilizada a anfotericina B lipossomal. Como não há risco de piora da esporotricose ou disseminação para o feto, pode ser mais prudente adiar o tratamento farmacológico até o término da gestação (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014). Há relatos de resolução espontânea de esporotricose em gestantes (ALMEIDA JR et al., 2009).

- Tratamento da esporotricose em crianças

Casos de esporotricose em crianças são menos relatados que nos adultos, mas não são incomuns. Pacientes pediátricos podem ser tratados com metade da dose de SSKI, até um máximo de 15 gotas 3x/dia ou itraconazol na dose de 6-10mg/kg/dia (máximo de 400mg/dia) durante 3-4 meses, de forma semelhante aos adultos. (BONIFAZ et al., 2007; MAHAJAN et al., 2005)

A maioria dos pediatras opta pelo itraconazol como primeira escolha pela comodidade posológica (KAUFFMAN et al., 2007). Tanto o SSKI, como o itraconazol e a terbinafina já foram utilizados com sucesso para tratar esporotricose em lactentes com menos de 10 meses de vida (SONG et al., 2011). Contudo, a indisponibilidade de formulações pediátricas de antifúngicos continua sendo uma limitação ao tratamento. A terapia local combinada também é opção útil para doenças limitadas em crianças (MAHAJAN et al., 2014).

- Tratamento da esporotricose em imunodeprimidos ou em pacientes que vivem com HIV/aids

Condições predisponentes responsáveis por situações de imunossupressão como diabetes mellitus, etilismo crônico, distúrbios mieloproliferativos, terapia imunossupressora para transplantes de órgãos, distúrbios autoimunes, cânceres, tratamentos prolongados com corticosteroides sistêmicos e a infecção pelo HIV têm sido implicados nos casos de esporotricose extracutânea. As lesões cutâneas muitas vezes são múltiplas e generalizadas, e pode acompanhar-se de envolvimento sistêmico. (ROCHA et al., 2001). Esporotricose extracutânea pode se manifestar de diversas formas, como sinusite invasiva, lesões oculares, pulmonares, osteoartrite e até envolvimento do SNC. Em alguns casos de esporotricose disseminada em pacientes com aids podem ser necessárias múltiplas combinações de drogas

em diversos cursos de tratamento (PAIXÃO et al., 2015). Anfotericina B lipossomal pode ser o medicamento de primeira escolha nesses pacientes, e em seguida, manterão terapia supressiva com itraconazol 200-400 mg/dia, quando a erradicação do patógeno ou correção da imunossupressão não for possível (KAUFFMAN et al., 2007; MAHAJAN et al., 2014).

2.7 VACINAS

Nos últimos anos, novas estratégias foram propostas para controlar a esporotricose diante da preocupação quanto à sua crescente incidência em humanos, cães e gatos, principalmente no Brasil. A resposta humoral específica e protetora contra o *Sporothrix* já foi descrita e nesta cadeia pode estar a chave para uma futura investigação e produção de vacinas (GREMIÃO et al., 2017). Considerando que os gatos são uma grande fonte de *Sporothrix* nas epidemias brasileiras, uma vacina capaz de prevenir sua infecção ou controlar a carga fúngica seria uma medida para reduzir a transmissão da doença.

A *Sporothrix* 3-carboximuconatociclase tem emergido como possível alvo para estudos de vacinação. Desde o reconhecimento de anticorpos contra a Gp70e Gp60 no soro de gatos com esporotricose, a idéia de produzir uma vacina para estes alvos com o objetivo de prevenir a infecção felina, vem sendo estudada. Pesquisas estão em curso para identificar o melhor alvo candidato à vacina e o adjuvante ideal. (GREMIÃO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015).

Em recente estudo, avaliou-se a imunogenicidade e as propriedades protetoras de duas formulações de vacinas à base de proteína de parede celular (SsCWP) de *S. schenckii* adjuvada com hidrogenados de alumínio (AH) em um modelo murino de esporotricose sistêmica. (PORTUONDO et al., 2016).

Estudos estão em andamento para identificar o melhor candidato protéico e o adjuvante ideal para vacinas contra a esporotricose (GREMIÃO et al., 2017).

2.8 ESPOROTRICOSE EM ANIMAIS

2.8.1 Esporotricose felina

A imunidade mediada por células desempenha um papel importante no controle da esporotricose. Percentagens aumentadas de células CD4 estão relacionadas a lesões únicas, com baixa carga fúngica e processo inflamatório bem definido. Contudo, a maioria dos gatos com

esporotricose apresentam lesões com granulomas mal formados e alta carga fúngica, com tendência à resposta inflamatória Th2. Os mecanismos subjacentes que determinam as diferentes apresentações da esporotricose felina não estão completamente determinadas. (GREMIÃO et al., 2017)

Esporotricose grave felina pode se desenvolver independentemente de coinfeções por retrovírus em gatos. Na maioria das áreas endêmicas do Rio de Janeiro, os gatos circulam em áreas públicas externas, sendo a maioria deles não vacinados, esterilizados e sem as medidas antiparasitárias de profilaxia. Esta população de gatos errantes contribuem para o contágio e transmissão da esporotricose entre estes animais, além de estarem susceptíveis a outras infecções (GREMIÃO et al., 2017). Infecções fúngicas e parasitárias elicitam vias imunes conflitantes. Os mecanismos clássicos de defesa contra infecções por helmintos incluem aumento da IL-10 e das citocinas Th2, com supressão da via Th1 (ELLIOT et al., 2012). É possível que a coinfeção parasita- *Sporothrix* aumente a susceptibilidade a esporotricose. Hipotetiza-se que o controle da infecção de helmintos em gatos com esporotricose levaria a predomínio de resposta inflamatória tipo Th1 que contribuiria ao clareamento fúngico e redução do potencial zoonótico da doença (GREMIÃO et al., 2017).

2.8.1 Esporotricose canina

De 1998 a 2014, 244 cachorros foram diagnosticados com a doença no Rio de Janeiro (VIANA et al., 2015). Apesar de haver um grande número de casos documentados de esporotricose canina, não há relatos de transmissão zoonótica envolvendo estes animais na epidemia do Rio de Janeiro. Cães, na maioria das vezes, apresentam baixa carga fúngica em suas lesões, não estando diretamente envolvidos na cadeia de transmissão para humanos (SCHUBACH et al., 2006; BARROS et al. 2010).

Alguns cuidados devem ser mantidos durante o tratamento, por se tratar de uma zoonose que pode ser transmitida ao homem pelo contato com as lesões ulceradas dos animais. É muito importante que o animal seja mantido em isolamento e que se faça uso de luvas todas as vezes em que houver contato físico com o animal. Crianças, idosos, indivíduos que vivem com HIV, diabéticos e qualquer outro indivíduo que seja portador de uma doença crônica ou esteja momentaneamente imunossuprimido, deve manter distância do animal com esporotricose. O ambiente em que o animal se encontra e os utensílios utilizados, devem ser higienizados periodicamente com substâncias antissépticas (hipoclorito, por exemplo) (CRUZ et al., 2013).

A esporotricose responde bem ao tratamento oral com soluções saturadas de iodeto de potássio nas dosagens de 40mg/Kg para cães e de 20mg/Kg para gatos a cada 12 a 24 horas e continuando por 30 dias após o desaparecimento total dos sintomas. Em gatos, este tratamento tem sido evitado pelos veterinários porque é comum a ocorrência de iodismo, caracterizado por vômitos, anorexia, depressão, icterícia, tremores, corrimento nasal e ocular, hipotermia, insuficiência cardíaca. Nestes casos, o tratamento deve ser interrompido por uma semana, reiniciando-o com a mesma dosagem ou com dosagem mais baixa ou o iodeto pode ser substituído por cetoconazol, itraconazol ou fluocitosina. Em gatos, bons resultados têm sido obtidos com dosagens de 10mg/kg de peso, comumente 50mg de itraconazol por animal. Em todos os casos, o tratamento deve ser continuado por 30 dias depois de desaparecidos os sinais (GREMIÃO et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar as características clínicas e epidemiológicas dos casos de esporotricose humana atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, as espécies do Complexo *Sporothrix* e o perfil de sensibilidade antifúngica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever características clínicas (forma clínica, sítio da lesão primária, tempo de doença, condições imunossupressoras de base) e epidemiológicas (procedência, história de contato com gatos doentes ou com material orgânico rural) dos pacientes com esporotricose.
- Descrever achados dos testes diagnósticos: exame direto por escarificação e de fragmento de tecido, cultura micológica de exsudato e de fragmento do tecido, e exame histopatológico.
- Comparar a eficiência entre os testes diagnósticos para esporotricose (exame direto do exsudato, exame direto do fragmento, cultura do exsudato, cultura do fragmento, exame histopatológico), avaliando a sensibilidade e especificidades dos métodos.
- Verificar se há vantagem em utilizar mais de um método (exame direto, cultura e histopatológico) para o diagnóstico de esporotricose e mais de um espécime biológico (exsudato ou fragmento) para o exame micológico.
- Comparar o tempo de resposta terapêutica entre as diferentes formas clínicas, presença de reação hipersensibilidade e imunossupressão.
- Identificar as espécies do complexo *Sporothrix* de isolados de pacientes com esporotricose, baseado no sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL).
- Determinar o perfil de sensibilidade antifúngica (concentração inibitória mínima – CIM) para cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, terbinafina e anfotericina B das espécies de *Sporothrix* envolvidas com os casos de esporotricose humana.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENHO DO ESTUDO, LOCAL E PERÍODO

Estudo transversal aninhado à coorte prospectiva, envolvendo pacientes atendidos no ambulatório de Dermatologia com diagnóstico de esporotricose, no período de março de 2017 a março de 2018.

O estudo foi realizado na cidade do Recife, capital do estado de Pernambuco, tendo como local de estudo o setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. A clínica dermatológica deste hospital realiza cerca de 850 consultas especializadas a cada mês, sendo uma das unidades de referência para diagnóstico e seguimento de casos de doenças infecciosas cutâneas no estado de Pernambuco, pela possibilidade assistência especializada e acesso a exames complementares. Esta instituição dispõe de equipe multiprofissional para assistência ambulatorial, realização de exames diagnósticos e tratamento desses pacientes. Desde março de 2017, o setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE iniciou ambulatório para acolhimento, confirmação do diagnóstico e tratamento de casos de pacientes com esporotricose.

4.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Pacientes com suspeita de esporotricose encaminhados para o ambulatório de Esporotricose da clínica dermatológica do Hospital das Clínicas da UFPE, no período de março de 2017 a março de 2018.

4.2.1 Critérios de Inclusão

Pacientes com diagnóstico de esporotricose, maiores de 18 anos, atendidos na clínica dermatológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Pacientes gestantes ou lactantes.

4.3 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS

4.3.1 Método de coleta

Pacientes com suspeita clínica de esporotricose, encaminhados ao ambulatório especializado do setor de Dermatologia da UFPE, foram avaliados pela pesquisadora e convidados a participar do projeto, após orientações e esclarecimentos quanto aos objetivos,

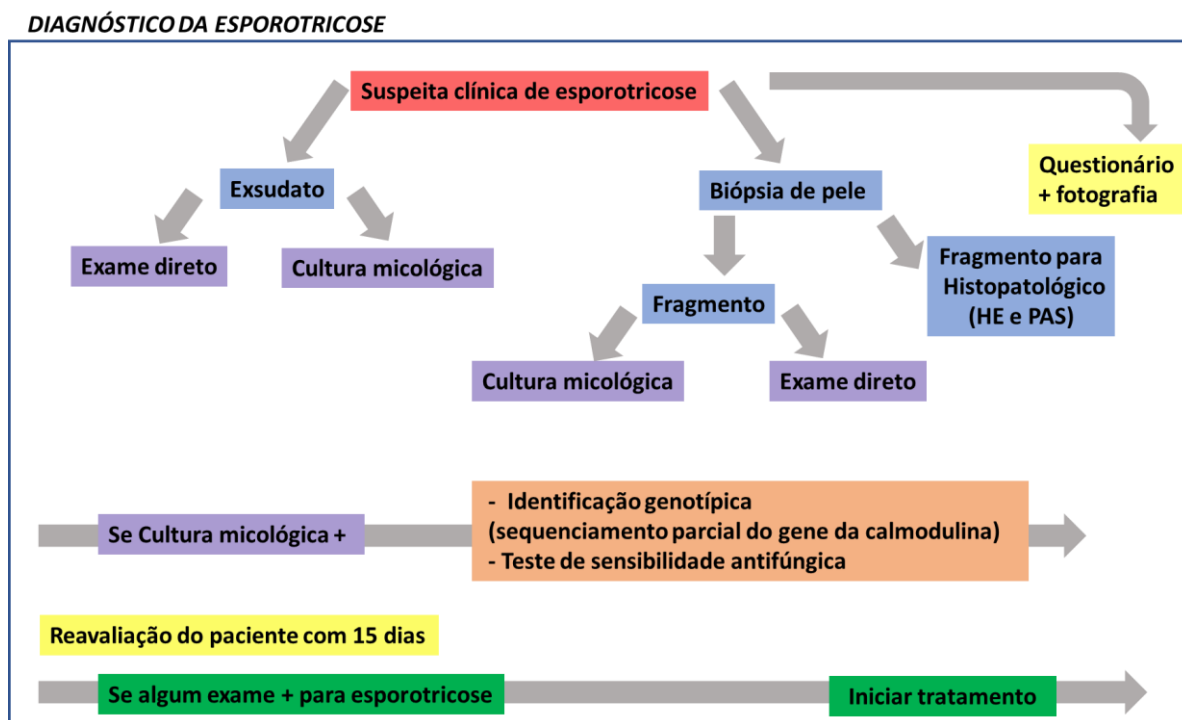
riscos e benefícios do estudo. Aqueles que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).

Para coleta de dados, foi aplicada uma ficha com dados pessoais, informações epidemiológicas e clínicas, mediante entrevista pessoal, de forma privativa e individual, realizada pela pesquisadora, a fim de minimizar o surgimento de vieses. Nesta ficha constavam também perguntas que avaliam uma possível exposição ambiental a gatos doentes, bem como a materiais vegetais, madeira ou solo. Os dados coletados foram arquivados em protocolo específico para esta pesquisa. Como a esporotricose atualmente faz parte da lista de notificação compulsória no estado de Pernambuco, todos os pacientes suspeitos foram notificados.

Os pacientes foram examinados pela pesquisadora/dermatologista para caracterização clínica das lesões de esporotricose e fotografados. Realizaram exame direto do exsudato das lesões, além de duas biópsias com punch de 4mm de lesão cutânea, que foram enviadas para processamento histopatológico, exame direto e cultura micológica de fragmento de tecido (Figura 1).

Após confirmação do diagnóstico de esporotricose, na ausência da forma disseminada da doença, os pacientes iniciaram tratamento padrão com itraconazol 100 mg/dia (ALMEIDA-PAES et al., 2014) e foram acompanhados quinzenalmente, a fim de observar resposta clínica e definir momento de suspender a medicação, quando atingiam a cura clínica (Figura 2). Os pacientes foram reavaliados a cada 15 dias, com o objetivo de evidenciar resposta clínica e possíveis efeitos colaterais. Quando, após 4 a 8 semanas, as lesões cutâneas haviam se agravado ou estavam inalteradas, a dose do itraconazol foi dobrada para 200 mg/dia. Quando mesmo após 8 semanas da modificação da posologia não for observada melhora das lesões, a medicação será substituída. A definição da dose de tratamento com o itraconazol e da forma de acompanhamento baseou-se em protocolo de coorte de pacientes com esporotricose do Instituto de Pesquisa Clínicas Evandro Chagas (IPEC) (ALMEIDA-PAES et al. 2014).

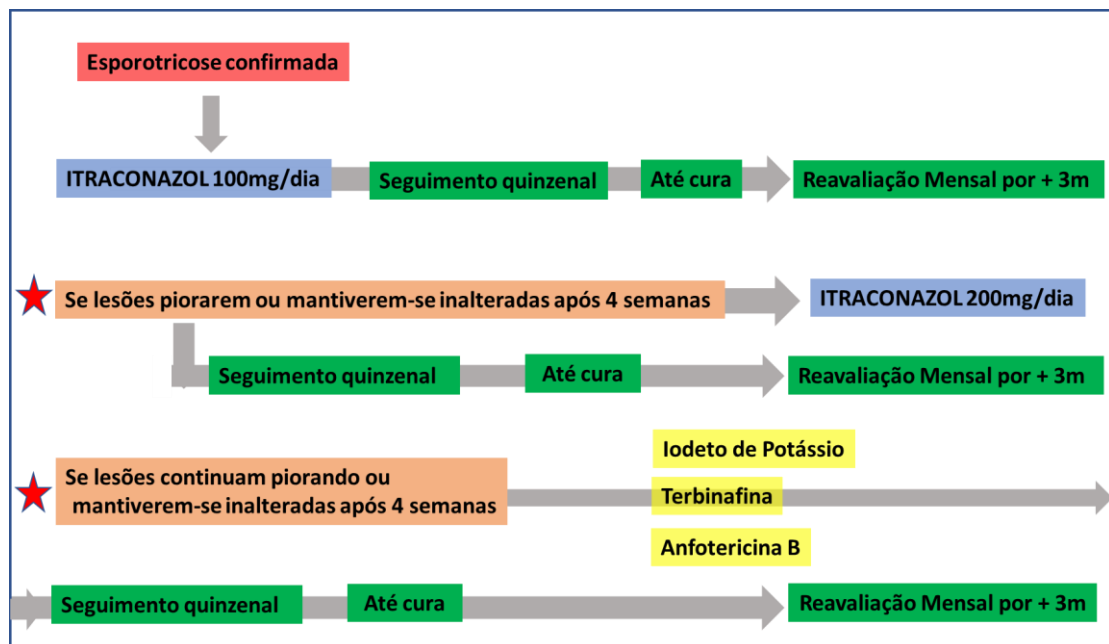
Figura 1 – Fluxograma para diagnóstico da esporotricose no Ambulatório de Dermatologia, HC-UFPE.



Os pacientes foram avaliados quanto a possíveis interações medicamentosas ou outras contra-indicações ao uso do itraconazol: uso de psicodélicos, antidiabéticos, estatinas, bloqueadores do canal de cálcio, anticonvulsivantes (carbamazepina, fenitoína e fenobarbital) cardiotrópicos (digoxina) ou agentes anti-parkinsonianos. Na impossibilidade de usar o imidazólico, foram considerados para tratamento com iodeto de potássio 3g/dia ou terbinafina 250mg/dia. O protocolo da pesquisa incluiu a realização de exames laboratoriais antes do início do tratamento, solicitados no primeiro atendimento: hemograma completo com velocidade de hemossedimentação (VSH), bioquímica hepática, função renal, lipidograma e sorologias para hepatites B e C e HIV. Exames de bioquímica hepática, lipidograma e hemograma foram repetidos após 8 semanas de tratamento.

Foi considerado curado o paciente que apresentou lesão(ões) completamente cicatrizada(s) com epitelização completa e ausência de crostas, áreas infiltradas ou eritema. A medicação antifúngica foi suspensa 4 semanas após a resolução clínica das lesões. No caso de lesões extra-cutâneas, as lesões pré-existentes precisaram estar totalmente involuídas. Terminada a medicação, o paciente ainda foi acompanhado mensalmente para avaliar possíveis recidivas por mais 2 meses.

Figura 2: Fluxograma de seguimento clínico e tratamento dos pacientes com esporotricose



4.3.2 Instrumento de coleta de dados

Foi utilizada uma ficha (Apêndice B) estruturada com dados objetivos. O instrumento de pesquisa apresentava seções para contemplarem as seguintes avaliações:

- Dados epidemiológicos do paciente;
- Informações quanto ao aspecto clínico da doença e morbidades associadas;
- Informações quanto ao tratamento instituído e seguimento;
- Seção reservada para registro de resultado de exames complementares.

4.3.3 Biópsia de pele

A coleta do material de biópsia ocorreu em ambiente reservado e obedecendo as seguintes etapas:

- Preparo do material para a biópsia
 - Identificação dos frascos com formol e preenchimento de fichas com os dados dos pacientes.
- Realização do procedimento
 - Assepsia e antissepsia com clorexidina, anestesia local com lidocaína a 2%, duas biópsias por punch descartável n.º 4 de lesão cutânea, hemostasia, sutura e curativo.

- Orientações após os procedimentos quanto à limpeza e cuidados com a ferida operatória.

c) Armazenamento do fragmento.

- O fragmento de biópsia obtido da lesão de pele foi fixado em formol a 10% para avaliação anatomopatológica no Hospital das Clínicas da UFPE. O segundo fragmento de biópsia será colocado em soro fisiológico a 0,9% e encaminhado ao laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos da UFPE.

4.3.4 Exame Histopatológico

Os fragmentos de biópsia foram enviados para exame histopatológico, fixados em formol a 10% e submetidos aos métodos convencionais de processamento, coloração com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), e, em seguida, avaliados por dermatopatologista. Diante de uma lesão clinicamente suspeita, com epidemiologia favorável, o achado de inflamação granulomatosa supurativa foi considerada sugestiva de esporotricose. O encontro de formas leveduriforme à coloração pelo PAS foi considerado diagnóstico, neste contexto.

4.3.5 Exame micológico

A análise e processamento do exame direto e da cultura dos diferentes espécimes foram realizados no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

a) Exame direto

Foi coletado o exsudato através de punção dos nódulos gomosos ou das bordas de lesões ulceradas, além de escarificação epidérmica nos casos com lesões ulcero-crostosas. O exame direto também foi realizado no fragmento de pele obtido por biópsia. Foi considerada positiva a presença de células leveduriformes em naveta ou elípticas, além de células leveduriformes globosas.

b) Cultura micológica

Foi realizada tanto a partir dos fragmentos de tecido (por biópsia), quanto do exsudato das lesões. Após a obtenção, as amostras foram preparadas e semeadas em duplicata na superfície do meio *Brain-Heart Infusion* (BHI) e do meio ágar Sabouraud adicionado de 50 mg/L de cloranfenicol contido em placas de Petri, mantidas à temperatura de 30° C e 37° C por até 15 dias. Concomitantemente, esfregaços teciduais foram confeccionados sobre lâmina e corados com

Giemsa e clarificados com hidróxido de potássio a 20%. Após o surgimento das colônias em meio de cultivo, os isolados clínicos foram purificados e identificados (LACAZ et al., 2002).

4.3.6 Definição das espécies

a) Purificação e identificação dos isolados

Foram colocados fragmentos da colônia fúngica em água destilada esterilizada adicionada de 50 mg/L cloranfenicol. Desta suspensão, 0,2mL foram semeados por esgotamento na superfície do meio ágar Sabouraud suplementado com extrato de levedura e cloranfenicol em placas de Petri. Posteriormente, as colônias foram repicadas para tubos de ensaio contendo Batata Dextrose Ágar (BDA), para posterior identificação. Após serem obtidas culturas puras, estas foram identificadas genotipicamente através do sequenciamento parcial do gene da calmodulina (CAL).

- Identificação genotípica

Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico do fungo foi obtido a partir de sua fase filamentosa. O processo de extração, se baseou em Woods et al. (1993), onde um fragmento da colônia foi congelado em nitrogênio líquido, sofrendo posterior lise mecânica com o auxílio de um “pilão”. Após a lise celular, o DNA passou por um processo de lavagem em tampão TES e em clorofórmio álcool isoamílico, sofrendo sucessivas centrifugações e vortexizações, e posteriormente suspenso em acetato de sódio 3M e em etanol 100%, novamente lavado em álcool 70%, e finalmente ressuspenso em 50 µL de água destilada, sendo então armazenado a 4°C overnight. O DNA extraído foi então quantificado no Nanovue, e diluído para que se obtenha 25 ng de DNA.

Sequenciamento parcial do gene CAL

Para realização do sequenciamento parcial do gene CAL as seguintes sequências iniciadoras (“primers”) foram utilizadas: “primers” senso CL1 (5’-GA(GA) T(AT) CAA GGA GGC CTT CTC-3’) e antisenso CL2A (5’-TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC-3’) (O’DONNELL et al., 2000). As condições de PCR utilizadas foram iguais às previamente descritas para amplificação do gene CAL (Oliveira et al., 2010), 95°C por 10 minutos, 38 ciclos a 95°C por 1 minuto, 64,5°C por 50s, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. O sequenciamento foi realizado nas direções 5’ e 3’ em um volume de reação de 10 µl contendo 4 µl de “premix terminator”, 100 ng de DNA, 3,2 pMoles de “primer”. O mix da PCR constitui de Buffer 10x PCR/KCl, 2,0mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,04mM do mix de

dNTPs (Invitrogen), 1U de *Taq* Platinum DNA polimerase (Invitrogen), 10 μ M do Primer Cal senso e 10 μ M do Primer Cal antisenso.

4.3.7 Teste de susceptibilidade antifúngica

Foi realizado no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, em cada espécie de *Sporothrix*, com os antifúngicos de referência. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22 μ m (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH 7,0 $\pm$ 0,1 tamponado com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; 0,165 mol.L⁻¹; Sigma-Aldrich). Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (Bristol-Myers Squibb) e itraconazol em concentrações variando de 0,015 a 16 μ g.mL⁻¹ e 0,125 a 64 μ g.mL⁻¹, respectivamente. As moléculas foram diluídas em DMSO. Os isolados de *Sporothrix* foram mantidos em meio BDA e incubadas a 35°C durante 7 dias. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85g/L), e a densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 80% a 82% de transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530nm. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de 2-5x10³ céls.mL⁻¹.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos e as placas foram incubadas a 35°C, durante 48h, antes de ler os resultados para determinação da CIM frente a cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, terbinafina e anfotericina B.

4.4 DEFINIÇÃO DE TERMOS E CATEGORIZAÇÃO DE VARIÁVEIS

4.4.1 Definição dos termos

- Caso de Esporotricose: Paciente com lesão(ões) clínica(s) de nódulos, úlceras ou placas na pele com: pelo menos um exame complementar compatível com esporotricose (exame histopatológico, exame micológico direto e/ou cultura micológica) e/ou que obteve cura clínica com o tratamento antifúngico específico.
- Exame histopatológico:
 - O achado de inflamação granulomatosa supurativa foi considerada sugestiva de esporotricose, na ausência de elementos fúngicos à coloração PAS.

- O achado de inflamação granulomatosa supurativa com encontro de formas leveduriforme ao PAS foi considerado diagnóstico.
- Exame micológico direto:
 - Foi considerado positivo a presença de células leveduriformes em naveta ou elípticas, além de células leveduriformes globosas.
- Cultura micológica (de fragmento ou exsudato):
 - Foi considerado positiva quando observadas no microcultivo a 25°C hifas septadas de ramificações delicadas com conidióforos com extremidades afiladas que suportam conídios piriformes em arranjo de “flor”.
- Tempo de doença: tempo (em dias) relatado pelo paciente do início dos sintomas cutâneos até o diagnóstico com a introdução da medicação antifúngica.
- Tempo de tratamento: Tempo (em dias) da introdução do tratamento antifúngico até a cura clínica.
- Formas clínicas da esporotricose
 - Cutânea fixa: Presença de lesão papulosa, papulopustulosa, nódulo ou placa verrucosa, úlcera ou pequenos abscessos no sítio de inoculação do fungo.
 - Linfocutânea: presença de lesão nódulo-ulcerativa no sítio de inoculação e uma série de nódulos similares ao longo do trajeto dos vasos linfáticos proximais, com ou sem adenopatia satélite.
 - Cutânea disseminada: presença de pelo menos três lesões cutâneas envolvendo dois locais anatômicos diferentes.
 - Disseminada, visceral ou extracutânea: quando houve envolvimento visceral ou mucoso, acompanhado ou não de acometimento da pele.
- Cura clínica: lesão(ões) cutânea(s) cicatrizada(s) definidas como epitelização completa e ausência de crostas, áreas infiltradas ou eritema e, no caso, de lesões extra-cutâneas, o desaparecimento de lesões pré-existentes nos sítios previamente acometidos como mucosas e acometimento visceral.

4.4.2 Definição de variáveis

- Variáveis sociodemográficas e caracterização da amostra

Variáveis	Definição	Categorias
Sóciodemográficas		
Sexo	Sexo biológico do paciente	Masculino e feminino
Idade	Idade do paciente (em anos) auto-referido no momento da inclusão no estudo, categorizadas.	18-29 anos 30-59 anos ≥ 60 anos
Fototipo	Definida como cor da pele e sua reatividade à exposição solar do indivíduo conforme os critérios de Fitzpatrick (WALKER, 2003).	I -II III- IV V - VI
Procedência		Recife Região Metropolitana do Recife Interior
Ocupação	Profissão exercida ou atividade principal	Trabalhador rural Veterinário Empregado doméstico Do lar Outros

- Variáveis epidemiológicas

Variáveis	Definição	Categorias
epidemiológicas		
Contato com gatos na residência	Contato intradomiciliar com gatos, relatado pelo próprio paciente	Sim ou não
Contato recente com gatos com feridas cutâneas	Contato com gatos com feridas, em casa, trabalho ou em situação eventual, relatado pelo próprio paciente	Sim ou não

Atividades com jardim ou solo na residência, trabalho ou lazer	Sim ou não
Bairro - Cidade	Bairro da cidade em que mora

- Variáveis quanto às características clínicas dermatológicas

	Definição	Categorias
Tempo de doença	Tempo (em semanas) do início dos sintomas cutâneos até o diagnóstico e introdução da medicação antifúngica manifestação dermatológica, referido pelo próprio paciente	< 4 semanas 4 a < 8 semanas 8 a < 12 semanas ≥ 12 semanas
Forma clínica da esporotricose	Referente à classificação clínica dermatológica do aspecto das lesões cutâneas de esporotricose.	Fixa Linfocutânea Cutânea Disseminada Disseminada ou Extracutânea
Sítio anatômico acometido	Localização anatômica afetada pela dermatose, descrita pelo pesquisador.	Cabeça Pescoço Tronco Membros superiores Membros inferiores
Sítios extracutâneos	Acometimento extracutâneo da esporotricose, como o envolvimento mucoso nasal, ocular ou em órgão internos.	Sim ou Não
Condição imunossupressora Associada	Pacientes vivendo com HIV/aids, etilistas, em quimioterapia ou em uso de imunossupressores.	Sim ou Não

- Variáveis quanto às características do exame micológico e identificação molecular

Variáveis	Definição	Categorias
Exame direto	Encontro de células leveduriformes em naveta ou elípticas, além de células leveduriformes globosas.	Sim Não
Cultura micológica	Foi considerada positiva o encontro de hifas septadas de ramificações delicadas com conidióforos com extremidades afiladas que suportam conídios piriformes em arranjo de “flor” no microcultivo a 25°C	Positivo Negativo
Exame histopatológico	Compatível com esporotricose: o achado de inflamação granulomatosa supurativa foi considerada sugestiva de esporotricose, na ausência de elementos fúngicos à coloração PAS. Diagnóstico de esporotricose: Inflamação granulomatosa supurativa com encontro de formas leveduriforme ao PAS.	Compatível com esporotricose Diagnóstico de esporotricose Não compatível
Definição da espécie do Complexo <i>Sporothrix</i>	Baseado na identificação genotípica pelo sequenciamento parcial do gene da CAL.	<i>S. schenkii</i> <i>stricto sensu</i> <i>S. brasiliensis</i> <i>S. luriae</i> <i>S. globosa</i> <i>S. mexicana</i> <i>S. pallida</i> <i>S. chilensis</i>

	Definição	Categorias
Tempo de doença	Tempo (em semanas) do início dos sintomas cutâneos até a introdução da medicação antifúngica manifestação dermatológica, referido pelo próprio paciente.	<4 sem 5-8 sem >8 sem
Forma clínica da esporotricose	Referente à classificação clínica dermatológica do aspecto das lesões cutâneas de esporotricose.	Fixa Linfocutânea Cutânea Disseminada Disseminada ou Extracutânea
Sítio anatômico acometido	Localização anatômica afetada pela dermatose, descrita pelo pesquisador.	Cabeça Pescoço Tronco Membros superiores Membros inferiores
Sítios extracutâneos	Acometimento extracutâneo da esporotricose, como o envolvimento mucoso nasal, ocular ou em órgão internos.	Sim ou Não
Condição imunossupressora Associada	Pacientes vivendo com HIV/aids, etilistas, em quimioterapia ou em uso de imunossupressores.	Sim ou Não

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas; e para variáveis numéricas, média aritmética e desvio padrão (DP). Para verificar associação entre variáveis categóricas foi utilizado o teste X^2 de Pearson. Para comparação entre categorias em relação à variável numérica, foi utilizado o teste t-Student (no caso de duas categorias) ou F-ANOVA (se mais de duas categorias). Para a verificar concordância de testes diagnósticos, foi utilizado o índice *Kappa*. Para a comparação da atividade de drogas antifúngicas entre as espécies foi utilizada a média geométrica, a amplitude e o teste de Kruskal-Wallis.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, pelo parecer número 2.199.609 (ANEXO A).

Todos os pacientes foram devidamente informados sobre a finalidade e riscos do estudo, assim como do desconforto e dos benefícios que a pesquisa poderia trazer. Aqueles que aceitaram o convite para participar, receberam o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A) para assinatura em duas vias, ficando uma com o pesquisador e outra com o paciente (sujeito pesquisado). Os pacientes que assinaram o referido termo, responderam perguntas em local reservado para preenchimento da ficha de coleta de dados (APÊNDICE B).

Os pacientes foram expostos a constrangimentos na entrevista e registro fotográfico e a riscos durante realização de biópsia de pele. Para minimizá-los, foi realizado um adequado esclarecimento dos pacientes em local reservado, onde foram informados do direito de se recusar de participar da pesquisa ou desistir da sua participação a qualquer momento, sem que houvesse prejuízo ao seu tratamento ou à sua relação com a pesquisadora ou com os profissionais do HC-UFPE. Foi assegurado também que os dados pessoais e resultados dos exames dos pacientes fossem confidenciais e utilizados apenas para fins científicos, de forma que não permitisse a identificação dos participantes da pesquisa. A biópsia foi realizada nas lesões cutâneas, procedimento que já faz parte da rotina de investigação de doenças infecciosas de pele. Foi garantido aos participantes da pesquisa que a pesquisadora responsável pelo estudo ficaria disponível para esclarecer dúvidas e para dar informações sobre o andamento da pesquisa. Os esclarecimentos sobre o estudo, o procedimento de biópsia de pele e orientações sobre cuidados após o procedimento foram realizados sob orientação da pesquisadora. Este estudo não apresentou conflitos de interesse.

Os dados coletados nesta pesquisa referentes a questionários e fotografias ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora no endereço AV. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, HC-UFPE, Setor de Dermatologia, pelo período mínimo de 5 anos.

A participação no estudo beneficiou diretamente os pacientes, já que estes obtiveram a confirmação diagnóstica dos casos de esporotricose humana, fizeram tratamento antifúngico e mantiveram o acompanhamento clínico até alta dos pacientes. A definição das espécies do Complexo *Sporothrix* envolvidas com os casos locais de esporotricose humana trouxe dados

valiosos sobre o surto local, assim como o perfil de sensibilidade antifúngica dos isolados poderá sugerir as melhores medicações a serem instituídas nos casos da infecção na nossa região, após ampla divulgação.

6 RESULTADOS

6.1 ARTIGO 1 – SURTO DE ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO, NORDESTE DO BRASIL: EPIDEMIOLOGIA, MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E RESPOSTA TERAPÊUTICA

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença infecciosa granulomatosa subaguda ou crônica causada por fungos termodimórficos do complexo *Sporothrix*^{1,2}. Apresenta notada endemicidade na América Latina, principalmente no Sudeste do Brasil. A doença está intimamente ligada a diferentes formas de atividade humana, *habitats*, estilos de vida e apresenta interação tanto ambiental como zoonótica³. Nas últimas duas décadas, observou-se mudanças na epidemiologia, distribuição e taxonomia da esporotricose^{4,5}, sendo considerada atualmente uma doença emergente, em várias regiões do Brasil, principalmente sob a forma de epidemias e surtos zoonóticos⁶.

Apesar da infecção clássica estar associada à inoculação traumática do solo, plantas ou materiais contaminados pelo fungo, existem áreas geográficas em que predominam a transmissão a partir de gatos infectados, como observado no Rio de Janeiro, considerado hiperendêmico para a esporotricose, com mais de 5.000 casos humanos diagnosticados desde 1998. Casos de esporotricose felina e transmissão zoonótica também foram relatados em outros estados, especialmente no Rio Grande do Sul e em São Paulo^{6,7}. O agente etiológico responsável por esses surtos é o *Sporothrix brasiliensis*, um ramo clonal altamente patogênico das espécies clássicas *Sporothrix schenckii sensu stricto* (s. Str.)^{3,7}.

A heterogeneidade morfológica das lesões frequentemente torna o diagnóstico difícil, particularmente em regiões não endêmicas, levando a um atraso na definição diagnóstica e curso clínico protraído, com impacto na saúde pública⁸. Formas clínicas disseminadas ou atípicas com manifestações de hipersensibilidade têm sido descritas em algumas regiões e parecem estar associadas com alguns isolados do *Sporothrix*^{9–11}. Embora associada à baixa letalidade, causa morbidade considerável e requer tratamento específico para sua resolução¹². Iodeto de potássio foi o tratamento padrão durante muitos anos mas, recentemente, o itraconazol, a terbinafina e a anfotericina B têm sido utilizados com alta eficácia^{3,13–18}.

No Nordeste do Brasil, casos esporádicos de esporotricose já foram relatados, em sua maioria, de forma ocupacional acometendo indivíduos de área rural. Nos últimos quatro anos, constatou-se o aumento da detecção de casos de esporotricose felina, o que coincidiu com a

percepção de um maior número de casos humanos de esporotricose nos serviços de saúde. Diante deste cenário, com indícios de mudança do perfil epidemiológico e a falta de dados sobre a doença na região, este estudo teve o propósito de avaliar os casos de esporotricose humana em Pernambuco, sendo o primeiro estado do Nordeste do Brasil a caracterizar seus casos do ponto de vista epidemiológico, clínico e terapêutico.

MATERIAIS E MÉTODO

Local e desenho do estudo

Estudo transversal aninhado à coorte prospectiva, realizado no ambulatório especializado da Clínica Dermatológica de Hospital Universitário público na cidade do Recife, Pernambuco, Nordeste do Brasil, no período de março de 2017 a março de 2018. O setor de Dermatologia atende pacientes de todo o estado, com fluxo de atendimento de 850 pacientes ao mês. O estado de Pernambuco tem uma população estimada de 9.473.266 habitantes em 2017, dos quais 80,2% vivem em área urbana.¹⁹ A região tem clima tropical úmido no litoral e predominantemente semiárido no interior.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CAAE: 71105617.7.0000.5208).

Pacientes e seguimento

Todos os pacientes acima de 18 anos com suspeita de esporotricose e referenciados ao ambulatório foram incluídos no estudo e examinados para caracterização clínica das lesões de esporotricose, fotografados e submetidos ao exame direto do exsudato das lesões, além de duas biópsias com *punch* de 4mm, uma enviada para processamento histopatológico e outra, para exame direto e cultura micológica. Além disso, responderam questionário com dados pessoais e informações demográficas, epidemiológicas e clínicas. Foi considerado caso de esporotricose o paciente com lesão(ões) clínica(s) de nódulos, úlceras ou placas na pele com pelo menos um dos exames complementares abaixo: a. exame histopatológico com inflamação granulomatosa supurativa mista com ou sem estruturas leveduriformes visíveis, sugestivas de infecção fúngica; b. exame micológico direto com evidência de células leveduriformes hialinas, globosas ou elípticas; c. cultura micológica com desenvolvimento de *Sporothrix* sp.; e/ou que obteve cura clínica com o tratamento antifúngico²⁰. Foram excluídas gestantes e lactantes.

Após confirmação do diagnóstico de esporotricose, na ausência de doença disseminada, os pacientes iniciaram tratamento padrão com itraconazol 100 mg/dia e foram

acompanhados quinzenalmente, para observar resposta clínica, possíveis efeitos colaterais, além de definir o momento de suspender a medicação após cura. Quando, após 4 a 8 semanas, as lesões cutâneas apresentavam agravamento ou continuavam inalteradas, a dose do itraconazol foi dobrada para 200 mg/dia. Quando mesmo após 8 semanas da modificação da posologia não se observou melhora das lesões, a medicação foi substituída. A definição da dose de tratamento com o itraconazol e da forma de acompanhamento baseou-se em protocolo de coorte de pacientes com esporotricose do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas (IPEC)³. Na impossibilidade de pacientes usarem o imidazólico, foram considerados para tratamento com iodeto de potássio 3g/dia ou terbinafina 250 mg/dia. A medicação antifúngica foi suspensa após 4 semanas da cura clínica. Foi considerado clinicamente curado o paciente com lesão(ões) completamente cicatrizada(s), reepitelização completa e ausência de crostas, áreas infiltradas ou eritema. No caso de lesões extra-cutâneas, as lesões pré-existentes precisaram estar totalmente involuídas.

Análise estatística

Os dados foram analisados descritivamente através de frequências absolutas e percentuais para as variáveis categóricas e as medidas: média, desvio padrão, mediana e percentis para as variáveis numéricas. Para avaliar associação entre duas variáveis categóricas foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson ou o teste Exato de Fisher nas situações em que a condição para utilização do teste Qui-quadrado não foi verificada. Na comparação entre as categorias das variáveis independentes, em relação ao tempo de tratamento foi utilizado teste de Mann-Whitney no caso de duas categorias e o teste de Kruskal-Wallis no caso de mais de duas categorias. A margem de erro utilizada na decisão dos testes estatísticos foi de 5% e os intervalos foram obtidos com confiança de 95%. Os dados foram digitados na planilha EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IMB SPSS na versão 23.

RESULTADOS

No período pesquisado, foram atendidos no ambulatório de referência 131 pacientes com suspeita clínica de esporotricose. Obtivemos confirmação diagnóstica em 111 pacientes, dos quais 98 foram incluídos no estudo. A análise de distribuição quanto ao sexo mostrou maior ocorrência no sexo feminino (73,5%) quando comparada ao masculino (26,5%). A idade dos pacientes variou de 19 a 91 anos, com média de 47,7 anos (DP 16,7) e mediana de 48 anos. A

maioria dos casos (91,8%) tinha procedência da Região Metropolitana do Recife, área urbana do estado de Pernambuco. Não houve uma predileção absoluta por determinada ocupação; indivíduos que realizavam atividades predominantes em domicílio, desde aposentados, donas-de-casa e empregados domésticos somaram 38,7% dos casos (38/98). História de contato com gatos em domicílio esteve presente em 77,6% (76/98) dos casos, enquanto 81,6% (81/98) descreveram contato com gatos com feridas na pele, por meio de arranhaduras ou mordeduras. Apenas 27,6% (21/98) dos pacientes relataram alguma atividade com manipulação de solo ou vegetal ou plantas, a maioria de forma eventual e por lazer (Tabela 1).

A duração dos sintomas antes do atendimento médico variou de 5 a 280 dias, com média de 41,8 dias (DP= 42,43 dias) e mediana de 30 dias. A forma clínica predominante foi a linfocutânea acometendo 66 (67,3%) pacientes, seguido da cutânea fixa em 27 (27,6%) (Figura 1). A forma cutânea disseminada ocorreu em cinco casos, mas nenhum paciente apresentou envolvimento visceral (Figura 2). As lesões foram mais comumente encontradas nos membros superiores em 79 (80,6%) casos (Tabela 2). Múltiplos sítios anatômicos foram afetados por diferentes focos de inoculação num mesmo paciente em 15 (15,3%) casos.

Tabela 1: Características sociodemográficas dos 98 pacientes diagnosticados com esporotricose no ambulatório especializado do Setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, entre março de 2017 a março de 2018.

Variável	n	%
TOTAL	98	100,0
Faixa etária (anos)		
19 a 29	18	18,4
30 a 59	57	58,2
60 a 91	23	23,5
Sexo		
Masculino	26	26,5
Feminino	72	73,5
Região		
Recife	34	34,7
Outros municípios da RMR	56	57,1
Interior do estado	8	8,2
Ocupação		
Do lar / Aposentado	34	34,7
Atividade veterinária	3	3,1
Trabalhador rural	2	2,0
Estudante	4	4,1
Empregada domestica	5	5,1
Outros	45	45,9
Desempregado	4	4,1
Pedreiro	1	1,0
Possui gatos em domicílio		
Sim	76	77,6
Não	22	22,4
Contato com gatos doentes		
Sim	80	81,6
Não	18	18,4
Atividade com solo e plantas		
Sim	27	27,6
Não	71	72,4

Sintomas sistêmicos inespecíficos como febre, artralgia e cefaleia foram relatados por 37,8% dos pacientes, estando presentes em todos os casos que apresentaram manifestações de hipersensibilidade. Observou-se uma alta frequência (25,5%, n=25) de manifestações de hipersensibilidade, com 13 casos de eritema nodoso, oito casos de eritema multiforme e um de síndrome de Sweet (Figura 3). Três pacientes apresentaram concomitantemente mais de um padrão de reatividade. Condições de imunossupressão subjacentes como HIV/aids (1), uso de

medicações imunossupressoras (5), tratamento quimioterápico (1), etilismo (2) estiveram presentes em 9 pacientes.

Tabela 2: Características clínicas dos 98 pacientes com esporotricose.

Variável	n	%
TOTAL	98	100,0
Forma clínica		
Fixa	27	27,6
Linfocutânea	66	67,3
Cutânea disseminada	5	5,1
Duração dos sintomas (semanas)		
< 4	37	37,8
4 a < 8	43	43,9
8 a < 12	12	12,2
≥ 12	6	6,1
Sítios anatômicos acometidos ⁽¹⁾		
Cabeça	5	5,1
Pescoço	6	6,1
Tronco	11	11,2
Membros superiores	79	80,6
Membros inferiores	9	9,2
Sintomas sistêmicos associados		
Sim	37	37,8
Não	61	62,2
Manifestações de hipersensibilidade		
Não	73	74,5
Sim	25	25,5
Eritema nodoso	13	13,3
Eritema multiforme	8	8,2
Síndrome de Sweet	1	1,0
Eritema nodoso + multiforme	2	2,0
Eritema nodoso + eritema multiforme + síndrome de Sweet	1	1,0
Imunossupressão		
Sim	9	9,2
Não	89	90,8

(1) Os percentuais foram obtidos com base nos 98 pacientes. Considerando que o mesmo paciente pode apresentar mais de um sítio anatômico acometido, a soma das frequências pode ser superior ao total de pesquisados

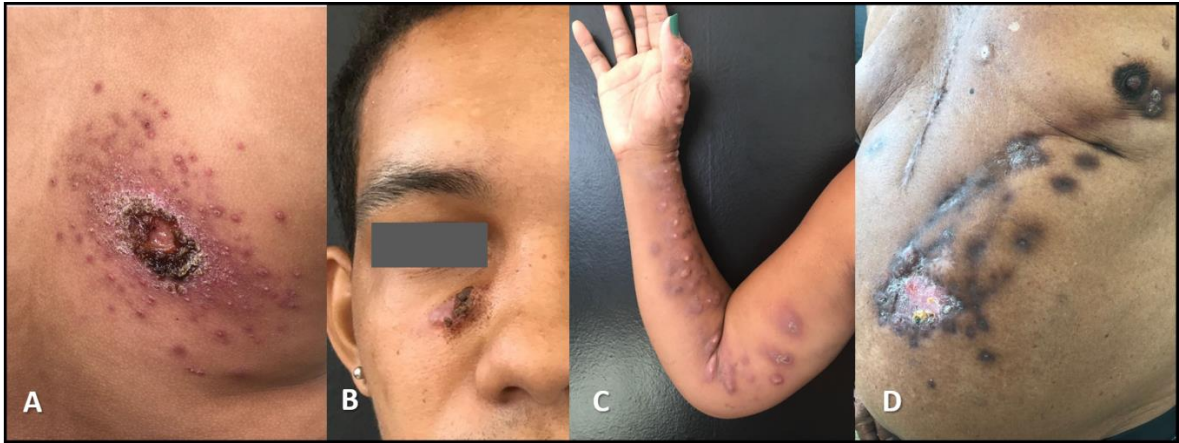


Figura 1: Formas clínicas da esporotricose. A e B: Forma fixa; C e D: Forma linfocutânea.



Figura 2: Lesões em dorso, face e membro superior em uma mesma paciente com esporotricose cutânea disseminada.



Figura 3: Pacientes com esporotricose e manifestações de hipersensibilidade. A. Eritema nodoso, artrite em joelho esquerdo em paciente com lesão fixa de esporotricose em coxa; B: Eritema multiforme; C: Síndrome de Sweet.

Tabela 3 – Avaliação da presença de manifestações de hipersensibilidade segundo a forma clínica, duração dos sintomas e imunossupressão.

Variável	Hipersensibilidade				Total		Valor p
	Sim		Não				
	n	%	n	%	n	%	
Total	25	100,0	73	100,0	98	100,0	
Forma clinica							0,251 ⁽¹⁾
Fixa	10	40,0	17	23,3	27	27,6	
Linfocutânea	14	56,0	52	71,2	66	67,3	
Cutânea disseminada	1	4,0	4	5,5	5	5,1	
Duração dos sintomas (dias)							0,006* ⁽¹⁾
5 a 15	9	36,0	9	12,3	18	18,4	
16 a 30	9	36,0	23	31,5	32	32,7	
31 a 60	7	28,0	25	34,2	32	32,7	
61 dias ou mais	0	0,0	16	21,9	16	16,3	
Imunossupressão							0,227 ⁽¹⁾
Sim	4	16,0	5	6,8	9	9,2	
Não	21	84,0	68	93,2	89	90,8	

(*) Associação significativa a 5 %

(1) Através do teste Exato de Fisher.

Quanto ao tratamento, 91 (92,9%) pacientes foram tratados com itraconazol 100mg/dia; destes, dezenove (20,8%) necessitaram de doses maiores para obter cura clínica. Por motivos de interação medicamentosa, seis receberam outros tratamentos antifúngicos com iodeto de potássio (n=3), terbinafina (n=3). Apenas um caso de esporotricose disseminada necessitou de anfotericina B desoxicolato endovenosa e manutenção com o imidazólico após controle inicial da infecção. Sete pacientes perderam seguimento antes da alta por cura. O tempo médio de tratamento foi de 18 semanas (DP=8,53), variando de 0 a 65,14 semanas, com mediana de 17,29 semanas. Cerca de 16,3% (16/98) pacientes apresentaram algum efeito colateral com o uso do itraconazol, como cefaleia, epigastralgia, cefaleia e hipertrigliceridemia, contudo não foi necessário suspender a medicação em nenhum caso. Os pacientes que apresentaram manifestações de hipersensibilidade que chegaram à consulta muito sintomáticos, usaram, além do antifúngico, prednisona 0,5mg/kg/dia por 7-14 dias e orientados a fazer repouso, com resolução do quadro.

Tabela 4 –Tempo de tratamento (em semanas) segundo a forma clínica, presença de manifestações de hipersensibilidade e imunossupressão.

Variável	Media	Desvio padrão	Estatísticas		P25	P75	Valor de p
			Mediana				
Forma clinica							p ⁽¹⁾ = 0,066
Fixa	15,02	6,31	15,00	11,0	19,0		
Linfocutânea	19,01	9,20	18,14	14,29	22,14		
Cut. Disseminada	21,14	6,24	21,29	15,29	26,93		
Manifestações de Hipersensibilidade							p ⁽²⁾ =0,046*
Sim	16,91	11,25	14,43	11,14	20,71		
Não	18,40	7,43	18,00	14,71	21,64		
Imunossupressão							p ⁽²⁾ = 0,911
Sim	18,24	6,80	18,00	12,00	22,21		
Não	18,00	8,72	17,14	13,57	21,14		

(*) Associação significativa a 5%

(1) Através do teste Kruskal Wallis

(2) Através do teste Mann-Whitney.

Não se observou diferença no tempo médio de tratamento quando categorizamos os casos por forma clínica e imunossupressão; já a presença de manifestações de hipersensibilidade esteve associada a um menor tempo de tratamento até a cura (p=0,046) (tabela 4).

DISCUSSÃO

A região Nordeste do Brasil ainda não havia documentado um grande número de pacientes com esporotricose humana, como o verificado em 2017 e 2018. A percepção de aumento dos casos da doença, em diversos serviços de saúde, motivou a criação do ambulatório de referência no Hospital universitário. Apesar de não haver dados publicados em relação aos anos anteriores, observou-se, em um ano de estudo, elevação de mais de 50 vezes no número de casos de esporotricose, de acordo com registros internos da instituição. Outros estados do Nordeste do Brasil, como Rio Grande do Norte²¹, Paraíba²² e Alagoas²³ já registraram casos de esporotricose em animais, com raros casos de transmissão zoonótica. No Brasil, casos humanos e animais da doença também foram publicados no Amazonas e Pará, entretanto, a maioria dos casos procede das regiões Sul e Sudeste¹³.

Embora animais não sejam a principal fonte de infecção para os humanos na maioria dos lugares do mundo, a transmissão zoonótica tem sido relatada a partir de mordidas e arranhaduras de gatos, picadas de insetos, manipulação de peixes, mordidas de cães, ratos, aves, répteis e cavalos ²⁴⁻²⁷. Indubitavelmente, gatos têm sido o grande veículo de disseminação dos casos de esporotricose humana que se iniciaram na região do Rio de Janeiro ^{25,28-30}, com expansão gradual para outras regiões do Brasil ^{2,31,32}. Os estados do Rio Grande do Sul e São Paulo registraram surtos de esporotricose em pequeno grupo de gatos e humanos, mas com controle epidemiológico local efetivo ^{6,7,33}. O estado de Pernambuco encontra-se a 2300 Km ao norte do Rio de Janeiro, núcleo onde se iniciou a zoonose transmitida por gatos causada pelo *Sporothrix brasiliensis*. Com o presente estudo, ficou demonstrada a alta frequência de transmissão a partir do contato com gatos, denotando caráter zoonótico da infecção na região. Apesar do nosso estudo ter sido realizado em serviço de referência para tratamento da esporotricose no nosso estado, acreditamos que o número de casos pode estar subestimado, já que alguns pacientes são atendidos em outras instituições de saúde, podem estar sendo tratados empiricamente e até se automedicando, principalmente quando há contexto de contato bem definido com felinos com esporotricose.

Cerca de 77,6% dos casos documentados no presente estudo relataram ter gatos em domicílio e 80,6% recordavam ter sofrido pequeno trauma com felinos doentes. A transmissão gato-humano está principalmente associada a arranhaduras e/ou mordidas de animais infectados com alta carga fúngica, contudo, o *Sporothrix* já foi isolado em unhas, cavidades oral e nasal de felinos aparentemente saudáveis ³⁴⁻³⁶. Em muitas ocasiões, o modo de transmissão não é identificado ³⁷. Cerca de 10-62% dos pacientes não relatam qualquer história de trauma, pois este geralmente é discreto ou de pequena significância e ocorre algumas semanas antes do desenvolvimento da doença, podendo ser esquecido ⁸. Adicionalmente, a transmissão inter-humana não é descrita ³⁸.

Encontramos um maior acometimento do sexo feminino (73,5%) e com média de idade de 47,7 anos, refletindo o mesmo perfil epidemiológico urbano da epidemia iniciada no Rio de Janeiro. Neste estado, há predominância em mulheres maiores de 40 anos, de baixo nível socioeconômico e que participam de atividades domésticas e do cuidado de animais doentes em casa ^{39,40}. Em áreas rurais do sudeste e sul do Brasil e em diversas regiões do mundo, há uma maior prevalência em homens acima de 50 anos que trabalham em atividades agrícolas, revelando um caráter ocupacional da doença ^{20,37,41}. Aparentemente, o risco de contrair a infecção é determinada, principalmente, pela chance de contato com o *Sporothrix*, independentemente de

idade, raça ou sexo, mas particularmente relacionado a atividades cotidianas domésticas, de lazer ou de trabalho ^{4,42,43}.

A apresentação clínica da esporotricose é altamente polimórfica. Em conformidade com vários registros da literatura, também encontramos a predominância da esporotricose linfocutânea (67,3%). Publicações do México, Peru, África, Índia, Uruguai e Guatemala, Venezuela, Itália e em Santa Maria, sul do Brasil documentaram a forma linfocutânea como a responsável por mais de 70% dos casos ^{37,44,45}. Por outro lado, relatos do Japão, Costa Rica e de outras regiões do Brasil não observaram diferenças no número de pacientes entre a forma fixa e linfocutânea ^{20,46,47}. Vários fatores como o modo e a profundidade de inoculação, a imunidade do hospedeiro e a virulência da espécie podem influenciar as diferentes formas de apresentação. ^{8,38,48}. Sugere-se que pacientes com certa imunidade contra o fungo desenvolvam doença fixa ou localizada, enquanto a doença linfangítica afete aqueles que não tiveram contato anterior com o patógeno ^{20,49-51}. Dos pacientes que evoluíram com formas disseminadas da esporotricose, quatro não tinham condição imunossupressora conhecida e apenas um era etilista. Formas disseminadas são raras em todo o mundo, estando mais associadas a estados de imunossupressão como a presença do HIV/aids, quimioterapia, uso de drogas imunossupressoras, etilismo e diabetes ^{13,15,20}.

O intervalo de tempo entre o início das lesões e o diagnóstico foi de 41,8 dias, semelhante ao descrito em outros estudos ^{41,52}. A literatura descreve uma grande variabilidade no tempo de duração dos sintomas até o diagnóstico. Em estudo do RS, o tempo médio entre o surgimento das lesões e o diagnóstico foi de 150 dias (5 meses) ²⁰. Verificamos que pacientes que apresentaram manifestações de hipersensibilidade tinham um menor tempo de doença; acreditamos que o surgimento de lesões reativas na pele, acompanhada de sintomas sistêmicos, tenha motivado os pacientes a buscarem atendimento médico de forma mais precoce. As extremidades superiores foram os sítios mais comumente afetados (n=79, 80,6%), convergindo com a idéia de que as áreas expostas a traumas são mais acometidas pela esporotricose ^{1,20,41}.

No presente estudo, encontramos uma frequência de 25,5% de manifestações de hipersensibilidade como eritema nodoso, eritema multiforme e síndrome de Sweet. As reações de hipersensibilidade têm sido descritas na esporotricose endêmica transmitidas por gatos no Rio de Janeiro, desde o ano de 2001, e consideradas raras ^{3,18,53-55}. Apesar de alguns casos de eritema nodoso responderem a anti-inflamatórios não hormonais ^{54,56}, os pacientes do nosso estudo apresentaram quadros intensos e até incapacitantes, pela dor local e por se acompanharem de artrite de grandes articulações em alguns casos, com rápida resolução após

7-14 dias de prednisona 0,5mg/kg/dia. Quadros mais intensos de eritema multiforme se resolveram com a mesma abordagem. Os primeiros relatos de Síndrome de Sweet associada à esporotricose foram descritos em 2012, quando duas mulheres com a forma localizada fixa desenvolveram placas eritematosas disseminadas, com clínica e histopatologia típicas da reação, após a infecção transmitida por felinos também no Rio de Janeiro⁵⁷. Tivemos dois casos de síndrome de Sweet em mulheres, associados a lesões cutânea fixa e linfocutânea da micose e com antecedente de contato animal.

Após a demonstração de que genótipos distintos podem estar relacionados a diferentes formas clínicas da doença em cobaias, as publicações de casos em humanos parecem reforçar esta hipótese^{3,58}. Almeida-Paes, em estudo transversal, foi o primeiro a explorar e demonstrar a associação entre a identificação genotípica de espécies de *Sporothrix* e os vários aspectos clínicos da esporotricose humana, mostrando associação direta entre a infecção pelo *S. brasiliensis* e 10 casos de eritema nodoso ou multiforme, além de outras 6/7 formas disseminadas³. Fatores como a transmissão felina (com tendência a apresentar inóculo fúngico repetitivo e intenso), a susceptibilidade do hospedeiro e a virulência do patógeno poderiam explicar a associação da esporotricose com manifestações de hipersensibilidade^{3,57}. É possível que a maior virulência do *S. brasiliensis* seja um fator que contribua com quadros atípicos de esporotricose no Brasil⁶, já tendo sido demonstrado em modelos experimentais que a infecção por esta espécie geralmente apresenta maior carga fúngica, invasividade e dano tecidual, quando comparado aos demais agentes do Complexo *Sporothrix*⁵⁹. Diante deste contexto, torna-se provável a participação desta espécie nos casos em Pernambuco. Mais estudos são necessários para comprovar esta identificação do *S. brasiliensis* na região.

Embora a infecção pelo *Sporothrix* raramente seja ameaçadora para vida, todas as formas clínicas trazem morbidade considerável e requerem tratamento específico^{12,15,20}. Tratamento com itraconazol foi implementado para a maioria dos pacientes, exceto para aqueles que usavam medicações com potencial de interação medicamentosa, como anticonvulsivantes, estatinas e drogas psiquiátricas. Em concordância com o estudo de Lima Barros et al., o uso de 100mg/dia de itraconazol foi eficaz em 79,1% (72/91) dos pacientes, apenas 20,9% (19/91) necessitando de doses entre 200 a 400mg/dia¹⁸.

Resolução clínica da infecção e a erradicação do *Sporothrix* nos tecidos continuam sendo os objetivos do tratamento. O tempo médio de tratamento no nosso estudo foi de 18 semanas. A literatura relata que a duração do tratamento costuma variar entre 3-6 meses, mas o tempo de tratamento permanece arbitrário, devendo ser continuado por pelo menos 4 semanas

após a remissão clínica completa para se obter a cura^{8,15}. Observamos um menor tempo para cura nos pacientes que apresentaram manifestações de hipersensibilidade, como já evidenciado em estudo do Rio de Janeiro¹⁸. Barros et al. estudaram o efeito do itraconazol na esporotricose cutânea em 645 pacientes do Rio de Janeiro, incluindo 87 pacientes com eritema nodoso ou multiforme e verificaram que pacientes com reações de hipersensibilidade resolveram suas doenças mais rapidamente quando comparados ao que não apresentaram essas reações¹⁸. Já Almeida-Paes et al., em 2014 não encontraram associação entre o tempo até a cura e essas características, contudo verificaram que pacientes com reações de hipersensibilidade apresentavam predominantemente formas fixas de esporotricose cutânea¹¹. Acredita-se que as reações possam indicar uma resposta robusta do hospedeiro contra as células leveduriformes do *Sporothrix* e teriam um papel protetor na esporotricose³.

Náuseas, desconforto epigástrico, hipertrigliceridemia, cefaleia foram alguns dos efeitos colaterais observados, mas que não motivaram a substituição da medicação. A baixa dose utilizada do itraconazol provavelmente explica a baixa incidência de efeitos colaterais¹⁸. Em estudo brasileiro na qual pacientes usaram este antifúngico para esporotricose, 18 a 21,4% dos pacientes relataram eventos adversos, sendo estes mais frequentes naqueles que receberam doses entre 200-400mg/dia¹⁸. Interessante perceber que tanto o itraconazol como o uso da terbinafina e do iodeto de potássio se mostraram eficientes em conter a infecção. Custo, facilidade de administração, perfil de segurança são fatores que devem ser considerados na escolha do tratamento⁸.

Concluimos que a esporotricose é um problema de saúde pública na área de estudo. A identificação da natureza zoonótica da esporotricose em diversos estados brasileiros, alerta para a necessidade de políticas públicas, com estratégias para contenção da epidemia. As medidas de controle incluem castração de animais de rua e o tratamento adequado de gatos doentes, cremação dos animais mortos para evitar que o fungo se perpetue na natureza, bem como a educação de proprietários sobre a posse responsável e os principais aspectos da transmissão do *Sporothrix*¹³. Os médicos que atendem pacientes suspeitos de esporotricose precisam ficar atentos à alta frequência de manifestações de hipersensibilidade, que não devem ser confundidas com quadros disseminados da doença, e estar cientes de podem tratar os indivíduos com baixa dose do itraconazol com alta eficácia, na maioria dos casos. Mais estudos são necessários para esclarecer sobre a ecologia local, seus reservatórios, a identificação das espécies na região, seu perfil de sensibilidade antifúngica e fatores de risco para o adoecimento ainda não totalmente identificados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem toda equipe da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas e do Laboratório de Micologia Médica do Centro de Biociências da Clínicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores não têm conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Takenaka M, Yoshizaki A, Utani A, Nishimoto K. A survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. *Mycoses*. 2014;57(5):294-298. doi:10.1111/myc.12158
2. de Araujo ML, Rodrigues AM, Fernandes GF, de Camargo ZP, de Hoog GS. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses*. 2015;58(8):485-490. doi:10.1111/myc.12346
3. Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9). doi:10.1371/journal.pntd.0003094
4. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2014;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
5. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
6. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):2-8. doi:10.1371/journal.ppat.1006077
7. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. *PLoS Pathog*. 2016. doi:10.1371/journal.ppat.1005638
8. Mahajan VK. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/272376
9. Gutierrez-Galhardo MC, Barros MBL, Schubach AO, et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis [5]. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2005. doi:10.1111/j.1468-3083.2005.01148.x
10. Schubach A, Bastos De Lima Barros M, Pacheco Schubach TM, et al. Primary conjunctival sporotrichosis: Two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea*. 2005. doi:10.1097/01.ico.0000151504.26695.3e

11. Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003094
12. Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1999;(29):231-236.
13. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):606-620. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
14. Yamada K, Zaitz C, Framil VMDS, Muramatu LH. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: a 24 year experience in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011. doi:10.1590/S0036-46652011000200006
15. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007. doi:10.1086/522765
16. Heidrich D, Stopiglia CDO, Senter L, Vetoratto G, Valente P, Scroferneker ML. Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. *An Bras Dermatol*. 2011.
17. Francesconi G, Valle A, Passos S, Reis R, Galhardo M. Terbinafine (250 mg/day): An effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03306.x
18. De Lima Barros MB, Schubach AO, De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira R, Martins EB, Teixeira JL, Wanke B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole - Study of 645 patients. *Clin Infect Dis*. 2011. doi:10.1093/cid/cir245
19. IBGE. Estimativas da população residente com data de referência 1o de julho de 2017.
20. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3):451-459. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
21. Filgueira KD. Sporotrichosis in the canine species: a case report on city of Mossoró – RN. *Ci Anim Bras*. 2009;10:673-677.
22. Nunes GDL, Santos RC FK et al. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. *Arq Ciências Veterinárias e Zool da UNIPAR*. 2013;14:157-161.
23. Marques-Melo EH, Lessa DF da S, Nunes ACBT, et al. Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2014;38(2):490-498. doi:10.5327/Z0100-0233-2014380200018
24. Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: Case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993. doi:10.1093/clind/16.3.384
25. Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil.

- Int J Dermatol.* 2001.
26. Fichman V, Gremião IDF, Mendes-Júnior AAV, et al. Sporotrichosis transmitted by a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2018. doi:10.1111/jdv.14661
 27. Saravanakumar PS, Eslami P, Zar FA. Lymphocutaneous sporotrichosis associated with a squirrel bite: Case report and review. *Clin Infect Dis.* 1996. doi:10.1093/clinids/23.3.647
 28. Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz M de M, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009. doi:10.1590/S0074-02762009000500018
 29. Bastos De Lima Barros M, De Oliveira Schubach A, Gutierrez Galhardo MC, et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: Report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. In: *International Journal of Dermatology.* ; 2003. doi:10.1046/j.1365-4362.2003.01813.x
 30. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
 31. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res.* 2014;10(1). doi:10.1186/s12917-014-0269-5
 32. Rodrigues AM, De Hoog G, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant sporothrix species. *Emerg Microbes Infect.* 2014. doi:10.1038/emi.2014.33
 33. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. *An Bras Dermatol.* 2015. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447
 34. Schubach TMP, Valle a. CF, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol.* 2001.
 35. Schubach TMP, Schubach ADO, Reis RS Dos, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia.* 2002. doi:10.1023/A:1014449621732
 36. Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol.* 2008. doi:10.1080/13693780701567481
 37. Mata-Essayag S, Delgado A, Colella MT, et al. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. *Int J Dermatol.* 2013;52(8):974-980. doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05849.x
 38. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):633-654. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
 39. Barros MB d L, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An

- epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect.* 2008;136(9):1192-1196. doi:10.1017/S0950268807009727
40. Schubach A, Barros MBDL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2008. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f44c52
 41. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. *An Bras Dermatol.* 2015;90(2):273-275. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447
 42. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol.* 2005. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
 43. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999;32(5):541-545. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000500012
 44. Orofino-costa R. Esporotricose: atualização epidemiológica, etiopatogênica, laboratorial e clínico-terapêutica*. :606-620.
 45. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1). doi:10.1186/s12879-016-1338-0
 46. Itoh M, Okamoto S KH. Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica.* 1986;172:209-213.
 47. Rodriguez-Vindas J. Clinical, epidemiological and ecological aspcts pf 100 sporotrichosis cases in Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Med.* 1992;13:29-36.
 48. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol.* 2012. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.09.017
 49. Rippon JW. Sporotrichosis. In: Rippon JW, ed. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia; 1988:325-352.
 50. Bustamante B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis.* 2001. doi:10.1097/00001432-200104000-00006
 51. Vismer HF, Hull PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia.* 1997. doi:10.1023/A:1006830131173
 52. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2013. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x
 53. Orzechowski Xavier M, Riffel Bittencourt L, da Silva CM, Stone Vieira R, Pacheco Pereira HC. Atypical presentation of sporotrichosis: Report of three cases. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013. doi:10.1590/0037-868215282013
 54. Papaiordanou F, da Silveira BRL, Abulafia LA. Hypersensitivity reaction to *Sporothrix schenckii*: Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Rev Soc Bras Med Trop.*

- 2015;48(4):504. doi:10.1590/0037-8682-0111-2015
55. Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. 2018:22-32. doi:10.3390/jof4030089
 56. Orzechowski Xavier M, Riffel Bittencourt L, da Silva CM, Stone Vieira R, Pacheco Pereira HC. Atypical presentation of sporotrichosis: Report of three cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(1):116-118. doi:10.1590/0037-868215282013
 57. Freitas DFS, Valle ACF, Cuzzi T, Brandão LGP, Zancope-Oliveira RM, Galhardo MCG. Sweet syndrome associated with sporotrichosis. *Br J Dermatol*. 2012;166(1):212-213. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10496.x
 58. Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen H-D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2006. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01519.x
 59. Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, de Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 2013. doi:10.4161/viru.23112

6.2 ARTIGO 2 – COMPARAÇÃO DIAGNÓSTICA ENTRE EXAME MICROSCÓPICO DIRETO E CULTURA MICOLÓGICA A PARTIR DE DIFERENTES AMOSTRAS BIOLÓGICAS NA ESPOROTRICOSE HUMANA.

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose de implantação provocada por espécies patogênicas termodimórficas do Complexo *Sporothrix*, presente em todos os continentes ¹⁻³. Esta doença tornou-se um problema de saúde pública nas últimas décadas devido ao número crescente de casos em humanos, mudanças epidemiológicas e de distribuição geográfica, assim como tendência à transmissão zoonótica e surtos ³⁻⁵. No Brasil, uma epidemia de esporotricose humana vem ocorrendo no Rio de Janeiro a partir da transmissão felina, desde o final dos anos 1990, com expansão gradual do número de casos a alguns estados do Sul, Sudeste e Nordeste do país ^{6,7}.

Caracteristicamente, a esporotricose manifesta-se por lesões ulceradas e nódulos que progridem de forma ascendente por trajeto linfático, algumas vezes por lesões fixas e raros casos disseminados ^{3,8}. A suspeição clínica, a partir das informações epidemiológicas e aspecto morfológico das lesões, é a base para o diagnóstico precoce da esporotricose, que deve ser confirmado por exames complementares ^{6,8,9}. Recomenda-se, de forma geral, que em lesões abertas e/ou flutuantes seja coletada a secreção, enquanto em lesões fechadas e sem exsudação, obtenha-se fragmento de tecido para cultura micológica ¹⁰.

O exame diagnóstico padrão-ouro da esporotricose é o isolamento do *Sporothrix* em meios de cultura obtidos a partir de espécimes biológicos, como exsudato ou fragmento de pele, e nos casos disseminados, escarro, líquido, sangue, urina, a depender dos órgãos afetados ⁸. Contudo, o tempo necessário para se obter o resultado desse exame pode levar até quatro semanas e, ainda eventualmente, demonstrar resultados falso negativos ^{11,12}. Devido aos relatos repetitivos de escassez de células leveduriformes na infecção humana, o exame microscópico direto tem sido pouco utilizado na prática clínica e laboratorial ^{6,13,14}. Por este motivo, a sensibilidade e especificidade do exame direto permanecem pouco estudadas ¹³. Além disso, não há estudos que verifiquem se há vantagem em se obter mais de um espécime clínico para exame micológico na abordagem dos casos suspeitos de esporotricose cutânea.

Outros exames podem ser aplicados nos casos suspeitos de esporotricose humana, como a histopatologia, sorologias e estudos moleculares, sendo estes últimos ainda restritos para fins de pesquisa ^{6,15-19}. O exame histopatológico da lesão de esporotricose costuma revelar, na

maioria dos casos, uma reação granulomatosa mista supurativa, sendo o fungo raramente encontrado^{6,20-22}. Esta avaliação anatomopatológica do fragmento contribui sobremaneira para possíveis diagnósticos diferenciais e corrobora o diagnóstico de uma infecção fúngica^{9,19,20}.

A proposta deste estudo foi avaliar os métodos diagnósticos da esporotricose humana, verificando a concordância entre os métodos diagnósticos e sua eficiência (sensibilidade e especificidade do exame micológico direto e cultura), além de verificar se há vantagem em utilizar mais de um método complementar e mais de um espécime biológico para o exame micológico.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado estudo transversal a partir de pacientes com suspeita clínica de esporotricose, encaminhados ao Ambulatório de Esporotricose da Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, entre março de 2017 e março de 2018. Os pacientes responderam questionário clínico-epidemiológico e foram submetidos tanto à coleta de exsudato de lesão ulcerada, quanto à biópsia por *punch* de 4 mm para coleta de dois fragmentos de tecido de lesão. Ambos espécimes foram analisados por exame microscópico direto e cultivados em meio sólido. Um dos fragmentos de tecido foi enviado para anatomopatológico.

Os esfregaços de secreção colhidos com swab estéril e fragmentos teciduais foram confeccionados sobre lâmina, clarificados com hidróxido de potássio a 20% e corados com Giemsa. Todas as lâminas do exame direto foram analisadas com microscópio óptico com ampliação de 1000x. A leitura microscópica direta foi considerada positiva quando pelo menos uma estrutura leveduriforme sugestiva de *Sporothrix* sp. foi verificada. Concomitantemente, amostras de exsudato de lesão de pele ulcerada e fragmento de tecido foram semeados em Ágar Sabouraud Dextrose (Difco) suplementado com cloranfenicol (2g/L), incubados a 25° C e observado por até 15 dias. Uma vez que o crescimento do fungo na cultura foi detectado, a análise da micromorfologia era efetuada. Os fragmentos de biópsia enviados para exame anatomopatológico, foram fixados em formol a 10% e submetidos aos métodos convencionais de processamento, coloração com hematoxilina-eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), e em seguida, avaliados por dermatopatologista. Diante de um paciente com lesões suspeitas e epidemiologia favorável, o achado de inflamação granulomatosa supurativa foi considerado

compatível com esporotricose; o encontro de formas leveduriformes sugestivas de *Sporothrix* à coloração pelo PAS foi considerado diagnóstico ²⁰.

Foram considerados casos de esporotricose pacientes com lesões clínicas de nódulos, úlceras ou placas na pele com pelo menos um exame complementar compatível com esporotricose (exame histopatológico, exame micológico direto e/ou cultura micológica) e que obtiveram cura clínica com o tratamento antifúngico específico. Os pacientes elegíveis para o estudo foram aqueles que confirmaram o diagnóstico de esporotricose e que realizaram simultaneamente os três exames complementares (exame micológico direto e cultura obtidos tanto da secreção quanto do fragmento de pele e histopatológico).

Os dados foram armazenados em EXCEL e o programa utilizado para obtenção dos cálculos estatísticos foi o IBM SPSS versão 23. A cultura micológica foi considerada exame diagnóstico padrão-ouro. Os resultados foram expressos através de frequências absolutas e percentuais e calculadas sensibilidade, especificidade, Valor preditivo positivo (VPP), Valor preditivo negativo (VPN) e acurácia. Para avaliar associação entre duas variáveis foi utilizado o teste Exato de Fisher, considerando nível de significância de 5%. A concordância entre o exame direto e cultura micológica nos diferentes espécimes biológicos foi determinado pelo índice *Kappa*, com respectivos intervalos com 95% de confiabilidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CAAE: 71105617.7.0000.5208).

RESULTADOS

Dos 103 pacientes diagnosticados com esporotricose no período de março de 2017 a março de 2018, 85 submeteram-se aos três exames simultaneamente (exame micológico direto e cultura - de exsudato e de fragmento - e o histopatológico) e foram incluídos no estudo. As mulheres representaram 71,8% dos casos. A idade dos pacientes pesquisados variou entre 19 e 91 anos, com média de 47,78 anos (DP=17,24 anos) e mediana 48,00 anos. O tempo de doença variou de 5 a 280 dias, teve média de 41,79 dias (DP = 45,10 dias) e mediana = 29 dias (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização da amostra dos casos de esporotricose humana atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife- Brasil, de março de 2017 a março de 2018.

Variável	n	%
TOTAL	85	100,0
Faixa etária (anos)		
19 a 39	29	34,1
30 a 59	36	42,4
60 a 91	20	23,5
Sexo		
Masculino	24	28,2
Feminino	61	71,8
Região		
Recife	31	36,5
RME	45	52,9
Outro estado	9	10,6
Tempo de doença (dias)		
5 a 15	18	21,2
16 a 30	28	32,9
31 a 60	26	30,6
61 dias ou mais	13	15,3
Forma clínica		
Fixa	23	27,1
Linfocutânea	57	67,1
Cutânea disseminada	5	5,9

A cultura micológica demonstrou colônias inicialmente hialinas que após 5-7 dias de cultivo adquiriram coloração marrom escura e superfície de aspecto rugoso apresentando dobras. A micromorfologia revelou a presença de hifas hialinas septadas, delicadas e bastante ramificadas apresentando conidióforos tipo sinêmio com conídios simpodiais fusiformes ou piriformes, em disposição floral lembrando arranjo de margarida (Figura 1). Houve maior positividade da cultura a partir dos fragmentos de biópsia do que dos exsudatos (61% x 24%, respectivamente) (tabela 2). O exame microscópico direto revelou a presença de pequenas leveduras hialinas elípticas, arredondadas ou alongadas em 40% das amostras de secreção e 67,1% dos fragmentos. Em apenas 4 casos, foram visualizadas estruturas fúngicas ao PAS no exame histopatológico, sendo o encontro de inflamação granulomatosa supurativa a regra na maioria dos pacientes (83,5%).

Figura 1 – A. Exame microscópico direto clarificado com KOH demonstrando estruturas leveduriformes hialinas e ovais; B. Colônia de *Sporothrix* sp. em Ágar Sabouraud a 30°C por 10 dias apresentando superfície velutínea e escurecimento periférico; C. Micromorfologia com hifas hialinas septadas e delicadas com conidióforos originando-se de conídios hialinos primários em arranjo de buquê.

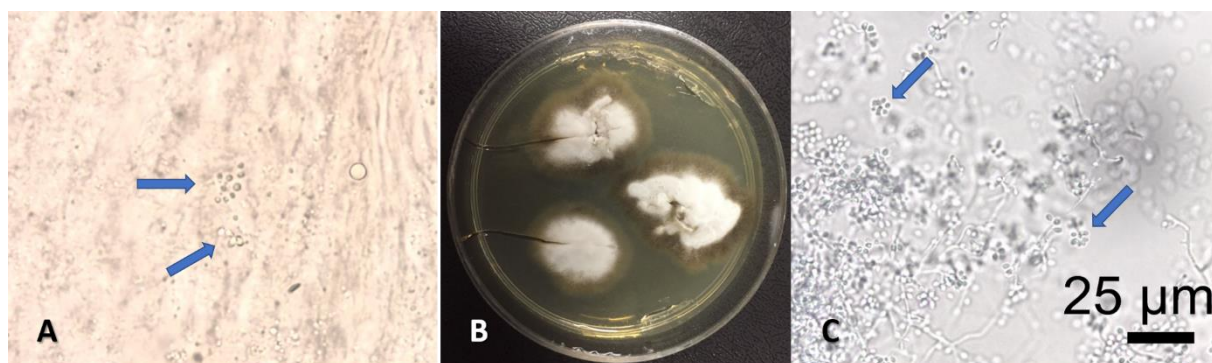


Tabela 2 – Resultado dos testes diagnósticos dos casos de esporotricose humana atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, Recife- Brasil, de março de 2017 a março de 2018.

Exame	n	%
TOTAL	85	100,0
CULTURA	55	64,7
Cultura de secreção		
Positiva	21	24,7
Negativa	64	75,3
Cultura de fragmento		
Positiva	51	60,0
Negativo	34	40,0
EXAME DIRETO	62	72,9
Exame direto de secreção		
Presença de Células leveduriformes	34	40,0
Ausência	51	60,0
Exame direto de fragmento		
Presença de Células leveduriformes	57	67,1
Ausência	28	32,9
HISTOPATOLÓGICO		
Inflamação granulomatosa supurativa	71	83,5
Inflamação granulomatosa supurativa com leveduras PAS+	4	4,7
Outros achados	10	11,8

Não encontramos diferenças entre a positividade dos diferentes exames e a forma clínica da doença. Os parâmetros de acurácia estão descritos na tabela 3. A sensibilidade do exame microscópico direto do fragmento foi de 62,7%. A concordância entre os resultados das culturas e exames diretos dos diferentes espécimes está descrita na tabela 4.

Tabela 3 – Sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e acurácia da cultura de secreção e exame direto da secreção e do fragmento em relação à cultura de fragmento - considerado padrão-ouro neste estudo - para diagnóstico de esporotricose.

Exame	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Acurácia
Cultura de secreção	33,3 (17/51)	88,2 (30/34)	81,0 (17/21)	46,9 (30/64)	55,3 (47/85)
Exame direto secreção	47,1 (24/51)	70,6 (24/34)	70,6 (24/34)	47,1 (24/51)	56,5 (48/85)
Exame direto fragmento	62,7 (32/51)	26,5 (9/34)	56,1 (32/57)	32,1 (9/28)	48,2 (41/85)

Nota: VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo.

Tabela 4 – Concordância entre o exame micológico direto e cultura micológica nos diferentes espécimes biológicos. (n=85)

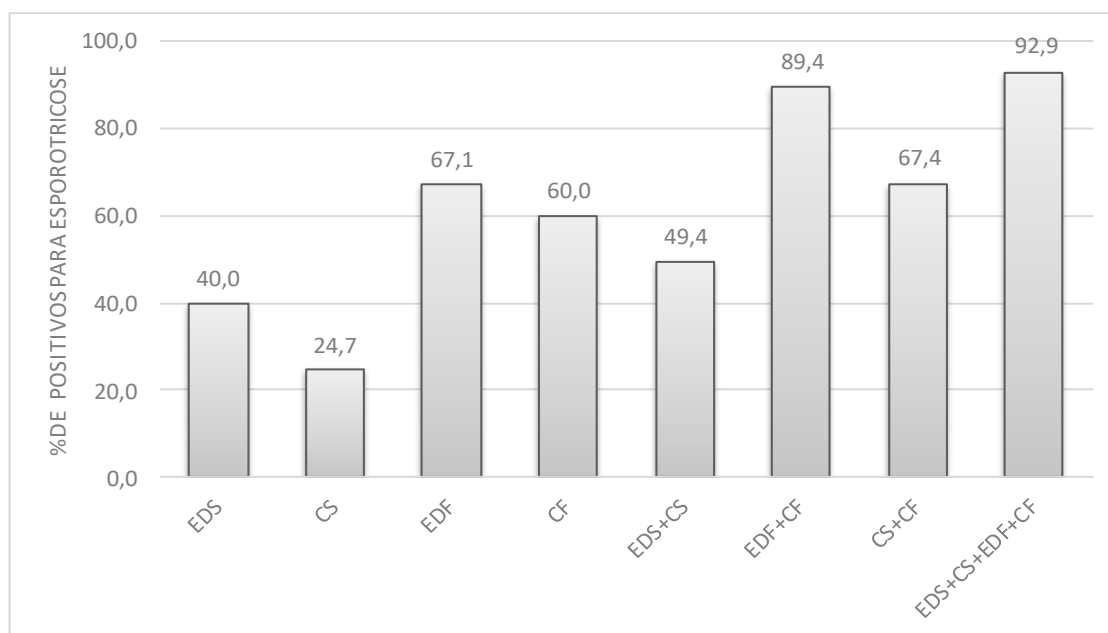
Fragmento	Cultura de secreção				Total		Valor p	Concordância	
	Positiva		Negativa					Observada	Kappa (IC 95%)
	n	%	n	%	n	%		n (%)	
Cultura							0,024*		
Positiva	17	20,0	34	40,0	51	60,0		47 (55,3)	0,19 (0,04 a 0,34)
Negativa	4	4,7	30	35,3	34	40,0			
Total	21	24,7	64	75,3	85	100,0			
Exame direto							0,003*		
Positivo	29	34,1	28	32,9	57	67,1		52 (61,2)	0,27 (0,10 a 0,44)
Negativo	5	5,9	23	27,1	28	32,9			
Total	34	41,2	51	60,0	85	100,0			

*Teste exato de Fischer

Quando comparamos a concordância entre os exames micológicos considerando-se os espécimes, foi observada baixa concordância na análise da cultura, com índice *Kappa* entre as culturas foi de 0,19 (IC 95% 0,04 a 0,34) e razoável concordância do exame direto de 0,27 (IC 95% de 0,10 a 0,44).

O gráfico 1 mostra a avaliação da positividade do exame micológico direto e da cultura entre espécimes (secreção e fragmento de pele lesional) e a combinação da sensibilidade dos métodos. Observou-se que o exame direto e cultura de fragmento juntos resultam em 89,4% de positividade nos casos de esporotricose.

Gráfico 1 – Avaliação da positividade do exame micológico direto e cultura a partir de diferentes espécimes (secreção e fragmento de pele), para diagnóstico na esporotricose humana, isolados ou agrupados (N=85).



Nota: EDS: exame direto da secreção; CS: cultura da secreção; EDF: exame direto do fragmento; CF: cultura de fragmento.

DISCUSSÃO

A esporotricose pode ser diagnosticada a partir da correlação entre os aspectos clínicos, epidemiológicos e exames laboratoriais. Encontramos uma sensibilidade geral de 64,7% da cultura micológica, valor inferior aos descritos na literatura, que variam de 78% a 95% de positividade ^{14,23}. Esses dados mostram que o método, apesar de ser considerado padrão-ouro ^{24,25}, apresenta limitações, não sendo 100% sensível ¹¹. Resultados falso-negativos geralmente ocorrem devido à coleta ou transporte inadequados, contaminação por microrganismos saprofíticos, infecções bacterianas secundárias, além de uso inadvertido de antifúngicos antes da coleta do material ²⁶. Estes fatores também estiveram presentes neste estudo e refletem as dificuldades reais da assistência em saúde.

No presente estudo, a positividade da cultura a partir do fragmento foi maior que da secreção das lesões (60% x 24,7%, respectivamente), por isso foi adotado como padrão-ouro.

Estes resultados possivelmente se deram por uma maior contaminação bacteriana da secreção da superfície das lesões quando comparada ao tecido.

O exame microscópico direto, quando realizado a partir do exsudato ou secreção, trata-se de exame não invasivo, rápido e de baixo custo²³. Curiosamente, em 40% dos exames diretos da secreção de lesões dos pacientes estudados com esporotricose foram visualizadas estruturas leveduriformes hialinas elípticas sugestivas de *Sporothrix*, e 67,1% a partir do fragmento de pele lesional, valores maiores que os descritos na literatura. Há autores que consideram o exame micológico direto uma ferramenta inútil para o diagnóstico da esporotricose humana devido à paucidade de células fúngicas na lesão cutânea, tendo pouco valor prático como instrumento diagnóstico^{13,27}, com a observação de leveduras em apenas 5% -10% dos casos de esporotricose cutânea fixa e cutâneo -linfática^{8,18,28}. Sabe-se que esfregaços corados pelo Giemsa obtidos do pus ou de *imprint* baseando-se em biópsias das lesões podem aumentar a sensibilidade do teste²². O exame direto do pus, sem hidróxido de potássio, também permite a detecção de corpos asteroides em 43,75% a 93,75% dos casos, com maior sensibilidade se coletada secreção mais profundamente^{23,29,30}. Não encontramos corpos asteroides nos exames diretos já que foi adotada metodologia de clarificação com o uso do KOH.

Os achados ao exame direto de células leveduriformes hialinas ou de corpos asteróides podem auxiliar o início de tratamento específico enquanto os resultados dos exames de cultura ou histopatológico ainda não estão disponíveis^{8,29}. Vale salientar que a observação de estruturas leveduriformes ao exame direto, no entanto, não confere diagnóstico conclusivo para esporotricose. As células características em forma de charuto (2 x3 ou 3x10 µm) nem sempre são facilmente observadas. Além disso, as leveduras do *Histoplasma capsulatum* e da *Candida glabrata* podem ser erroneamente identificadas como do *Sporothrix*³¹. Portanto, correlação clínica e epidemiológica é fundamental, assim como a exclusão de outras possibilidades diagnósticas.

A esporotricose pode não ser a primeira hipótese de diagnóstico em regiões não-endêmicas e os procedimentos gerais de coleta e processamento microbiológico para o isolamento do fungo podem não estar apropriadamente implementados fora dos serviços de referência. Nesses casos, outros métodos diagnósticos são necessários para estabelecer o diagnóstico diferencial entre a esporotricose e outras doenças com morfologia clínica semelhante, sejam doenças infecciosas (fúngicas ou não) e até lesões neoplásicas^{9,11,19,32}.

Mesmo que as formas linfocutâneas tenham uma apresentação clássica, outras doenças como leishmaniose, nocardiose e micobacterioses atípicas, podem produzir lesões

morfologicamente semelhantes ^{9,33-35}. Logo, quando diante de pacientes suspeitos de esporotricose, em formas típicas ou não, a realização de biópsia para a análise histopatológica pode contribuir sobremaneira para a definição diagnóstica ⁹. Encontramos no nosso estudo 81% de infiltrado granulomatoso supurativo, achado sugestivo de infecção fúngica, compatíveis com os da literatura que também mostram que o fungo é raramente encontrado ^{18,20}. Quando presente, apresenta-se como pequenas leveduras arredondadas ou em forma de charuto, melhor visualizadas à coloração pelo PAS ou prata metenamina ^{6,21,22}. Apesar disso, dos achados inespecíficos, o histopatológico tem grande importância no diagnóstico diferencial, ao excluir outras possibilidades diagnósticas ⁹ e tem papel de nortear a abordagem dos pacientes que não obtiveram confirmação da doença com o exame micológico, mas que apresentam aspectos clinico-epidemiológicos sugestivos de esporotricose.

O presente estudo é o primeiro, no Nordeste do Brasil, a descrever a acurácia dos métodos diagnósticos comparando a eficiência dos testes na esporotricose cutânea em humanos ao se obter mais de um espécime biológico para exame micológico. A sensibilidade do exame direto do fragmento foi de 62,7% quando comparada à cultura do fragmento. A obtenção de mais de um material biológico agregou sensibilidade ao diagnóstico, já que os espécimes não foram mutuamente positivos num mesmo paciente, como demonstrado pela baixa concordância dos resultados da cultura com índice *Kappa* de 0,19 (IC95% 0,04 a 0,34, $p=0,024$) e concordância razoável do exame direto ($K=0,27$, IC95% 0,10 a 0,44, $p=0,003$). Os exames micológicos, quando realizados em conjunto e a partir tanto da secreção como do fragmento, atingiu uma positividade de 92,9%, ratificando a importância da combinação de métodos diagnósticos.

Nossos achados podem contribuir para um melhor delineamento diagnóstico em regiões endêmicas ou com maior número de casos para esporotricose. Sugere-se que a abordagem dos casos suspeitos, realize-se o exame micológico de mais de um espécime biológico, estando indicada a análise direta e cultivo tanto da secreção quanto do fragmento de pele lesional, a fim de aumentar a probabilidade de definição da infecção dos pacientes assistidos.

REFERÊNCIAS

1. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect Dis.* 2016;16(1). doi:10.1186/s12879-016-1338-0
2. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. *An Bras Dermatol.* 2015. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447
3. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2014;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
4. López-Romero E, Reyes-Montes MDR, Pérez-Torres A, et al. Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiol.* 2011. doi:10.2217/fmb.10.157
5. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. Sporothrix schenckii complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol.* 2016;54(6):593-599. doi:10.1093/mmy/myw006
6. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 2017;92(5):606-620. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
7. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog.* 2017;13(1):2-8. doi:10.1371/journal.ppat.1006077
8. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(4):633-654. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
9. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. Nodular Lymphangitis (Sporotrichoid Lymphocutaneous Infections). Clues to Differential Diagnosis. *J Fungi.* 2018;4(2):56. doi:10.3390/jof4020056
10. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol.* 2017. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
11. Silva JN, Passos SRL, Menezes RC, et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Med Mycol.* 2015;53(8):880-884. doi:10.1093/mmy/myv038
12. Silva JN, Miranda LHM, Menezes RC, et al. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *J Comp Pathol.* 2018;160:72-78. doi:10.1016/j.jcpa.2018.03.002
13. Mahajan VK. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/272376

14. Oyarce JA, García C, Alave J, Bustamante B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. *Rev Chil infectología*. 2016;33(3):315-321. doi:10.4067/S0716-10182016000300012
15. Bernardes-Engemann AR, De Lima Barros M, Zeitune T, Russi DC, Orofino-Costa R, Lopes-Bezerra LM. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: A follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. *Med Mycol*. 2014;53(1):28-33. doi:10.1093/mmy/myu058
16. Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004
17. Rodrigues AM, Najafzadeh MJ, De Hoog GS, De Camargo ZP. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1-16. doi:10.3389/fmicb.2015.01385
18. Quintella LP, Lambert Passos SR, Francesconi Do Vale AC, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: A series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011. doi:10.1111/j.1600-0560.2010.01626.x
19. Quintella LP, Passos SRL, De Miranda LHM, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012. doi:10.1111/j.1365-2133.2012.11012.x
20. Zhang YQ, Xu XG, Zhang M, et al. Sporotrichosis: Clinical and histopathological manifestations. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(3):296-302. doi:10.1097/DAD.0b013e3181f5b622
21. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*. 2012. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.09.017
22. Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clin Exp Dermatol*. 2002. doi:10.1046/j.1365-2230.2002.01087.x
23. Civilia ES, Bonasse J, Conti-Díaz IA, Vignale RA. Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol*. 2004;43(11):808-810. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02271.x
24. Rippon JW. Sporotrichosis. In: Rippon JW, ed. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia; 1988:325-352.
25. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. *J Fungi*. 2017. doi:10.3390/jof3010006
26. Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol*. 1982. doi:10.1016/S0046-8177(82)80267-0
27. Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. Cutaneous Involvement in the Deep Mycoses: A Literature Review. Part I—Subcutaneous Mycoses. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(10):806-815. doi:10.1016/j.adengl.2016.05.026

28. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. *J Fungi*. 2017;3(1):6. doi:10.3390/jof3010006
29. Gezuele E, Da Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol*. 2005. doi:10.1016/S1130-1406(05)70028-0
30. De Lima Barros MB, Pacheco Schubach TM, Gutierrez Galhardo MC, et al. Sporotrichosis: An Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):777-779. doi:10.1590/S0074-02762001000600006
31. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
32. Miranda LHM, Conceição-Silva F, Quintella LP, Kuraem BP, Pereira SA, Schubach TMP. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013. doi:10.1016/j.cimid.2013.03.005
33. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007. doi:10.1086/522765
34. Barros MB d L, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*. 2008;136(9):1192-1196. doi:10.1017/S0950268807009727
35. Smego RA, Castiglia M, Asperilla MO. Lymphocutaneous syndrome: A review of non-sporothrix causes. *Medicine (Baltimore)*. 1999. doi:10.1097/00005792-199901000-00004

6.3 ARTIGO 3 – SURTO DE ESPOROTRICOSE HUMANA NO NORDESTE DO BRASIL: IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS ESPÉCIES E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA

INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma infecção fúngica subcutânea provocada por fungos dimórficos do gênero *Sporothrix* sp., que afeta humanos e animais em todo o mundo, de forma esporádica ou em surtos.¹ Nas últimas duas décadas, a esporotricose vem mudando seu perfil epidemiológico de uma infecção ocasional, por inoculação do fungo de origem ambiental, para um problema de saúde pública epidêmico por transmissão zoonótica, na região Sudeste do Brasil, com aparente extensão para outras regiões do país.²

A maioria das espécies incluída no gênero *Sporothrix* são fungos saprófitas ambientais, não patogênicos, que estão intimamente relacionados com madeira em decomposição, plantas e solo.³ Atualmente são reconhecidos como membros do complexo *Sporothrix schenckii* as espécies *S. schenckii sensu strictu*, *S. globosa*, *S. luriei* e *S. brasiliensis*.^{1,4} O complexo *Sporothrix pallida*, apresenta baixa patogenicidade e inclui o *S. mexicana*, *S. pallida* e o *S. chilensis* com relatos apenas esporádicos de esporotricose ocasionada por estas espécies^{1,5-7}. *Sporothrix brasiliensis* e *Sporothrix mexicana* são conhecidos por terem focos regionais na América do Sul, *Sporothrix globosa* na Europa e na Ásia e *Sporothrix luriei* tem sido raramente isolado na África do Sul.⁸

As manifestações clínicas da esporotricose dependem da imunidade do hospedeiro, do tamanho e profundidade do inóculo e do genótipo do *Sporothrix*.^{3,8} Recentemente, tem aumentado o número de evidências sugerindo que diferentes espécies de *Sporothrix* podem apresentar diferentes graus de virulência, com base na sua capacidade de se evadir do reconhecimento imunológico⁹, ser reconhecido por células mononucleares humanas e induzir resposta imune.^{10,11} Dessa forma, quadros mais atípicos e disseminados poderiam estar associados a cepas mais virulentas.¹²

O *Sporothrix*, além de apresentar uma alta diversidade genética, acompanha-se de respostas *in vitro* variáveis aos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose.^{13,14} Embora a anfotericina B (AMB) e o itraconazol (ITC) sejam considerados primeira ou segunda linha de tratamento para várias apresentações clínicas de esporotricose¹⁵ têm sido relatados isolados resistentes a estas drogas e outros agentes antifúngicos.^{8,14,16} As diferenças nos padrões de sensibilidade a partir de diferentes espécies, fontes (humano, animal

ou ambiental) e regiões geográficas destacam a necessidade de se realizar a identificação das espécies e testar a susceptibilidade antifúngica para ajustar o regime terapêutico e evitar recaídas.^{13,14,17-19}

Até o momento, não existem publicações quanto à identificação genômica ou susceptibilidade antifúngica dos seus agentes etiológicos envolvidos no recente surto de esporotricose em Pernambuco, Nordeste do Brasil. Diante deste cenário, o objetivo deste estudo foi identificar as espécies do complexo *Sporothrix* baseado no sequenciamento do gene da calmodulina (CAL), a partir de isolados humanos. Adicionalmente, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para anfotericina (AMB), ITC, voriconazol (VRC), fluconazol (FLC) e terbinafina (TRB) contra os isolados foi determinada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolados fúngicos

Amostras clínicas foram coletadas durante o período de março de 2017 a março de 2018 de pacientes referenciados ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) em Recife, Pernambuco, Brasil, com esporotricose fixa, linfocutânea ou disseminada. Todos os 26 isolados haviam sido previamente identificados como *Sporothrix* sp. pelo cultivo no diagnóstico laboratorial micológico de rotina. Os isolados foram mantidos em ágar Sabouraud com glicerol a 20% a -80 °C.

Análise genômica

Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído segundo Inácio et al. (2016) com modificações quanto às demandas dos fungos: isolados de *Sporothrix* sp. cresceram a 35 °C por 7 dias em placas de Petri contendo Potato Dextrose Agar (PDA-Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD, USA). A massa de células foi então transferida para um tubo de microcentrífuga contendo matriz de esferas de vidro, onde foram adicionados 1,5 ml de base de brometo de cetiltrimetilamônio a 4% (CTAB) aquecido a 65 °C. Os tubos foram agitados no FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) por 1 min a uma velocidade de 5.5 m/s (metros por Segundo) e incubado a 65 °C por 1 h. Álcool clorofórmio isoamílico (24:1) foi usado para desproteinizar o fragmento micelial, seguido por precipitação do DNA com isopropanolol, lavagem com etanol a 70% e ressuspensão em água ultrapura estéril. A extração do DNA do *Sporothrix* sp. foi realizada com o fungo em sua fase filamentosa.

Reações de PCR e sequenciamento do gene da Calmodulina

O DNA extraído foi amplificado por PCR usando os primers CL1 (5-GA (GA) T (AT) CAAGGAGGCCTTCTC-3) e CL2A (5-TTTTTCAT CATGAGTTGGAC-3)²¹. Regiões CAL foram amplificadas de acordo com os seguintes parâmetros do ciclo: desnaturação primária a 95 °C por 10 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1min, anelamento a 56 °C por 1min, com uma extensão final a 72 °C por 10 min. Os amplicons foram purificados usando o illustra™ Alkaline Phosphatase and Exonuclease. Um kit (illustra™ ExoProStar™, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções do fabricante e o sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento - LABCEN/CCB (UFPE).

Análise filogenética

As sequências foram editadas no software BioEdit versão 7.2.6.1 e os isolados clínicos tiveram as espécies identificadas por meio de uma busca de sequências similares ($\geq 99\%$ de similaridade) no GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento foi realizado no software Molecular Evolutionary Genetics Analysis software versão 7.0 (Mega7), onde também a árvore filogenética foi construída pelo método estatístico de máxima verossimilhança. A distância entre as sequências foi calculada utilizando o parâmetro Kimura-2²⁰ plus Gamma (K2P+G). Este modelo de substituição foi selecionado usando a ferramenta FindModel (<https://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/findmodel/findmodel.cgi>). Um bootstrap com 1.000 replicações foi realizado. Espécies do Complexo *Sporothrix pallida* foram escolhidas como um grupo externo para melhor compreensão das relações evolutivas do filograma²¹.

Testes de susceptibilidade antifúngica

Os antifúngicos padrão usados atualmente no tratamento da esporotricose foram testados contra isolados *Sporothrix* sp.: AMB (Bristol-Myers Squibb, USA), ITC (Janssen Pharmaceutica, Belgium), TRB (EMS, Brazil) e FLC (Pfizer, USA) com concentrações variando entre 0,03 e 0,016 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AMB e ITC, e entre 0,0125 e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para TRB e FLC nas placas de microtitulação de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). VRC (Pfizer, USA) e KTC (Medley, Brazil) também foram testados embora não sejam comumente utilizados no tratamento da esporotricose, com concentrações variando entre 0,03 e 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A determinação da CIM seguiu protocolo CLSI M38-A2, com algumas modificações nos critérios de leitura, que foi feita considerando-se 100% de inibição em comparação ao crescimento no poço controle para todos os fármacos. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi a cepa de controle

de qualidade para o teste. RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), esterilizado em membranas de 22mm (Millipore, Darmstadt, Germany), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH 7,0 $\pm$ 0,1 ml tamponado com 3-[N-morfolina] propano -ácido sulfônico (MOPS; 0,165 mol. L⁻¹; Sigma-Aldrich) foi o meio utilizado para diluição de fármacos e para a adição de 100 μ L de inóculo padronizado em cada poço. Os isolados de *Sporothrix* sp. foram incubados a 35 °C durante 7 dias em meio PDA. A suspensão do inóculo foi preparada em solução salina (0,85g/L) e a densidade ajustada de acordo com a escala de MacFarland de 80% a 82% de transmitância do espectrofotômetro a 530 nm. A suspensão de inóculos foi diluída em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ células. mL⁻¹. As placas foram incubadas 35°C durante 48h antes da leitura do teste.

RESULTADOS

Os pacientes tinham de 18 a 71 anos de idade, e razão entre mulheres e homens foi de 4:1. Informações sobre as cepas estão sumarizadas na Tabela 1. A análise genotípica mostrou que 92,3% (24/26) dos isolados foram identificados como *Sporothrix brasiliensis* e 7,7% (2/26) como *S. schenckii*, de acordo com a Tabela 1. A Figure 1 mostra a árvore filogenética dos isolados baseada na reação de PCR do gene CAL. Os altos valores de bootstrap suportam a identificação genotípica das cepas clínicas. As faixas do CIM dos seis antifúngicos testados contra *S. brasiliensis* and *S. schenckii* são mostradas na Tabela 2. Os CIM da AMB, KTC, ITC, FLC, TRB e VRC variaram entre 0,125-8, 0,03- $\geq$ 16, 0,03- $\geq$ 16, 2->64, 0,125-8 e 1->16 μ g/mL, respectivamente. Os CIMs das drogas testadas para *Candida parapsilosis* ATCC 22019 mostram faixas dentro dos padrões preconizados pelo CLSI. A TRB apresentou a melhor atividade contra as cepas de *Sporothrix* sp., seguidas de ITC, KTC e AMB sequencialmente. VRC e FLC foram as drogas com menor atividade contra *Sporothrix* sp. ocorrendo atividade inibitória em altas concentrações na maioria das vezes ou sem inibição.

Tabela 1. Resultados da análise genotípica pelo sequenciamento parcial do gene CAL de 26 isolados de *Sporothrix* spp.

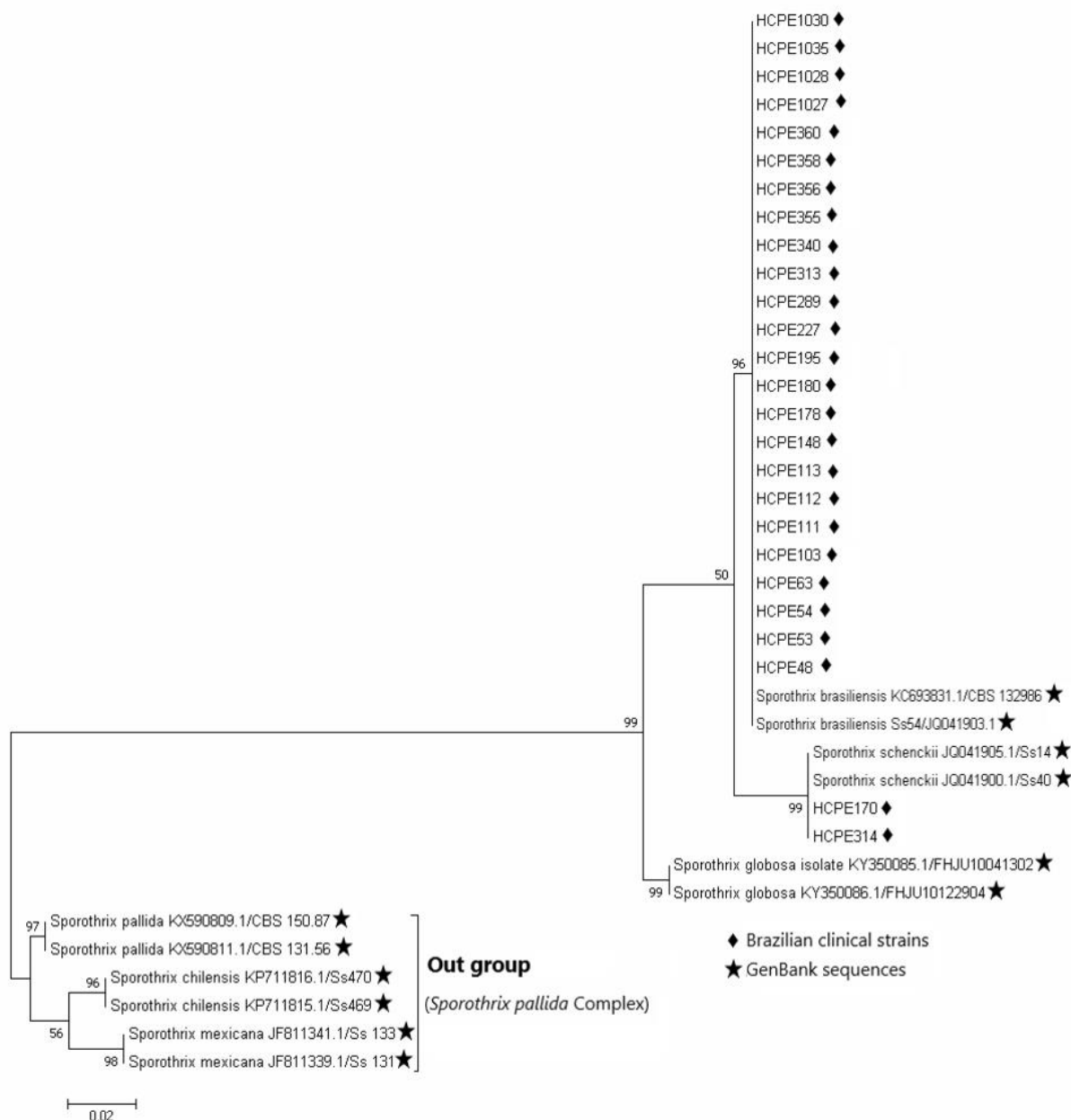
ISOLADOS	FONTE HUMANA	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA
HCPE 48	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 53	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 54	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 63	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 103	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 111	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 112	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 113	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 148	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 170	Linfocutânea	<i>S. schenckii</i>
HCPE 178	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 180	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 195	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 227	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 289	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 313	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 314	Linfocutânea	<i>S. schenckii</i>
HCPE 340	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 355	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 356	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 358	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 360	Cutânea fixa	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1027	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1028	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1030	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1035	Linfocutânea	<i>S. brasiliensis</i>

Tabela 2. Valores de MIC de seis drogas anti-fúngicas contra 26 isolados do Complexo *Sporothrix schenckii* (24 de *S. brasiliensis* e 2 de *S. schenckii*).

		Antifungal Drugs					
		AMB	KTC	ITC	FLC	TRB	VRC
		MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
Species (n)							
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (24)	Range GM	0,125-8 µg/mL 1,091	0,03-≥16 µg/mL 0,576	0,03-≥16 µg/mL 0,838	2-≥64 µg/mL 33,903	0,125-8 µg/mL 0,297	0,5-≥16 µg/mL 5,339
<i>S. schenckii</i> (2)	Range GM	0,25-2 µg/mL 0,707	0,06-1 µg/mL 0,245	0,03-0,06 µg/mL 0,043	1-≥64 µg/mL 8	0,125 µg/mL 0,125	0,5-≥16 µg/mL 2,828

AMB: amphotericin B, KTC: ketoconazole, ITC: itraconazole, FLC: fluconazole, TRB: terbinafine, VRC: voriconazole, MIC: minimal inhibitory concentration; GM: geometric mean

Figura 1: Relações filogenéticas do gene codificador da calmodulina entre amostras clínicas de *Sporothrix*. Os altos valores de bootstrap suportam os clades formados.



DISCUSSÃO

A região Nordeste do Brasil tem demonstrado número de casos crescente de esporotricose. No presente estudo, identificamos as espécies de 26 isolados de lesões cutâneas em pacientes com esporotricose, identificando o *S. brasiliensis* como o prevalente no recente surto do estado de Pernambuco. O Estado de Pernambuco encontra-se a 2300 Km ao norte da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, núcleo onde se iniciou a zoonose causada por *Sporothrix brasiliensis*, e vem vivenciando surto de esporotricose transmitida por gatos. No Sul

e Sudeste do Brasil, a transmissão zoonótica da esporotricose está bem documentada, com predominância absoluta do *S. brasiliensis* como agente etiológico.^{2,5,22} É digno de nota que o *S. schenckii* s. str. pode também afetar gatos, entretanto, numa frequência significativamente menor^{23,24}

A análise genotípica revelou *S. brasiliensis* como a espécie patogena prevalente na ocorrência da esporotricose no Estado, semelhante ao caso do surto no Rio de Janeiro. A análise filogenética mostrada na Figura 1 fornece um suporte robusto à identificação genotípica. É importante destacar que os casos de esporotricose estiveram concentrados à área urbana da Região Metropolitana do Recife, onde o clima é quente e úmido, semelhante à cidade do Rio de Janeiro. Embora não ser possível afirmar que o universo de pacientes com esporotricose neste serviço seja a realidade do estado, podemos supor que a amostra é representativa da situação atual da doença já que este hospital tem o único centro qualificado e especializados para diagnóstico e tratamento da esporotricose humana na região.

Nosso estudo apresentou perfis de susceptibilidade antifúngica, com dados de MIC para diversos antifúngicos., o que é particularmente relevante diante das recentes mudanças taxonômicas das espécies de *Sporothrix*. Em concordância com diversos estudos, demonstramos que a TRB é o antifúngico mais efetivo contra isolados de *Sporothrix*, apresentando baixos MICs (GM de 0,297 µg/ml e 0,125 µg/ml para *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, respectivamente).^{13,17,25,26}. Estudos *in vivo* dão suporte a esses achados.^{27,28}. Chapman et al. (2004) relataram alta eficácia da TRB no tratamento da esporotricose cutânea e linfocutânea.²⁷ Em contraste, Almeida-Paes et al. (2016) observaram um isolado de *S. schenckii* resistente à terbinafina e atribuiu essa resistência à proteção da melanina da parede do fungo.²⁹

O ITC é outra droga de escolha para tratar esporotricose, embora sua eficácia contra cepas de *Sporothrix* spp ainda seja incerta. No estudo atual, o ITR mostrou boa atividade antifúngica *in vitro* de forma semelhante ao exposto em outros relatos^{18,19,30}. Por outro lado, parece haver uma variação na atividade antifúngica de acordo entre as espécies. Estudos relataram altos valores de MIC para ITC contra o *S. schenckii*^{13,31} mas com boa atividade contra o isolados de *S. brasiliensis*. Até agora, não existem *breakpoints* para este fungo, contudo o documento M38-A2 propõe, para fins analíticos, que os fungos filamentosos com MIC $\geq 4 \mu\text{g} / \text{ml}$ para ITC sejam considerados resistentes.

AMB é uma das drogas de escolha no tratamento de algumas formas clínicas da esporotricose¹⁵ No presente estudo, AMB teve variabilidade MIC de 0,125 a 8,00 µg/ml, como

já relatado anteriormente.^{17,19,32} Já foi descrita resistência primária de alguns isolados do *Sporothrix* ao AMB, levando à falha terapêutica em pacientes infectados com estas cepas resistentes³³.

Encontramos uma baixa atividade antifúngica do VRC contra *Sporothrix* (GM > 16 µg/ml) para a fase micelial dos isolados, conforme já demonstrado na literatura^{13,18,25,26,34}. O VRC mostram fraca atividade inibitória contra espécies de *Sporothrix*, com MICs muito altos. Para voriconazol, as GM variaram de 3,88 a 27,2 µg/ml, segundo Marimon et al. (2008) e McGinnis et al. (2001)^{13,35}.

Em comum com nossos achados (GM = 30,34 µg/ml), o FLC tem demonstrado pouca ou nenhuma atividade contra *Sporothrix* sp. *in vitro*.^{18,31,32} Apesar destes resultados, o fluconazol ainda é considerado uma alternativa de tratamento para esporotricose linfocutânea, com relatos de boa resposta clínica contra as formas fixas da infecção em alguns pacientes iranianos³⁶.

Os resultados variados na literatura e a discordância de alguns resultados entre os estudos decorrem, provavelmente, devido a diferenças nos genótipos dos isolados¹⁹, variações no tempo de incubação e temperatura, modificações dos protocolos de testagem de sensibilidade antifúngica do complexo *S. schenckii*^{17,26,37}, a fonte (no presente estudo, exclusivamente humano)³⁸ ou mesmo a origem geográfica dos isolados¹⁸. É importante ressaltar que antes do *S. Schenckii* ser reconhecido como um complexo, todos os isolados estudados foram considerados uma única espécie. Isso também pode explicar o desacordo entre os resultados de diferentes estudos¹⁹.

Ainda que as leveduras sejam as formas parasitárias do complexo *Sporothrix schenckii* em humanos e animais, a maioria dos estudos têm usado a forma filamentosa do fungo, provavelmente devido ao aumento do requerimento nutricional e desafios associados à conversão da fase de crescimento.^{13,17,39}

Para o nosso conhecimento, o presente estudo foi o primeiro a identificar genotipicamente as espécies do complexo *Sporothrix* no Nordeste do Brasil. A baixa eficácia do VRC e FLC e a ampla variabilidade dos MIC para AMB apontam para um provável papel fungistático desta droga. A existência de cepas ou espécies dentro do complexo *Sporothrix* com resistência a múltiplas drogas corroboram para a necessidade de monitorar os valores de MIC durante o tratamento.¹⁹.

Em conclusão, a identificação molecular dos agentes de esporotricose em Pernambuco mostraram uma ocorrência predominante do *S. brasiliensis*. Torna-se evidente o aumento na eficiência de transmissão da esporotricose a partir de felinos, resultado da prevalência irrefutável desta espécie na região. Conhecer a alta eficácia *in vitro* da TRB e ITC e ausência de isolados multirresistentes, no surto local, podem ajudar na escolha da terapia antifúngica em diferentes grupos de risco epidemiológico, com potencial impacto no desfecho clínico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Plataforma de Sequenciamento do Departamento de Genética da UFPE e ao Laboratório de Micologia Médica do Centro de Biociências da UFPE pela infraestrutura para realização dos testes de sensibilidade.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores não têm conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
2. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014;10(1). doi:10.1186/s12917-014-0269-5
3. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
4. Zhang Z, Liu X, Lv X, Lin J. Variation in Genotype and Higher Virulence of a Strain of *Sporothrix schenckii* Causing Disseminated Cutaneous Sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2011;172(6):439-446. doi:10.1007/s11046-011-9441-7
5. Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix*

- schlenckii complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004
6. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol*. 2016;120(2):246-264. doi:10.1016/j.funbio.2015.05.006
 7. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2014;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
 8. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia - Mol Phylogeny Evol Fungi*. 2015;35(1):1-20. doi:10.3767/003158515X687416
 9. Hernández-Chávez M, Pérez-García L, Niño-Vega G, Mora-Montes H. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *J Fungi*. 2017. doi:10.3390/jof3040051
 10. Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E. Molecular Components of the *Sporothrix schenckii* Complex that Induce Immune Response. *Curr Microbiol*. 2016;73(2):292-300. doi:10.1007/s00284-016-1045-5
 11. Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. 2018:22-32. doi:10.3390/jof4030089
 12. Almeida-Paes R, De Oliveira LC, Oliveira MME, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. *Biomed Res Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/212308
 13. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008. doi:10.1128/AAC.01012-07
 14. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Cássia Pires D, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis*. 2014.

doi:10.1186/1471-2334-14-219

15. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007. doi:10.1086/522765
16. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol*. 2015. doi:10.1093/mmy/myu056
17. Silveira CP, Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *J Med Microbiol*. 2009. doi:10.1099/jmm.0.007609-0
18. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrill MR, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *J Music Ther*. 2015;52(1):56-64. doi:10.3109/13693786.2013.818726
19. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol*. 2016;54(6):593-599. doi:10.1093/mmy/myw006
20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980. doi:10.1007/BF01731581
21. Suzuki R, Yikelamu A, Tanaka R, Igawa K, Yokozeki H, Yaguchi T. Studies in phylogeny, development of rapid identification methods, antifungal susceptibility, and growth rates of clinical strains of *Sporothrix schenckii* complex in Japan. *Japanese J Med Mycol*. 2016;57(3):E 47-E 57. doi:10.3314/mmj.16-00005
22. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
23. Rodrigues AM, De Hoog S, De Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol*. 2013;51(4):405-412. doi:10.3109/13693786.2012.719648

24. Kano R, Okubo M, Siew HH, Kamata H, Hasegawa A. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. *Mycoses*. 2015. doi:10.1111/myc.12302
25. Meinerz ARM, Nascente PDS, Schuch LFD, et al. In vitro susceptibility of isolates of *Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007.
26. Galhardo MCG, De Oliveira RMZ, Do Valle ACF, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*. 2008. doi:10.1080/13693780701742399
27. Chapman SW, Pappas P, Kauffmann C, et al. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. *Mycoses*. 2004. doi:10.1046/j.1439-0507.2003.00953.x
28. Heidrich D, Stopiglia CDO, Senter L, Vettoratto G, Valente P, Scroferneker ML. Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. *An Bras Dermatol*. 2011.
29. Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MHG, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira MME, Zancoppe-Oliveira RM. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0152796
30. Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz M de M, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. doi:10.1590/S0074-02762009000500018
31. OLIVEIRA DC, LORETO ÉS de, MARIO DAN, et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combines antifungal agenst and characterization of enzymatic profiles. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(4):289-294. doi:10.1590/S0036-46652015000400003
32. Alvarado-Ramírez E, Torres-Rodríguez JM. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. doi:10.1128/AAC.01176-06

33. Ellis D1. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(1):7-10.
34. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. Sporothrix schenckii complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol.* 2016. doi:10.1093/mmy/myw006
35. McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. Sporothrix schenckii sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol.* 2001.
36. Ghodsi, Shams, Naraghi, et al. Case report. An unusual case of cutaneous sporotrichosis and its response to weekly fluconazole. *Mycoses.* 2000. doi:10.1046/j.1439-0507.2000.00525.x
37. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, et al. Susceptibility of Sporothrix brasiliensis isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol.* 2015. doi:10.1093/mmy/myu056
38. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of the sporothrix schenckii complex. *Rev Iberoam Micol.* 2014. doi:10.1016/j.riam.2013.09.008
39. Oliveira MME, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancoppe-Oliveira RM. Molecular identification of Sporothrix species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013. doi:10.1590/0074-0276130239

7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados demonstram que a esporotricose humana em Pernambuco apresenta-se em surto, no qual os gatos parecem ter um papel fundamental na cadeia de transmissão. O caráter zoonótico da doença na região alerta para a necessidade urgente de políticas públicas para contenção da epidemia da esporotricose em felinos.

A esporotricose afetou predominantemente mulheres, com média de idade de 47,7 anos, com lesões em membros superiores sob a forma linfocutânea, refletindo o mesmo perfil epidemiológico urbano da epidemia iniciada no Rio de Janeiro. Destaca-se a alta frequência (25,5%) de manifestações de hipersensibilidade, como eritema nodoso, polimorfo e Síndrome de Sweet, como possível consequência da maior virulência da espécie responsável pelo surto.

A positividade da cultura micológica a partir do fragmento foi maior que a da secreção, sendo adotada como padrão-ouro, neste estudo. A concordância entre os resultados dos exames micológicos, considerando-se os diferentes espécimes, foi baixa na análise da cultura, e razoável na do exame direto, sugerindo que há vantagem em se obter mais um espécime biológico para exame micológico, na abordagem de casos suspeitos de esporotricose. Quando realizados em conjunto, atingiu-se uma positividade de 92,9%.

O tratamento com itraconazol em baixas doses mostrou-se eficaz na maioria dos casos. O tempo médio de tratamento foi de 18,7 semanas, sendo menor nos pacientes com manifestações de hipersensibilidade. Não se observou diferença no tempo médio de tratamento quando categorizamos os casos de esporotricose por forma clínica e imunossupressão.

A ocorrência predominante do *S. brasiliensis* como agente do surto de esporotricose humana em Pernambuco foi verificada, por meio análise genotípica dos isolados baseada no sequenciamento do gene da calmodulina. A ocorrência de epidemia de esporotricose em gatos, a tendência a surtos e a observação de quadros atípicos sugeriam a presença desta espécie na região, mas que só agora foi comprovada neste contexto epidemiológico relevante.

A alta eficácia *in vitro* da terbinafina e do itraconazol contra os isolados humanos de *Sporothrix*, no estado, podem ajudar na escolha da terapia antifúngica em diferentes grupos de risco epidemiológico, com potencial impacto no desfecho clínico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L.C.; OLIVEIRA, M.M.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al. **Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex.** *Biomed Res Int.* Apr, 2015.
- ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, L.C.; FREITAS, D.F.S et al. **Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v.9, n.9, p. e3094, 2014.
- ALVARADO-RAMIREZ, E.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M. **In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods.** *Antimicrob Agents Chemother* , v.51, p.2420-2423, 2007.
- ARAÚJO, A.K.L.; LEAL, C.A.S. **Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso.** *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, .10, n.11, p.816-820, Nov,2016.
- AUNG, A.K.; TEH, B.M.; MCGRATH, C.; THOMPSON, P.J. **Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes.** *Med Mycol*, v.51, p.534–544, 2013.
- BARROS, M.B.; DE ALMEIDA PAES, R.; SCHUBACH, A.O. ***Sporothrix schenckii* and sporotrichosis.** *Clin Microbiol Rev*, v.24, p.633-654, 2011.
- BARROS, M.B.; SCHUBACH, A.O.; SCHUBACH, T.M.; WANKE, B.; LAMBERT-PASSOS, S.R. **An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases.** *Epidemiol Infect*, v.136, p.1192–1196, 2008.
- BARROS, M.B.; SCHUBACH, T.P.; COLL, J.O. et al. **Sporotrichosis: development and challenges of an epidemic.** *Rev Panam Salud Publica.* Jun;v.27, n.6, p.455-60, Jun, 2010.
- BARROS M.B.L.;SCHUBACH A.O.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al.**Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil.** *Int J Dermatol*, v.42, n9,p. 677-81, 2003.
- BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; DE LIMA BARROS, M.; ZEITUNE T. et al. **Validation of serodiagnostic test for sporotrichosis: a follow-up study of patients related of Rio de Janeiro zoonotic outbreak.** *Medical Mycology*, v.53, p.28-33, 2015.
- BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; OROFINO-COSTA, R.; MIGUENS, B.R. et al. **Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of several clinical forms of sporotrichosis,** *Med Mycol*, v. 43, p.487-493, 2005.
- BHUTIA, P.Y.; GURUNG, S.; YEGNESWARAN, P.P. et al. **A case series and review of sporotrichosis in Sikkim.** *J Infect Dev Ctries*, v.5, p.603–608, 2011.

BONIFAZ, A.; ARAIZA, J.; PÉREZ-MEJÍA, A.; OCHOA, L.A.; TORIELLO, C. **Intradermal test with sporotrichin in a community in the Sierra Norte de Puebla.** *Dermatol Rev Mex*, v.57, p.428–432 [in Spanish], 2013.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D. **Sporotrichosis: an update.** *G Ital Dermatol Venereol*, v.145, p.659-673, 2010.

BONIFAZ A.; FIERRO, L.; SAÚL, A. et al. **Cutaneous sporotrichosis. Intermittent treatment (pulses) with itraconazol.** *J Eur Acad Dermatol Vener*, v. 18, p. 302-5, 2008.

BONIFAZ, A.; SAÚL, V.; PAREDES-SOLIS, V. et al. **Sporotrichosis in childhood: clinical and therapeutic experience in 25 patients.** *Pediatric Dermatology*, v.24,, n.4, p. 369-71, 2007.

BORBA-SANTOS, L.P.; RODRIGUES, A.M.; GAGINI, T.B. et al. **Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine.** *Med Mycol*,v.53, p.178-188, 2015.

CABEZAS, C; BUSTAMANTE, B.; HOLGADO, W. et al. **Treatment of cutaneous sporotrichosis with one daily dose of potassium iodide.** *Pediatric Infection Disease Journal*,v.15, n.4, p.352-54, 1996.

CALLENS, S.F.; KITETELE, F.; LUKUN, P. et al. **Pulmonary *Sporothrix schenckii* infection in a HIV positive child.** *J Trop Pediatr*, v.52, p.144–146, 2006.

CAMACHO, E.; LÉON-NAVARRO, I.; RODRÍGUEZ-BRITO, S. et al. **Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*.** *BMC Infect Dis*. v.15, p.94, 2015.

CHAKRABARTI, A.; BONIFAZ, A.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al. **Global epidemiology of sporotrichosis.** *Med Mycol*, v.53, p.3-14, 2015.

CHANG, S.; HERSH, A.M.; NAUGHTON, G. et al. **Disseminated cutaneous sporotrichosis.** *Dermatology Online Journal*, v.19, n.11, 2013.

CHAPMAN, S.W.; PAPPAS, P.; KAUFFMAN, C. et al. **Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous sporotrichosis.** *Mycosis*. v.47, p.62-8, 2004.

CIVILA, E. S.; BONASSE, J.; CONTI-DÍAZ, I. A.; VIGNALE, R. A. **Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis.** *International Journal of Dermatology*, vol. 43, no. 11, pp. 808–810, 2004.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; approved standard-Third Edition.** *CLSI document M27-A3*. Wayne PCaLSI. 2008.

CLSI. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; approved standard-Second Edition.** *CLSI document M38-A2*. Wayne PCaLSI, 2008

COLES, P.B.; SCHUCHAT, A.; HIBBS, J.R. et al. **A multistate outbreak of sporotrichosis associated with *Sphagnum moss***. *Am J Epidemiol*. V.136, p.475-87, 1992.

COSTA, R.O.; BERNARDES-ENGEMANN, A.R.; AZULAY-ABULAFIA et al. **Sporotrichosis in pregnancy: case reports of 5 patients in a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil**. *An Bras Dermatol*, v.86, n5, p.995-8, 2011.

COTE, T.R.; KASTEN, M.J.; ENGLAND, A.C. 3rd. **Sporotrichosis in association with Arbor Day activities**. *N Engl J Med*, v.319, p.1290–1291, 1988.

CRUZ, L.C.H. **Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia**. *Vet. e Zootec*. V.20, p. 08-28, 2013. (Edição Comemorativa)

CRUZ, R.; VIEILLE, P.; OSCHILEWSKI, D. **Aislamiento ambiental de *Sporothrix globosa* en relación a un caso de esporotricosis linfo-cutánea**. *Rev Chilena Infectol*, v.29, n.4, p.401-405, 2012.

DA ROSA, A.C.M.; SCROFERNEKER, L.; VETTORATO et al. **Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil**. *J Acad Am Dermatol*, v.52, n.3, p.451-9, 2005.

DE ARAÚJO, M.L.; RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F. et al. **Human sporotrichosis beyond the epidemic fronte reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil**. *Mycoses*, v.58, n.8, p. 485-90, Aug, 2015.

DE LIMA BARROS, M.B.; SCHUBACH, A.O.; DE OLIVEIRA, R.V.C. et al. **Treatment of Cutaneous Sporotrichosis with itraconazol – study of 645 patients**. *Clin Infect Disease*, v.52, n.12, p.e200-e206, 2011.

DE OLIVEIRA, M.M.; VERÍSSIMO, C.; SABINO, R. et al. **First autochthone case of sporotrichosis by *Sporothrix globosa* in Portugal**. *Diagn Microbiol Infect Dis*, v.78, n.4, p. 388-90, Apr, 2014.

DIAS, N.M.; OLIVEIRA, M.M.; SANTOS, C. et al. **Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal**. *Emerg Infect Dis*, v.17, n.10, p.1975-6, Oct, 2011.

DIAS, N.M.; OLIVEIRA, M.M.; SANTOS, C.; ZANCOPE-OLIVEIRA, R.M.; LIMA, N. **Sporotrichosis Caused by *Sporothrix mexicana*, Portugal**. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, n.10, Oct, 2011.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A. et al. **Isolation and charaterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and enviromental sources associated with largest U.S epidemic of Sporotrichosis**. *Journal of Clin Microbiol*, v.29, n.6, p21106-1113, 1991.

DOHERTY, C.B.; DOHERTY, S.D.; ROSEN T. **Thermotherapy in dermatologic infections**. *J Acad Am Dermatol*, v.62, n.6, p.909-927, 2010.

ELLIOTT, D.E.; WEINSTOCK, J.V. **Helminth-host immunological interactions: prevention and control of immune-mediated diseases.** *Annals Of The New York Academy Of Sciences*, [s.l.], v. 1247, n. 1, p.83-96, jan. 2012. Wiley-Blackwell.

FERNANDES, G.F.; DOS DANTOS, P.O.; RODRIGUES, A.M. et al. **Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species.** *Virulence*, v.4, n.3, p.241±249, 2013.

FERNÁNDEZ, N.; IACHINI, R.; FARIAS L. et al. **Esporotricosis, uma zoonosis em alerta.** In: *Proceedings of the Infocus. Círculo Médico de Córdoba*, 2015, p.1,Nov, 2015.

FERREIRA, C.P.; DO VALLE, A.C.F.; FREITAS, D.F.S et al. **Pregnancy during a sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil.** *Int J Gynaecol Obstet*, v.117, n.2, p. 294-5, Jun, 2012.

FILGUEIRA, K. D. **Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró-RN.** *Ciência Animal Brasileira*, v.10, p. 673-677, 2009.

FINDLAY, G.H.; VISMER, H.F. **Studies in sporotrichosis: fungal morphogenesis and pathogenicity in differing environments.** *Mycopathologia*; v.96, p.115–122, 1986.

FLEURY, R.N.; TABORDA, P.R.; GUPTA,K. et al. **Zoonotic sporotrichosis, Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil.** *Int J Dermatol*, v.40, n.5, p.318-11, 2001.

FRANCESCONI, G.; VALLE, A.C.; PASSOS, S. et al. **Terbinafine (250mg/day): na effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis.** *Eur Acad Dermatol Venereol*, v.23, p.1273-76, 2009.

FREITAS, D.F. et al. **Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis.** *Virulence*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.112-120, 2015. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1014274>.

FREITAS, D.F. et al. **Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis.** *Virulence*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.112-120, fev, 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/21505594.2015.1014274>.

FREITAS, D.F.; DE SIQUEIRA, H.; OAGLAND, B.; DO VALLE, A.C.; FRAGA, B.B.; DE BARROS, M.B. et al. **Sporotrichosis in HIV-infected patients: report of 21 cases of endemic sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil.** *Medical Mycol*, v.50, p.170-178, 2012. [PMID: 21859385]

FREITAS, D.F.; SANTOS, S.S.; ALMEIDA-PAES, R.; DE OLIVEIRA, M.M.; DO VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al. **Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis.** *Virulence*, v.6, n.2, Feb-Mar, p.112±120, 2015. doi: 10.1080/21505594.2015.1014274

GALHARDO, M.C.; DE OLIVEIRA, R.M.; VALLE, A.C. et al. **Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil.** *Med Mycol*, v.46, p.141–151, 2008.

GOMPERTZ, F.; RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F., et al. **Atypical Clinical Presentation of Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa* resistente to Itraconazole.** [*Am J Trop Med Hyg*](#), v.94, n.6, p.1218–22, Jun, 2016.

GORDON, M.A.; LAPA, E.W.; FITTER, M.S.; LINDSAY, M. **Susceptibility of zoopathogenic fungi to phytoalexins.** *Antimicrob Agents Chemother*, v.17, p.120–123, 1980.

GOVENDER, N.P.; MAPHANGA, T.G.; ZULU, T.G. et al. **An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa.** *PLOS Negl Trop Dis*, v.9, n.9, Sep, 2015.

GREMIÃO, I.D.; MENEZES, R.C.; SCHUBACH, T.M. et al. **[Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects.](#)** *Med Mycol*, v.53, n.1, p.15–21, Jan, 2015.

GREMIÃO, I.D.F.; MIRANDA, L.H.M.; REIS, E.G. et al. **Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission.** *PLoS Pathog*, v.13, n.1, 2017

GROTTE, M.; YOUNGER, B. **Sporotrichosis associated with sphagnum moss exposure.** *Arch Pathol Lab Med*, v.105, p.50–51, 1981.

GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A.M. **Developments in fungal taxonomy.** *Clin Microbiol Rev*, v.12, p.454–500, 1999.

GUTIÉRREZ-GALHARDO, M.C.; BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, A.O. et al. **Erythema multiforme associated with sporotrichosis.** *J Eur Acad Dermatol Venereol*, v, 19, n.4, p. 507–509, 2005.

HADDAD, V.J.; MIOT, H.A.; BARTOLI, L.D.; CARDOSO, A.D.E.C.; DE CAMARGO, R.M. **Localized lymphatic sporotrichosis after fish-induced injury. (*Tilapia* sp.).** *Med Mycol*, v.40, p.425–427, 2002.

HAJJEH, R.; MCDONNELL, S.; REEF, S. et al. **Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers.** *J Infect Dis*, v.176, p.499–504, 1997.

HARDMAN, S.; STEPHENSON, I.; JENKINS, D.R.; WISELKA, M.J.; JOHNSON, E.M. **Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS.** *Journal of Infection*, v.51, p. e73–e77, 2005.

HIRSH, B. C.; JOHNSON, W. C. **Pathology of granulomatous diseases. Mixed inflammatory granulomas.** *International Journal of Dermatology*, v. 23, n. 9, pp. 585–597, 1984.

HU, S.; CHUNG, W.H.; HUNG, S.I.; HO, H.C.; WANG, Z.W.; CHEN, C.H. et al. **Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a Nested PCR assay.** *J Clin Microbiol*, v.44, p.1414-8, 2003.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; ANZAWA, K. et al. **Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico.** *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.50, p.19-26, 2009.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; ANZAWA, K.; MOCHIZUKI, T.; CHAKRABARTI, A.; UNGPAKORN, R. et al. **Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* in India, Thailand, Brazil, Colombia, Guatemala and Mexico.** *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.50, p.19-26, 2009.

ISHIZAKI, H.; KAWASAKI, M.; AOKI, M.; WU, S.; LIN, J.; KIM, J.A. et al. **Mitochondrial DNA analysis of *Sporothrix schenckii* from China, Korea and Spain.** *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, v.45, p.23-5, 2004.

KANBE, T.; NATSUME, L.; GOTO, I.; KAWASAKI, M.; MOCHIZUKI, T.; ISHIZAKI, H. et al. **Rapid and specific identification of *Sporothrix schenckii* by PCR targeting the DNA topoisomerase II gene.** *J Dermatol Sci*, v.38,, p.99-106, 2005.

KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; TSUJIMOTO, H.; HASEGAWA, A. **Identification of *Sporothrix schenckii* based on sequences of the chitin synthase 1 gene.** *Mycoses*. v.44, p.261-5, 2001.

KANO, R.; SANO, A.; MAKIMURA, K.; WATANABE, S.; NISHIMURA, K.; YAMAGUCHI, H. et al. **A new genotype of *Arthroderma benhamiae*.** *Med Mycol*. v.46, p.739-44, 2008.

KAUFFMAN, C.A. **Sporotrichosis.** *Clin Infect Dis*, v.29, p.231-7, 1999.

KAUFFMAN, C.A.; BUSTAMANTE, B; CHAPMAN, .SW.; PAPPAS PG. **Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by Infectious Disease Society of America.** *Clin Infect Dis*, v.45, p. 1255-65, 2007.

KENYON, C.; BONORCHIS, K.; CORCORAN C. et al. **A dimorphic fungus causing disseminated infection in South Africa.** *New Engl J Med*, v.369, n.15, p.1416-24, Oct, 2013.

KOHLER, L.M.; MONTEIRO, P.C.F.; HAHN, R.C. et al. **In vitro susceptibilities of isolates of *Sporothrix schenckii* to itraconazol and terbinafine.** *J Clin Microbiol*, v.42, p. 4319-4320, 2004.

LENINE. **Quem leva a vida sou eu.** In.: Lenine. *Carbono*. Rio de Janeiro: Casa 9, Universal Music, 2015. Faixa 8. CD.

LINDSLEY, M.D.; HURST, S.F.; IQBAL, N.J.; MORRISON, C.J. **Rapid identification of dimorphic and yeast-like fungal pathogens using specific DNA probes.** *J Clin Microbiol*, v.39, p.3505- 11, 2001.

LYON, G.M.; ZURITA, S.; CASQUERO, J. et al. **Population-based surveillance and a case-control study of risk factors for endemic lymphocutaneous sporotrichosis in Peru.** *Clin Infect Dis*, v.36, p. 34–39, 2003.

LYRA, M.R.; NASCIMENTO, M.L.F.O.; VARON, A.G. et al. **Immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV and sporotrichosis coinfection:** *Rev Soc Bras Med Trop* v.47, n.6, p.806-809, Nov-Dec, 2014.

MADRID, I.M.; XAVIER, M.O.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; GUIM, T.N.; SANTIN, R. et al. **Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis.** *Microbes Infect*, v.12, p.162-5, 2010.

MAGAND, F.; PERROT, J.L.; CAMBAZARD, F. et al. **Autochthonous cutaneous sporotrichosis in France.** *Ann Dermatol Venereol.*, v.136, n. 3, p.273-5, Mar, 2009.

MAHAJAN, V.K.; SHARMA, N. L; SHARMA, R. C.; GUPTA, M. L.; GARG, G.; KANGA, A. K. **Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India.** *Mycoses*, v. 48, n. 1, pp. 25–31, 2005.

MAHAJAN, V.K. **Sporotrichosis: An Overview and Therapeutic Options.** *Dermatol Res Prac*, 2014.

MAHMOUDI, S.; ZAINI, F.; KORDBACHEH, P. et al. **Sporothrix schenckii complex in Iran: Molecular Identification and antifungal susceptibility.** *Medical Mycology*, v.00, n.0, p.1-7, 2016.

MARIMON, R.; GENE, J.; CANO, J. et al. **Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*.** *J Clin Microbiol*, v.44, p. 3251–3256, 2006..

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. ***Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest.** *J Clin Microbiol*, v.45, p.3198-206, 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. ***Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin.** *Med Mycol.* 2008;46:621-5.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J. et al. **In Vitro Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.52, n.2, p. 732-734, 2008.

MARQUES, G.F.; MARTINS, A.L.G.P., SOUSA, J.M.P.; WACHHLOZ, P.A. et al. **Characterizaion of sporotrichosis cases treated in a dermatoloic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003-2013.** *An Bras Dermatol*, v.90, n2, p.273-5.

MARQUES-MELO, E. H.; LESSA, D. F. S; GARRIDO, L.H.A et al. **Felino doméstico como agente transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas.** *Revista Baiana de Saúde Pública*, v.38, p.490-498, 2014.

MASOKO, P.; MDEE, L.K.; MAMPURU, L.J.; ELOFF, J.N. **Biological activity of two related triterpenes isolated from *Combretum nelsonii* (Combretaceae) leaves.** *Nat Prod Res*, v. 22, p.1074–1084, 2008.

MASOKO, P.; PICARD, J.; HOWARD, R.L.; MAMPURU, L.J.; ELOFF, J.N. **In vivo antifungal effect of *Combretum* and *Terminalia* species extracts on cutaneous wound healing in immunosuppressed rats.** *Pharm Biol*; v. 48, p.621–632, 2010.

MCGUINNIS, M.R.N. et al. **Sporothrix sensu sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B.** *Med Mycol*, v.39, p.369–371, 2001.

MCGUINNESS, S.L.; BOYD, R.; KIDD, S. et al. **Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia.** *BMC Infect Dis*, v16, n.16, 2016.

MESA-ARANGO, A.C.; REYES-MONTES, M.R.; PEREZ-MEJIA, A.; NAVARRO-BARRANCO, H.; SOUZA, V.; ZUNIGA, G. et al. **Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according of Geographic Origin and Clinical Form of Sporotrichosis.** *J Clin Microbiol*, v.40, n.8, p.3004–3011, Aug, 2002. doi: [10.1128/JCM.40.8.3004-3011.2002](https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.3004-3011.2002).

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, AM.M.; GALVÃO DIAS, M.A. et al. **Feline Sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: na emerging animal infection in São Paulo, Brazil.** *BMC Vet Res*, v.10, p.269, 2014.

MOREIRA, J. A. S.; FREITAS, D. F. S.; LAMAS, C. C. **The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review.** *Infection*, vol. 43, no. 3, pp. 267–276, 2015.

MOREIRA, J.A.S.; FREITAS, D.A.F.S.; LAMAS, C.C. et al. **The impact of sporotrichosis in HIV-infected patients: a systematic review.** *Infection*, v.43, p.267–276, 2015.

MORRIS-JONES, R. **Sporotrichosis.** *Clinical and Experimental Dermatology*, v.27, n.6, p.427–33, 2002.

MOUSSA, T.A.; KADASA, N.M.; AL ZAHRANI, H.S. et al. **Origin and distribution of *Sporotrix globosa* causing sapronoses in Asia.** *J Med Microbiol*, v.23, Mar, 2017.

NEYRA, E.; FONTEYNE, P.A.; SWINNE, D. et al. **Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism.** *J Clin Microbiol*, v.43, p.1348–1352, 2005.

NORIEGA, C.T.; GARAY, R.R.; SABANERO, G.; BASURTO, R.T.; SABANERO-LOPEZ, M. ***Sporothrix schenckii*: cultures in different soils.** *Rev Latinoam Micol*, v. 35, p.191–194 [in Spanish], 1993.

NUNES, G. D. L.; SANTOS, R. C.; FILGUEIRA, K. D et al. **Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso.** *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, v.14, p.157–161, 2013.

OJEDA, T.; RODRÍGUEZ-PICHARDO, A.; SUAREZ, A.I. et al. **Sporotrichosis in Seville (Spain).** *Enferm Infecc Microbiol Clin*, v.29, n.3m p.233-4, Mar, 2011.

OLIVEIRA, D.C.; LOPES, P.G.; SPADER T.B. et al. **Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil.** *J Clin Microbiol*, v.49, p. 3047–3049, 2011.

OLIVEIRA, M.M.; PAES, R.A.; MUNIZ, M.M.; GALHARDO, M.C.G.; OLIVEIRA, R.M.Z. **Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil.** *Mycopathologia*, v.172, p.257-67, 2011.

OROFINO-COSTA, R.; BÓIA, M.N.; MAGALHÃES, G.A. et al. **Arthritis as a hypersensitivity reaction in a case of sporotrichosis transmitted by a sick cat: clinical and serological follow-up of 13 months.** *Mycoses*, v.53, p.81-83, 2010.

OTTONELLI STOPIGLIA, C.D.; MAGAGNIN, C.M.; CASTRILLON, M.R. et al. **Antifungal susceptibilities and identification of species of *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil.** *Med Mycol*, v.52, p.64, 2014.

PAIXÃO, A.G.; GALHARDO, M.C.G.; ALMEIDA-PAES, R. et al. **The difficult management of disseminated *Sporothrix brasiliensis* in a patient with advanced AIDS.** *AIDS Research and Therapy*, v.12, n.16, 2015.

PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E. et al. **Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity.** *Clin Infect Dis*, v.30, p. 65–70, 2000.

PATEL, A.; MUDENDA, V.; LAHKI, S. et al. **A 27-year-old severely immunosuppressed female with misleading clinical features of disseminated cutaneous sporotrichosis.** *Case Rep Dermatol Med*. v. 2016, 2016. doi: 10.1155/2016/9403690

PERNAMBUCO. Portaria SES/PE Nº. 279 de 23 de julho de 2015. **Acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências.** Recife, Pernambuco, 2015.

RAMOS-E-SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CAREIRO, S. et al. **Sporotrichosis.** *Clin Dermatol*, v.25, p.181-7, 2007.

RATHI, S. K.; RAMAM, M.; RAJENDRAN, C. **Localized cutaneous sporotrichosis lasting for 10 years .** *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, v.69, p. 239-40, [serial online],2003.

REED, K.D.; MOORE, F.M.; GEIGER, G.E. et al. **Zoonotic Transmission of sporotrichosis: case report and review.** *Clin Infect Dis*, v.16, n.3, p.384-87, 1993.

REIS, R.S.; ALMEIDA-PAES R.; MUNIZ, M.D.M. et al. **Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Riode Janeiro, Brazil.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.104, n.5, p. 769-74, 2009.

RIO DE JANEIRO, **Vigilância e Cenário epidemiológico: Esporotricose no estado do RJ**. *Boletim epidemiológico Esporotricose* 007/2016 /GDTVZ/CVE/SVEA/ SVS/SES/RJ, Gerência de Doenças Transmitidas por Vetores e Zoonoses – GDTVZ. Estado do Rio de Janeiro, Outubro, 2016.

RODRIGUES, M.T.; DE RESENDE, M.A. **Epidemiologic skin test suvey of sensitivity to paracoccidioidin, histoplasmin and sporotrichin amog gold mine workers of Morro Velho Mining, Brazil**. *Mycopathologia*, V.135, n.2, p.89-98, 1996.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, S.; DE CAMARGO, Z.P. **Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex**. *Med Mycol*, v.51, p.405-12, 2013a.

RODRIGUES, A.M.; DE MELO TEIXEIRA, M.; DE HOOG, G.S. et al. **Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks**. *PLoS Negl Trop Dis*, v.7, p. e2281, 2013b

RODRIGUES, A.M.; BAGAGLI, E.; DE CAMARGO, Z.P. ET AL. ***Sporothrix schenckii sensu stricto* isolated from soil in an armadillo's burrow**. *Mycopathologia*, v.177, p.199–206, 2014 a.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; ZHANG, Y. et al. **Emerging sporotrichosis is driven clonal and recombinant *Sporothrix* species**. *Emerg Microbes Infect*, v.3 e32, 2014b.

RODRIGUES, A.M.; HOOG, G.S.; PIRES, D.C. et al. **Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agentes of sporotrichosis**. *BMC Infect Dis*, v.14, n.19, 2014.c

RODRIGUES, A.M.; FERNANDES, G.F.; ARAUJO, L.M. et al. **[Proteomics-Based Characterization of the Humoral Immune Response in Sporotrichosis: Toward Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens](#)**. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Aug 25;9(8):e0004016, 2015a.

RODRIGUES, A.M.; KUBITSCHKE-BARREIRA, P.H., FERNANDES, G.F.; DE ALMEIDA, S.R.; LOPES-BEZERRA, L.M.; DE CAMARGO, Z.P. **Immunoproteomic analysis reveals a convergent humoral response signature in the *Sporothrix schenckii* complex**. *J Proteomics*, v.115, p.8±22, Feb, 2015.c doi: 10.1016/j.jprot.2014.11.013 PMID:25434489

ROETS, F.; WINGFIELD, B.D.; DE BEER, Z.W.; WINGFIELD, M.J.; DREYER, L.L. **Two new *Ophiostoma* species from *Protea caffra* in Zambia**. *Persoonia*; v.24, p.18–28, 2010.

RUDRAMURTHY, S.M.; CHAKRABARTI, A. **Sporotrichosis: Update on Diagnostic Techniques**. *Curr Fungal Infect Rep*. Jun, 2017.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.; WANKE, B. **Epidemic sporotrichosis**. *Curr Opin Infect Dis*, v.21, p.129–133, 2008.

SCHUBACH, A.; SCHUBACH, T.M.; BARROS, M.B.; WANKE, B. **Cat transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil.** *Emerg Infect Dis*, v.11, p.1952–1954, 2005.

SCHUBACH, T.M.; DE OLIVEIRA, S.A. DOS REIS, R.S. et al. **Sporothrix schenckii isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brasil.** *Mycopathologia*, v.153, n.2, p.83-6, 2002.

SCHUBACH, T.M.; VALLE, A.C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M.C. et al. **Isolation of Sporothrix schenckii from the nails of domestic cats (Felis catus).** *Med Mycol*, v.39, n.1, p.147-9, Feb, 2001.

SHARMA, N.L.; SHARMA, R.C., GUPTA N. **Sporotrichosis: study of 22 cases from himachal Pradesh.** *Indian F Derm Venereol Leprol*, v.56, n.4, p 296-98, 1990.

SHARMA, N.L.; MEHTA, K.I.S.; MAHAJAN, V.K. et al. **Cutaneous sporotrichosis of face: polymorphism and reactivation after intralesional triamcinolone.** *Indian J Dermatol Venereol Lepr*, v.76, n.3, p. 276-80, 2010.

SHARON, V.R.; KIM, J.; SUDHAKAR, S.; FUNG, M.A.; MANIAR, A. **Disseminated cutaneous sporotrichosis.** *Lancet Infect Dis*, v.13, p.95, 2013. [PMID: 23257234]

SILVA, M.B.T.; COSTA, M.M.M; TORRES, C.C.S et al. **Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil.** *Cad Saúde Pública*, v.28, n.10, p 1867-80, Out, 2012.

SILVEIRA, C.P.; TORRES-RODRIGUEZ, J.M.; ALVARADO-RAMIREZ, E. et al. **MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazol, posaconazole and terbinafine in Sporothrix schenckii.** *J Med Microbiol* , v.59, Pt 12, p.1601-1610, 2009.

SMEGO, R.A JR.; CASTIGLIA, M.; ASPERILLA, M.O.; **Lymphocutaneous syndrome: a review of non-sporothrix causes.** *Medicine (Baltimore)*. v.78, p.38-63.

SONG, Y.; LI, S.S.; ZHONG, S.X. et al. **Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region.** *J Eur Acad Dermatol Venereol* v.27, p.313-18, 2013.

SONG, Y.; LI, S.S.; ZHONG, S.X.; LIU, Y.Y.; YAO, L.; HUO, S.S. **Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region.** *J Eur Acad of Dermatol and Venereol*, v.27, p.313-318, 2013. [PMID: 22176524]

SONG, Y.; YAO, L.; ZHONG, S.X. et al. **Infant sporotrichosis in northeast China: a report of 15 cases.** *Int J Dermatol*, v.50, p.522–529, 2011.

STOPIGLIA, C.D.O.; MAGAGNIN, C.M.; CASTRILLÓN, M.R. et al. **Antifungal susceptibility and identification of species of the Sporothrix schenckii complex isolated in Brazil.** *Medical Micology*, v.52, p.56-64, 2014.

TAKEDA, Y.; KAWASAKI, M.; ISHIZAKI, H. **Phylogeny and molecular epidemiology of Sporothrix schenckii in Japan.** *Mycopathologia*, v.116, p.9-14, 1991.

TEIXEIRA, P.A.; DE CASTRO, R.A.; FERREIRA, F.R.; CUNHA, M.M.; TORRES, A.P.; PENHA, C.V. et al. **LDOPA accessibility in culture medium increases melanin expression and virulence of *Sporothrix schenckii* yeast cells.** *Med Mycol*, v.48, p.687-95, 2010.

TSUJI, G.; TAKEI, K.; TAKAHARA, M. et al. **Simultaneous onset of sporotrichosis in mother and daughter.** *J Dermatol*, v.44, n. 9, p. 1068-1069, Sep, 2017.

URABE, H.; HONBO, S. **Sporothricosis.** *Int J Dermatol*, v.25, n.4, p.255-257, 1986.

VISMER, H.F.; EICKER, A. **Growth of human pathogenic isolates of *Sporothrix schenckii* on indigenous and exotic wood species in South Africa.** *Mycol Res*, v.98, p. 121-124, 1994.

VISMER, H.F.; HULL, P.R. **Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa.** *Mycopathologia*, v.137, p.137-143, 1997.

WATANABE, M.; HAYAMA, K.; FUJITA, H. et al. **A Case of Sporotrichosis Caused by *Sporothrix globosa* in Japan.** *Ann Dermatol*, v.28, n.2, p.251-2, Apr, 2016.

YELVERTON, C.B.; STETSON, C.L.; BNAG, R.H.; CLARK, J.W., BUTLER, D.F. **Fatal sporotrichosis.** *Cutis*, v.78, n. 4, p.253-6., Oct, 2006.

ZHANG, Z., LIU, X. L.V.X; LIN, J. **Variation in genotype and higher virulence of a strain of *Sporothrix schenckii* causing disseminated cutaneous sporotrichosis.** *Mycopathologia*, v. 172, p.439-46, 2011.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B. et al. **Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spannig more than 14000 human and animal case reports.** *Persoonia*, v.35, p. 1-20, Dec, 2015.

ZIPFEL, R.D.; DE BEER, Z.W.; JACOBS, K.; WINGFIELD, B.D.; WINGFIELD, M.J. **Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*.** *Stud Mycol*, v.55, p.75-97, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos você a participar como voluntário da pesquisa “ ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA, IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO SPOROTHRIX E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora **CLÁUDIA ELISE FERRAZ SILVA** (Médica Dermatologista do Hospital das Clínicas da UFPE, Clínica Dermatológica - Hospital das Clínicas –Térreo do Hospital. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária. Recife-PE, CEP: 50670-901 celular (81) 991031512, e-mail: claudiaelise@yahoo.com.br), sob orientação da Professora Dra. Vera Magalhães da Silveira, telefone (81) 999737421 e coordenação do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, telefone (81) 99147-9644.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa tem como objetivo estudar os casos de esporotricose (micose que afeta a pele e a gordura da pele) que ocorrem em Pernambuco, avaliando suas formas de manifestação na pele, situações que aumentam o risco para o adoecimento, determinando as espécies de fungo envolvidas e as medicações que combatem esta doença.

Ao participar da pesquisa, você seguirá as seguintes etapas: 1) Responderá de questionário com dados pessoais, comportamentais e clínicos; 2) Será examinado (a) pela dermatologista pesquisadora; 3) Terá suas feridas de pele fotografadas, mantendo sigilo quanto à sua identificação; 4) Irá coletar material da ferida cutânea, através de biópsia da pele e coleta da secreção, usando anestesia local, materiais estéreis e pequeno curativo. Estes materiais serão enviados para laboratório de patologia e para o laboratório de micologia médica. Esta etapa é necessária para confirmar o diagnóstico e orientar tratamento adequado para sua doença.

Quanto aos riscos e desconfortos, você poderá se sentir constrangido(a) em prestar informações quanto à sua doença e em ser fotografado. Como forma de reduzir o possível constrangimento, este atendimento será realizado de forma individual e em ambiente reservado. Os seus dados pessoais e de identificação serão conhecidos apenas pela equipe de estudo e guardados em sigilo. As feridas de pele de esporotricose serão fotografadas de forma que não possibilitem a sua identificação. Estas imagens serão arquivadas em computador pessoal, sob responsabilidade da pesquisadora. Caso você venha a sentir algo fora desses padrões, comunique ao pesquisador para que sejam tomadas as devidas providências.

A realização da biópsia de pele é necessária para o diagnóstico desta doença, mesmo em condições de consulta habitual, não inseridas em pesquisa. A biópsia para a realização do estudo histológico e cultura micológica será feita em lesões ativas de esporotricose. A técnica de biópsia pode provocar dor transitória no momento da anestesia e pode deixar uma cicatriz, geralmente discreta, na área acometida.

Dentre os benefícios diretos da pesquisa estão o acesso à investigação diagnóstica das lesões cutâneas suspeitas de esporotricose, contribuindo para a confirmação da doença envolvida e tratamento específico de cada paciente. Todos os pacientes serão acompanhados no ambulatório até a conclusão do tratamento de suas doenças dermatológicas, incluindo aqueles que não confirmarem o diagnóstico de esporotricose. Quanto aos benefícios indiretos, salientamos que os resultados desta pesquisa fornecerão informações valiosas sobre o padrão epidemiológico local da doença, sobre os tipos de fungo envolvidos e suas manifestações clínicas. Esses dados poderão contribuir para ações adequadas de prevenção e tratamento da esporotricose no Estado de Pernambuco.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos participantes, a não ser entre os

responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço acima informado, pelo período mínimo de cinco anos.

Após leitura e informações, caso aceite fazer parte do estudo, rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma. Garantimos que você tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade. Ressaltamos que a possível recusa em participar deste estudo, no início ou em qualquer momento da realização do mesmo, não trará nenhum prejuízo ou interferência em seu atendimento e tratamento no setor de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos na UFPE, no endereço: Av. da Engenharia, S/N, 1º andar, sala 4, Cidade Universitária, Recife/PE, CEP 50740-600, telefone (81)2126-8588, e-mail: cepccs@ufpe.br

Cláudia Elise Ferraz Silva

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, fui informado (a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como será minha participação, dos procedimentos, riscos e benefícios decorrentes desta pesquisa “ESPOROTRICOSE HUMANA EM PERNAMBUCO: CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA, IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DO COMPLEXO SPOROTHRIX E SUSCEPTIBILIDADE ANTIFÚNGICA”, declaro meu consentimento em participar da pesquisa, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecidas as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo como voluntário(a).

Recife, ____ de _____ de _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar.

Nome:

Nome:

APÊNDICE B - FICHA DE COLETA DE DADOS

PROJETO “ ESPOROTRICOSE” – DERMATOLOGIA – HC -UFPE

DATA: ____/____/____ FICHA N.º ____

NOME: _____

N.º DO PRONTUÁRIO: _____ IDADE: ____ SEXO: ____ DATA DE NASCIM ____/____/____

SERVIÇO DE PROCEDÊNCIA: _____

NATURALIDADE: _____ CIDADE: _____ ESTADO: _____

ENDEREÇO: _____

FONES: _____

PROFISSÃO: _____ ESTADO CIVIL: _____ FOTOTIPO: _____

FICHA DE COLETA DE DADOS

FOTOS () SIM () NÃO

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

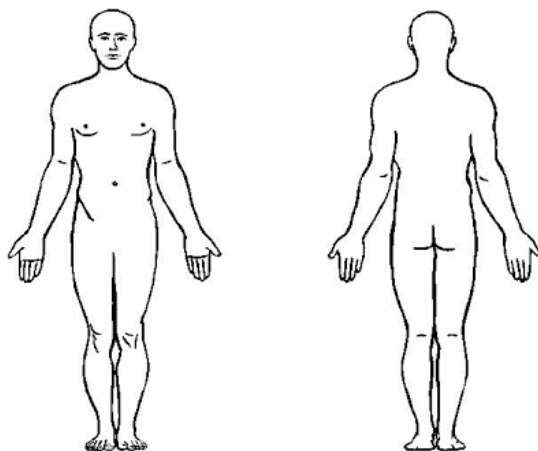
- 1) IDADE: _____ ANOS
- 2) DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____
- 3) SEXO MASC () FEM ()
- 4) FOTOTIPO _____ (I A VI)
- 5) ESCOLARIDADE _____
- 6) PROCEDÊNCIA _____ - _____ (NOME DA CIDADE – ESTADO)
() ÁREA RURAL () ÁREA URBANA
- 7) OCUPAÇÃO
() TRABALHADOR RURAL () EMPREGADA DOMÉSTICA
() VETERINÁRIO () _____
- 8) POSSUI GATOS NA RESIDÊNCIA () SIM () NÃO
- 9) TEVE CONTATO COM GATOS DOENTES (COM FERIDAS) () SIM () NÃO
- 10) ATIVIDADES COM JARDIM OU TERRA NA RESIDÊNCIA, TRABALHO OU LAZER
() SIM () NÃO
Descrever _____

DADOS CLÍNICOS

- 1) TEMPO DE LESÃO CUTÂNEA (ATÉ O DIAGNÓSTICO) _____ SEMANAS
Data de início dos sintomas: ____/____/____
- 2) FORMA CLÍNICA () Fixa () Linfocutânea () Cutânea Disseminada () Disseminada
- 3) SÍTIO DA LESÃO PRIMÁRIA
() Face () Pescoço () MMSS () Abdome () MMII

Especificar _____

4) TOPOGRAFIA DAS LESÕES CUTÂNEAS

5) HÁ PADRÃO DE DISSEMINAÇÃO ESPOROTRÍCIDO
() SIM () NÃO

6) SÍTIOS EXTRACUTÂNEOS

- a. SIM
- b. NÃO
- c. QUAIS

7) MANIFESTAÇÕES DE HIPERSENSIBILIDADE

- a. Eritema nodoso
- b. Eritema multiforme

8) SINTOMAS SISTÊMICOS

- a. SIM b. NÃO

9) DOENÇAS ASSOCIADAS

- a. HIV
- b. HEPATITE B
- c. HEPATITE C
- d. ETILISMO
- e. OUTRA CONDIÇÃO IMUNOSSUPRESSORA _____

10) COMORBIDADES

11) MEDICAÇÕES GERAIS EM USO

DADOS QUANTO AO TRATAMENTO

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

Data de início da medicação:

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

DATA: __/__/__

EXAMES COMPLEMENTARES

DATA	DESCRIÇÃO
	EXAME DIRETO Exsudato Fragmento
	CULTURA MICOLÓGICA Exsudato Fragmento
	HISTOPATOLÓGICO
	SÉRICOS

APÊNDICE C – VERSÃO DO ARTIGO 1 EM INGLÊS

Proposta de submissão para o periódico: **Mycoses**

ORIGINAL ARTICLE

Surto de esporotricose humana em Pernambuco, Nordeste do Brasil: epidemiologia, manifestações clínicas e resposta terapêutica

Short title: Surto de esporotricose em Pernambuco, Nordeste do Brasil

Authors: Cláudia Elise Ferraz^{1,2}, Carlos Alberto Tiburcio Valeriano³, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto⁴, Vera Magalhães⁴

Affiliation:

¹ Tropical Medicine Post- Graduation Program, Federal University of Pernambuco (UFPE).

² Department of Department, Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco (UFPE)

³ Department of Mycology, Center of Bioscience, Federal University of Pernambuco (UFPE).

⁴ Department of Tropical Medicine, Center of Health Science, Federal University of Pernambuco (UFPE).

Corresponding author:

CLÁUDIA ELISE FERRAZ, Rua Barão de Itamaracá, n.º 355, apto 1701, Espinheiro, Recife – PE. CEP: 52020-070. Phone: 55-81-991031512, e-mail: claudiaelise@yahoo.com.br.

Keywords: Sporotrichosis, *Sporothrix*, outbreak, epidemiology, Brasil

SUMMARY

Background: Sporotrichosis is an infectious granulomatous disease caused by fungi of the Sporothrix Complex, with notable endemicity in Latin America, mainly in southeastern Brazil and considered to be emerging in other regions of the country. **Objectives:** To evaluate the cases of human sporotrichosis in Pernambuco, Northeastern Brazil, from an epidemiological, clinical and therapeutic aspects. **Patients/Methods:** Cross - sectional study nested to the prospective cohort, with 98 patients diagnosed with sporotrichosis from March 2017 to March 2018, treated at a university hospital in Pernambuco, Northeastern Brazil. **Results:** We found a higher prevalence of female sex (73.5%), mean age 47.7 years. History of scratches or bites of diseased cats were present in 81.6% of the cases. There was a predominance of lymphocutaneous form (67.3%) and a high frequency (25.5%) of hypersensitivity manifestations (erythema nodosum, erythema multiforme and Sweet's syndrome). These reactions were associated with a shorter treatment time until healing. Itraconazole 100mg / day was the treatment adopted in 92.9% patients; of these, 20.8% required higher doses for healing. **Conclusions:** The identification of the zoonotic nature of sporotrichosis in several Brazilian states, alerts to the need for public policies to contain the epidemic in cats and humans. We highlight the high frequency of hypersensitivity reactions and the efficacy of treatment with itraconazole.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subacute or chronic granulomatous infectious disease caused by thermodynamorphic fungi of the *Sporothrix* Complex^{1,2}. It has a notable endemicity in Latin America, mainly in southeastern Brazil. The disease is closely linked to different forms of human activities, habitats, lifestyles and presents both environmental and zoonotic interaction³. In the last two decades, changes in the epidemiology, distribution and taxonomy of sporotrichosis have been observed^{4,5} and are currently considered an emerging disease in several regions of Brazil, mainly in the form of zoonotic epidemics and outbreaks⁶.

Although classical infection is associated with traumatic inoculation of the soil, plants or materials contaminated by the fungus, there are geographical areas where transmission from infected cats predominates, as observed in Rio de Janeiro, considered hyperendemic for sporotrichosis, with more than 5,000 human cases diagnosed since 1998. Cases of feline sporotrichosis and zoonotic transmission have also been reported in other states, especially in Rio Grande do Sul and São Paulo^{6,7}. The etiological agent responsible for these outbreaks is *Sporothrix brasiliensis*, a highly pathogenic clonal branch of the classical *S. schenckii sensu stricto* (Str.) Species^{3,7}.

The morphological heterogeneity of lesions often makes the diagnosis difficult, particularly in non-endemic regions, leading to a delay in the diagnostic definition and a protracted clinical course with an impact on public health⁸. Disseminated or atypical clinical forms with manifestations of hypersensitivity have been described in some regions and appear to be associated with some isolates of *Sporothrix*⁹⁻¹¹. Although associated with low lethality, it causes considerable morbidity and requires specific treatment for its resolution¹². Potassium iodide has been the standard treatment for many years, but itraconazole, terbinafine and amphotericin B have recently been used with high efficacy^{3,13-18}.

In the Northeast of Brazil, sporadic cases of sporotrichosis have been reported, mostly, in an occupational way affecting individuals from rural areas. In the last four years, there was an increase in the detection of cases of feline sporotrichosis, which coincided with the perception of a greater number of human cases of sporotrichosis in the health services. Considering this scenario, with indications of a change in the epidemiological profile and the lack of data on the disease in the region, this study aimed to evaluate the cases of human sporotrichosis in Pernambuco, being the first state in the Northeast of Brazil to characterize its cases epidemiological, clinical and therapeutic point of view.

MATERIALS AND METHODS

Local and Study design

A cross-sectional study nested with the prospective cohort, performed at the specialized outpatient clinic of the Dermatological Clinic of the Public University Hospital in the city of Recife (capital of Pernambuco, Northeastern Brazil), from March 2017 to March 2018. The Dermatology sector serves patients from throughout the state, with a flow of care of 900 patients per month. The state of Pernambuco has an estimated population of 9,473,266 inhabitants in 2017, of which 80.2% live in urban areas. 19 The region has a humid tropical climate on the coast and is predominantly semi-arid in the interior.

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, Brazil (CAAE: 71105617.7.0000.5208).

Patients and follow up

All patients over 18 years of age with suspected sporotrichosis and referred to the outpatient clinic were included in the study and examined for clinical characterization of sporotrichosis lesions, photographed and submitted to direct exudate exams, in addition to two 4mm punch biopsies, one sent for histopathological processing and another, for direct examination and mycological culture. In addition, they answered a questionnaire with personal data and demographic, epidemiological and clinical information. A sporotrichosis patient was considered to have clinical lesion (s) of nodules, ulcers or plaques on the skin with at least one of the following complementary tests: a. histopathological examination with mixed suppurative granulomatous inflammation with or without visible yeast structures, suggestive of fungal infection; B. direct mycological examination with evidence of hyaline, globose or elliptic leveduriform cells; w. mycological culture with development of *Sporothrix* sp.; and / or clinical cure with antifungal treatment²⁰. Pregnant and lactating women were excluded.

After confirming the diagnosis of sporotrichosis, in the absence of disseminated disease, patients started standard treatment with itraconazole 100mg/day and were followed biweekly, to observe clinical response, possible side effects, and to define the time to stop the medication after cure. When, after 4 to 8 weeks, the skin lesions were aggravated or remained unchanged, the dose of itraconazole was doubled to 200mg / day. When even after 8 weeks of modification of the dosage no improvement of the lesions was observed, the medication was replaced. The definition of the treatment dose with itraconazole and the follow-up form was based on a cohort protocol of patients with sporotrichosis of the Evandro Chagas Clinical

Research Institute (IPEC) 3. In the impossibility of patients to use imidazole, they were considered for treatment with potassium iodide 3g / day or terbinafine 250mg / day. The antifungal medication was discontinued after 4 weeks of clinical cure. Patients with fully healed lesion (s), complete reepithelialization and absence of crusts, infiltrated areas or erythema were considered clinically cured. In the case of extra-cutaneous lesions, the pre-existing lesions had to be completely involuted.

Statistical analysis

Data were analyzed descriptively through absolute and percentage frequencies for the categorical variables and the measures: mean, standard deviation, median and percentiles for the numerical variables. To evaluate the association between two categorical variables, Pearson's Chi-square test or the Fisher's exact test were used in situations where the condition for use of the Chi-square test was not verified. In the comparison of the categories of independent variables, the Mann-Whitney test in the case of two categories and the Kruskal-Wallis test in the case of more than one category were used. The margin of error used in the statistical test decision was 5% and the intervals were obtained with 95% confidence. The data was entered in the EXCEL worksheet and the program used to obtain the statistical calculations was the SPSS IMB in version 23.

RESULTS

During the study period, 131 patients with clinical suspicion of sporotrichosis were treated at the referral clinic. We obtained diagnostic confirmation in 111 patients, of whom 98 were included in the study. The analysis of sex distribution showed a high occurrence in females (73.5%) when compared to males (26.5%). The patients' ages ranged from 19 to 91 years, with an average of 47.7 years (SD 16.7) and a median of 48 years. Most of the cases (91.8%) came from the Metropolitan Region of Recife, urban area of the state of Pernambuco. There was no absolute predilection for a particular occupation; individuals who performed predominant activities at home, from retirees, housewives and domestic employees accounted for 38.7% of the cases (38/98). History of contact with cats at home was present in 77.6% (76/98) of the cases, while 81.6% (81/98) reported contact with cats with skin wounds, through scratches or bites. Only 27.6% (21/98) of the patients reported some activity with soil or plant manipulation or plants, most of them occasional and leisurely (Table 1).

The duration of symptoms before medical treatment ranged from 5 to 280 days, with an average of 41.8 days (SD = 42.43 days) and a median of 30 days. The predominant clinical

form was lymphocutaneous affecting 66 (67.3%) patients, followed by fixed cutaneous in 27 (27.6%) (Figure 1). Five cases presented the disseminated cutaneous form and no patient presented visceral involvement (Figure 2). Lesions were more commonly found in the upper limbs in 79 (80.6%) cases (Table 2). Multiple anatomic sites were affected by different inoculation foci in the same patient in 15 cases (15.3%).

Nonspecific systemic symptoms such as fever, arthralgia and headache were reported by 37.8% of the patients, being present in all cases that presented manifestations of hypersensitivity. A high frequency (25.5%, n=25) of manifestations of hypersensitivity was observed, with 13 cases of erythema nodosum, eight cases of erythema multiforme and one of Sweet syndrome (Figure 3). Three patients presented concomitantly more than one reactivity pattern. Underlying immunosuppressive conditions such as HIV / AIDS (1), use of immunosuppressive medications (5), chemotherapy (1), and alcoholism (2) were present in 9 patients.

Regarding the treatment, 91 (92.9%) patients were treated with itraconazole 100mg / day; of these, nineteen (20.8%) required higher doses for clinical cure. For reasons of drug interaction, six received other antifungal treatments with potassium iodide (n = 3), terbinafine (n = 3). Only one case of disseminated sporotrichosis required amphotericin B deoxycholate intravenously and maintenance with imidazole after initial infection control. Seven patients lost follow-up before discharge because of cure. The mean treatment time was 18 weeks (SD = 8.53), ranging from 0 to 65.14 weeks, with a median of 17.29 weeks. About 16.3% (16/98) patients had some side effect with itraconazole, such as headache, abdominal pain, and hypertriglyceridemia, but it was not necessary to discontinue the medication in any case. Patients who presented symptoms of hypersensitivity who came to the clinic very symptomatically used, in addition to the antifungal, prednisone 0.5mg / kg / day for 7-14 days and oriented to rest, with resolution of the condition.

There was no difference in mean treatment time when we categorized the cases by clinical form and immunosuppression; the presence of hypersensitivity manifestations was associated with a shorter treatment time until cure ($p = 0.046$) (Table 4).

DISCUSSION

The Northeastern region of Brazil had not yet documented a large number of patients with human sporotrichosis, such as the one observed in 2017 and 2018. The perception of increased cases of the disease in several health services motivated the creation of the referral clinic in the Hospital university education. Although there were no published data in relation to previous years, a one-year increase in the number of cases of sporotrichosis was observed, according to the institution's internal records. Other states in the Northeast of Brazil, such as Rio Grande do Norte²¹, Paraíba²² and Alagoas²³ have already reported cases of sporotrichosis in animals, with rare cases of zoonotic transmission. In Brazil, human and animal cases of the disease were also published in Amazonas and Pará, however, most cases come from the South and Southeast¹³.

Although animals are not the main source of infection for humans in most places in the world, zoonotic transmission has been reported from biting and scratching cats, insect bites, fish handling, dog bites, rats, birds, reptiles and horses²⁴⁻²⁷. Undoubtedly, cats have been the great vehicle for the dissemination of cases of human sporotrichosis that began in the region of Rio de Janeiro,^{25,28-30} with gradual expansion to other regions of Brazil^{2,31,32}. The states of Rio Grande do Sul and São Paulo reported outbreaks of sporotrichosis in a small group of cats and humans, but with effective local epidemiological control^{6,7,33}. The state of Pernambuco is located 2300 km north of Rio de Janeiro, where the zoonosis transmitted by cats caused by *Sporothrix brasiliensis* began. With the present study, it was demonstrated the high frequency of transmission from the contact with cats, denoting the zoonotic character of the infection in the region. Although our study was conducted as a referral service for the treatment of sporotrichosis in our state, we believe that the number of cases may be underestimated, since some patients are seen in other health institutions, they may be treated empirically and even self-medicated, especially when there is a well defined context of contact with felines with sporotrichosis.

About 77.6% of the cases documented in the present study reported having cats in the home and 80.6% reported having suffered minor trauma with sick cats. Cat-human transmission is mainly associated with scratches and / or bites of infected animals with high fungal load, however, *Sporothrix* has already been isolated in nails, oral and nasal cavities of apparently healthy felines³⁴⁻³⁶. In many instances, the mode of transmission is not identified³⁷. About 10-62% of the patients do not report any history of trauma, since it is usually discrete or of small significance and occurs a few weeks before the onset of the disease and may be forgotten⁸. In

addition, inter-human transmission is not described³⁸.

We found a greater involvement of the female sex (73.5%) and a mean age of 47.7 years, reflecting the same urban epidemiological profile of the epidemic started in Rio de Janeiro. In this state, there is a predominance of women over 40 years of age, of low socioeconomic status and who participate in domestic activities and the care of sick animals at home^{39,40}. In rural areas of southeastern and southern Brazil and in several regions of the world, there is a higher prevalence in men over 50 years who work in agricultural activities, revealing an occupational character of the disease^{20,37,41}. It appears that the risk of contracting the infection is mainly determined by the likelihood of contact with *Sporothrix*, regardless of age, race or sex, but is particularly related to daily household, leisure or work activities^{4,42,43}.

The clinical presentation of sporotrichosis is highly polymorphic. According to several records in the literature, we also found the predominance of lymphocutaneous sporotrichosis (67.3%). Publications from Mexico, Peru, Africa, India, Uruguay and Guatemala, Venezuela, Italy, and in Santa Maria, southern Brazil, documented the lymphobutal form as responsible for more than 70% of the cases^{37,44,45}. On the other hand, reports from Japan, Costa Rica and other regions of Brazil did not observe differences in the number of patients between the fixed and lymphocutaneous form^{20,46,47}. Various factors such as mode and depth of inoculation, host immunity and virulence of the species may influence the different forms of presentation.^{8,38,48} It is suggested that patients with certain immunity against the fungus develop fixed or localized disease, while the lymphatic disease affects those who did not have previous contact with the pathogen^{20,49-51}. Of the patients who evolved with disseminated forms of sporotrichosis, four had no known immunosuppressive condition and only one was an alcoholic. Disseminated forms are rare worldwide, being more associated with states of immunosuppression such as the presence of HIV / AIDS, chemotherapy, immunosuppressive drug use, alcoholism and diabetes^{13,15,20}.

The time interval between onset of lesions and the diagnosis was 41.8 days, similar to that described in other studies^{41,52}. The literature describes a great variability in the duration of symptoms until diagnosis. In a study from RS, the mean time between the onset of the lesions and the diagnosis was 150 days (5 months).²⁰ We verified that patients who presented hypersensitivity manifestations had a shorter disease time; we believe that the appearance of reactive lesions on the skin, accompanied by systemic symptoms, has motivated the patients to seek medical attention at an earlier stage. The upper extremities were the sites most commonly

affected (n = 79, 80.6%), converging with the idea that areas exposed to trauma are more affected by sporotrichosis^{1,20,41}

In the present study, we found a frequency of 24.8% of manifestations of hypersensitivity such as erythema nodosum, erythema multiforme and Sweet's syndrome. Hypersensitivity reactions have been described in endemic sporotrichosis transmitted by cats in Rio de Janeiro since 2001 and are considered rare^{3,18,53-55}. Although some cases of erythema nodosum respond to non-hormonal anti-inflammatory drugs^{54,56}, the patients in our study presented intense and even incapacitating pictures due to local pain and the accompanying arthritis of large joints in some cases with rapid resolution after 7- 14 days of prednisone 0.5mg / kg / day. More intense pictures of erythema multiforme were solved with the same approach. The first reports of Sweet Syndrome associated with sporotrichosis were described in 2012, when two women with the fixed localized form developed disseminated erythematous plaques, with clinical and histopathology typical of the reaction, after the infection transmitted by felines also in Rio de Janeiro⁵⁷. We had two cases of Sweet syndrome in women associated with fixed cutaneous and lymphobuccal mycosis lesions and with a history of animal contact.

After demonstrating that distinct genotypes may be related to different clinical forms of the disease in guinea pigs, the case reports in humans seem to reinforce this hypothesis^{3,58}. Almeida-Paes, in a cross-sectional study, was the first to explore and demonstrate the association between the genotypic identification of *Sporothrix* species and the various clinical aspects of human sporotrichosis, showing a direct association between *S. brasiliensis* infection and 10 cases of erythema nodosum or multiforme, in addition to other 6/7 disseminated forms³. Factors such as feline transmission (with a tendency to present repetitive and intense fungal inoculum), host susceptibility and virulence of the pathogen could explain the association of sporotrichosis with manifestations of hypersensitivity^{3,57}. It is possible that the greater virulence of *S. brasiliensis* is a factor that contributes to atypical sporotrichosis in Brazil⁶ and it has been demonstrated in experimental models that the infection by this species generally presents greater fungal load, invasiveness and tissue damage, when compared to other agents of the *Sporothrix* Complex⁵⁹. Given this context, it is probable that this species will participate in the cases in Pernambuco. More studies are needed to prove this identification of *S. brasiliensis* in the region.

Although *Sporothrix* infection is rarely life-threatening, all clinical forms present considerable morbidity and require specific treatment^{12,15,20}. Treatment with itraconazole was

implemented for the majority of patients, except for those who used medications with potential for drug interaction, such as anticonvulsants, statins and psychiatric drugs. In agreement with the study by Lima Barros et al., The use of 100 mg/day of itraconazole was effective in 79.1% (72/91) of the patients, only 20.9% (19/91) requiring doses between 200 to 400mg / day ¹⁸.

Clinical resolution of infection and eradication of *Sporothrix* in tissues remain the goals of treatment. The mean treatment time in our study was 18 weeks. The literature reports that treatment duration usually ranges from 3-6 months, but treatment time remains arbitrary and should be continued for at least 4 weeks after complete clinical remission to achieve cure ^{8,15}. We observed a shorter time to cure in patients who presented hypersensitivity manifestations, as already evidenced in a study in Rio de Janeiro. Barros et al. studied the effect of itraconazole on cutaneous sporotrichosis in 645 patients in Rio de Janeiro, including 87 patients with erythema nodosum or multiforme and found that patients with hypersensitivity reactions resolved their illnesses more quickly when compared to those who did not present these reactions ¹⁸. Almeida-Paes et al., In 2014 found no association between time to cure and these characteristics, but found that patients with hypersensitivity reactions had predominantly fixed forms of cutaneous sporotrichosis ¹¹. It is believed that the reactions may indicate a response host cells against *Sporothrix* yeast cells and would play a protective role in sporotrichosis ³.

Nausea, epigastric discomfort, hypertriglyceridemia, headache were some of the observed side effects but did not motivate medication replacement. The low dose of itraconazole probably explains the low incidence of side effects. ¹⁸ In a Brazilian study in which patients used this antifungal for sporotrichosis, 18 to 21.4% of the patients reported adverse events, which were more frequent in those receiving doses of 200 -400mg/day ¹⁸. It is interesting to note that both itraconazole and the use of terbinafine and potassium iodide have been shown to be effective in containing the infection. Cost, ease of administration, safety profile are factors that should be considered when choosing treatment ⁸.

We conclude that sporotrichosis is a public health problem in the study area. The identification of the zoonotic nature of sporotrichosis in several Brazilian states, alerts to the need for public policies, with strategies to contain the epidemic. Control measures include castration of street animals and proper treatment of sick cats, cremation of dead animals to prevent the fungus from perpetuating itself in nature, as well as the education of owners about responsible ownership and the main aspects of *Sporothrix* transmission ¹³. Physicians treating patients suspected of sporotrichosis need to be aware of the high frequency of hypersensitivity

manifestations, which should not be confused with disseminated disease, and be aware that they can treat low-dose itraconazole with high efficacy in the in most cases. More studies are needed to clarify the local ecology, its reservoirs, species identification in the region, its antifungal sensitivity profile and risk factors for disease not yet fully identified.

ACKNOWLEDGEMENTS

Acknowledgments to the entire team of the Dermatological Clinic of the Hospital das Clínicas and the Laboratory of Medical Mycology of the Biosciences Center of the Clinics of the Federal University of Pernambuco.

CONFLICT OF INTEREST

Authors do not have conflicts of interest.

REFERENCES

1. Takenaka M, Yoshizaki A, Utani A, Nishimoto K. A survey of 165 sporotrichosis cases examined in Nagasaki prefecture from 1951 to 2012. *Mycoses*. 2014;57(5):294-298. doi:10.1111/myc.12158
2. de Araujo ML, Rodrigues AM, Fernandes GF, de Camargo ZP, de Hoog GS. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses*. 2015;58(8):485-490. doi:10.1111/myc.12346
3. Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9). doi:10.1371/journal.pntd.0003094
4. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol*. 2014;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
5. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
6. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathog*. 2017;13(1):2-8. doi:10.1371/journal.ppat.1006077
7. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Camargo ZP. *Sporothrix* Species Causing Outbreaks in Animals and Humans Driven by Animal–Animal Transmission. *PLoS Pathog*. 2016. doi:10.1371/journal.ppat.1005638
8. Mahajan VK. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/272376

9. Gutierrez-Galhardo MC, Barros MBL, Schubach AO, et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis [5]. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2005. doi:10.1111/j.1468-3083.2005.01148.x
10. Schubach A, Bastos De Lima Barros M, Pacheco Schubach TM, et al. Primary conjunctival sporotrichosis: Two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea*. 2005. doi:10.1097/01.ico.0000151504.26695.3e
11. Almeida-Paes R, de Oliveira MME, Freitas DFS, do Valle ACF, Zancopé-Oliveira RM, Gutierrez-Galhardo MC. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* Is Associated with Atypical Clinical Presentations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014. doi:10.1371/journal.pntd.0003094
12. Kauffman CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1999;(29):231-236.
13. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):606-620. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
14. Yamada K, Zaitz C, Framil VMDS, Muramatu LH. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide: a 24 year experience in São Paulo state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011. doi:10.1590/S0036-46652011000200006
15. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007. doi:10.1086/522765
16. Heidrich D, Stopiglia CDO, Senter L, Vettoratto G, Valente P, Scroferneker ML. Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. *An Bras Dermatol*. 2011.
17. Francesconi G, Valle A, Passos S, Reis R, Galhardo M. Terbinafine (250 mg/day): An effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009. doi:10.1111/j.1468-3083.2009.03306.x
18. De Lima Barros MB, Schubach AO, De Vasconcellos Carvalhaes De Oliveira R, Martins EB, Teixeira JL, Wanke B. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole - Study of 645 patients. *Clin Infect Dis*. 2011. doi:10.1093/cid/cir245
19. IBGE. Estimativas da população residente com data de referência 1o de julho de 2017.
20. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettoratto R, Gervini RL, Vettoratto G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(3):451-459. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
21. Filgueira KD. Sporotrichosis in the canine species: a case report on city of Mossoró – RN. *Ci Anim Bras*. 2009;10:673-677.
22. Nunes GDL, Santos RC FK et al. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. *Arq Ciências Veterinárias e Zool da UNIPAR*. 2013;14:157-161.
23. Marques-Melo EH, Lessa DF da S, Nunes ACBT, et al. Felino doméstico como agente

- transmissor de esporotricose para humano: relato do primeiro caso no estado de Alagoas. *Rev Baiana Saúde Pública*. 2014;38(2):490-498. doi:10.5327/Z0100-0233-2014380200018
24. Reed KD, Moore FM, Geiger GE, Stemper ME. Zoonotic transmission of sporotrichosis: Case report and review. *Clin Infect Dis*. 1993. doi:10.1093/clind/16.3.384
 25. Fleury RN, Taborda PR, Gupta AK, et al. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *Int J Dermatol*. 2001.
 26. Fichman V, Gremião IDF, Mendes-Júnior AAV, et al. Sporotrichosis transmitted by a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2018. doi:10.1111/jdv.14661
 27. Saravanakumar PS, Eslami P, Zar FA. Lymphocutaneous sporotrichosis associated with a squirrel bite: Case report and review. *Clin Infect Dis*. 1996. doi:10.1093/clinids/23.3.647
 28. Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz M de M, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. doi:10.1590/S0074-02762009000500018
 29. Bastos De Lima Barros M, De Oliveira Schubach A, Gutierrez Galhardo MC, et al. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: Report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. In: *International Journal of Dermatology*. ; 2003. doi:10.1046/j.1365-4362.2003.01813.x
 30. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
 31. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014;10(1). doi:10.1186/s12917-014-0269-5
 32. Rodrigues AM, De Hoog G, Zhang Y, De Camargo ZP. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant sporothrix species. *Emerg Microbes Infect*. 2014. doi:10.1038/emi.2014.33
 33. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. *An Bras Dermatol*. 2015. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447
 34. Schubach TMP, Valle a. CF, Gutierrez-Galhardo MC, et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). *Med Mycol*. 2001.
 35. Schubach TMP, Schubach ADO, Reis RS Dos, et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Mycopathologia*. 2002. doi:10.1023/A:1014449621732

36. Kovarik CL, Neyra E, Bustamante B. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Med Mycol*. 2008. doi:10.1080/13693780701567481
37. Mata-Essayag S, Delgado A, Colella MT, et al. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. *Int J Dermatol*. 2013;52(8):974-980. doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05849.x
38. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(4):633-654. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
39. Barros MB d L, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect*. 2008;136(9):1192-1196. doi:10.1017/S0950268807009727
40. Schubach A, Barros MBDL, Wanke B. Epidemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008. doi:10.1097/QCO.0b013e3282f44c52
41. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. *An Bras Dermatol*. 2015;90(2):273-275. doi:10.1590/abd1806-4841.20153447
42. da Rosa ACM, Scroferneker ML, Vettorato R, Gervini RL, Vettorato G, Weber A. Epidemiology of sporotrichosis: A study of 304 cases in Brazil. *J Am Acad Dermatol*. 2005. doi:10.1016/j.jaad.2004.11.046
43. Lopes JO, Alves SH, Mari CR, et al. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul Epidemiology of sporotrichosis in the central region of Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1999;32(5):541-545. doi:http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86821999000500012
44. Orofino-costa R. Esporotricose: atualização epidemiológica, etiopatogênica, laboratorial e clínico-terapêutica*. :606-620.
45. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. *BMC Infect Dis*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12879-016-1338-0
46. Itoh M, Okamoto S KH. Survey of 200 cases of sporotrichosis. *Dermatologica*. 1986;172:209-213.
47. Rodriguez-Vindas J. Clinical, epidemiological and ecological aspcts pf 100 sporotrichosis cases in Costa Rica. *Rev Costarric Cienc Med*. 1992;13:29-36.
48. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*. 2012. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.09.017
49. Rippon JW. Sporotrichosis. In: Rippon JW, ed. *Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes*. Philadelphia; 1988:325-352.
50. Bustamante B, Campos PE. Endemic sporotrichosis. *Curr Opin Infect Dis*. 2001. doi:10.1097/00001432-200104000-00006

51. Vismer HF, Hull PR. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia*. 1997. doi:10.1023/A:1006830131173
52. Song Y, Li SS, Zhong SX, Liu YY, Yao L, Huo SS. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2013. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04389.x
53. Orzechowski Xavier M, Riffel Bittencourt L, da Silva CM, Stone Vieira R, Pacheco Pereira HC. Atypical presentation of sporotrichosis: Report of three cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013. doi:10.1590/0037-868215282013
54. Papaiordanou F, da Silveira BRL, Abulafia LA. Hypersensitivity reaction to *Sporothrix schenckii*: Erythema nodosum associated with sporotrichosis. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015;48(4):504. doi:10.1590/0037-8682-0111-2015
55. Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. 2018:22-32. doi:10.3390/jof4030089
56. Orzechowski Xavier M, Riffel Bittencourt L, da Silva CM, Stone Vieira R, Pacheco Pereira HC. Atypical presentation of sporotrichosis: Report of three cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(1):116-118. doi:10.1590/0037-868215282013
57. Freitas DFS, Valle ACF, Cuzzi T, Brandão LGP, Zancope-Oliveira RM, Galhardo MCG. Sweet syndrome associated with sporotrichosis. *Br J Dermatol*. 2012;166(1):212-213. doi:10.1111/j.1365-2133.2011.10496.x
58. Kong X, Xiao T, Lin J, Wang Y, Chen H-D. Relationships among genotypes, virulence and clinical forms of *Sporothrix schenckii* infection. *Clin Microbiol Infect*. 2006. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01519.x
59. Fernandes GF, dos Santos PO, Rodrigues AM, Sasaki AA, Burger E, de Camargo ZP. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 2013. doi:10.4161/viru.23112

TABLE 1: Sociodemographic characteristics of 98 patients diagnosed with sporotrichosis in the specialized outpatient clinic of the Dermatology Sector of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco, between March 2017 and March 2018.

Variável	n	%
TOTAL	98	100,0
Age (years)		
19 a 29	18	18,4
30 a 59	57	58,2
60 a 91	23	23,5
Sex		
Male	26	26,5
Female	72	73,5
Region		
Recife	34	34,7
Metropolitan Region of Recife	56	57,1
State interior	8	8,2
Ocupation		
Housewife / Retirement	34	34,7
Veterinarian Activities	3	3,1
Rural worker	2	2,0
Student	4	4,1
Housekeeper	5	5,1
Others	45	45,9
Unemployed	4	4,1
Bricklayer	1	1,0
Cats in your house		
Yes	76	77,6
No	22	22,4
Contact with sick cats		
Yes	80	81,6
No	18	18,4
Activity with soil and plants		
Yes	27	27,6
No	71	72,4

Table 2: Clinical characteristics of 98 patients with sporotrichosis.

Variable	n	%
TOTAL	98	100,0
Clinical forma		
Fixed	27	27,6
Lymphocutaneous	66	67,3
Disseminated cutaneous	5	5,1
Duration of symptoms (weeks)		
4	37	37,8
4 a < 8	43	43,9
8 a < 12	12	12,2
≥ 12	6	6,1
Anatomical sites affected ⁽¹⁾		
Head	5	5,1
Neck	6	6,1
Trunk	11	11,2
Upper limbs	79	80,6
Lower membre	9	9,2
Associated Systemic symptoms		
Sim	37	37,8
Não	61	62,2
Reactions of Hipersensitivity		
No	73	74,5
Yes	25	25,5
Erythema nodosum	13	13,3
Erythema multiforme	8	8,2
Sweet syndrome	1	1,0
Erythema nodosum + multiforme	2	2,0
Erythema nodosum + erythema multiforme + Sweet syndrome	1	1,0
Imunossupression		
Yes	9	9,2
No	89	90,8

1) The percentages were obtained based on the 98 patients. Considering that the same patient may present more than one anatomical site affected, the sum of the frequencies may be higher than the total of surveyed

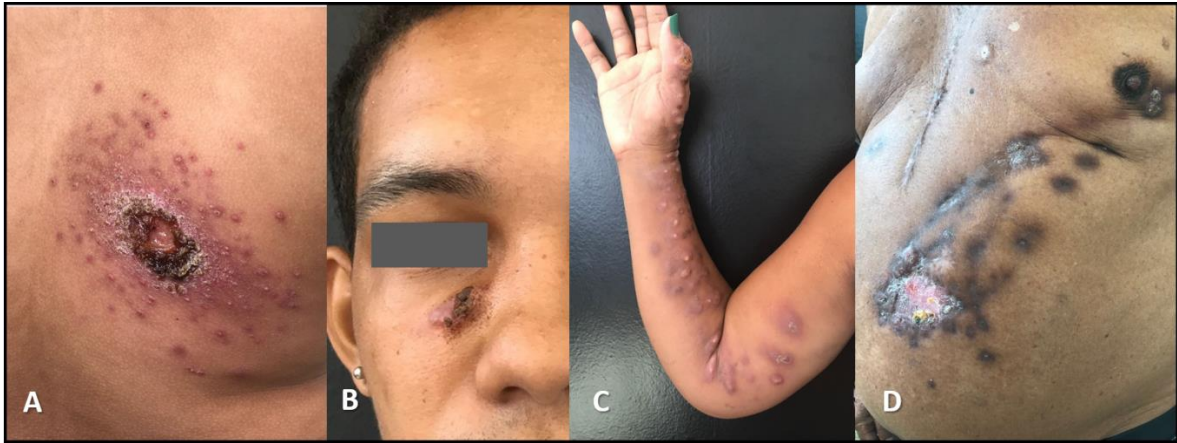


Figure 1: Clinical forms of sporotrichosis. A and B: Fixed form: C and D: lymphocutaneous form.



Figure 2: Dorsal, face and upper limb injuries in the same patient with disseminated cutaneous sporotrichosis.



Figure 3: Patients with sporotrichosis and manifestations of hypersensitivity. A. Erythema nodosum, left knee arthritis in a patient with fixed sporotrichosis lesion in the thigh; B: Erythema multiforme; C: Sweet's syndrome.

Table 3 – Assessment of the presence of hypersensitivity manifestations according to clinical form, duration of symptoms and immunosuppression.

Variable	Hypersensitivity				Total		p-Value
	n	Yes %	n	No %	n	%	
Total	25	100,0	73	100,0	98	100,0	
Clinical form							0,251 ⁽¹⁾
Fixed	10	40,0	17	23,3	27	27,6	
Lymphocutaneous	14	56,0	52	71,2	66	67,3	
Disseminated cutaneous	1	4,0	4	5,5	5	5,1	
Duration of the symptoms (days)							0,006* ⁽¹⁾
5 - 15	9	36,0	9	12,3	18	18,4	
16 - 30	9	36,0	23	31,5	32	32,7	
31 - 60	7	28,0	25	34,2	32	32,7	
>60	0	0,0	16	21,9	16	16,3	
Imunossupression							0,227 ⁽¹⁾
Yes	4	16,0	5	6,8	9	9,2	
No	21	84,0	68	93,2	89	90,8	

(*) Significant association a 5 %

(1) Through Fisher's exact Test.

Table 4 – Statistics of the treatment time (in weeks) according to the clinical forms, presence of manifestations of hypersensitivity and immunosuppression.

Variável	Media	Estatísticas			P25	P75	p-Valuep
		Standar deviation	Median				
Clinical Form							p ⁽¹⁾ = 0,066
Fixed	15,02	6,31	15,00	11,0	19,0		
Lymphocutaneous	19,01	9,20	18,14	14,29	22,14		
Disseminated cutaneous	21,14	6,24	21,29	15,29	26,93		
Hipersensitivit reactions							p ⁽²⁾ = 0,046*
Yes	16,91	11,25	14,43	11,14	20,71		
No	18,40	7,43	18,00	14,71	21,64		
Imunossupression							p ⁽²⁾ = 0,911
Yes	18,24	6,80	18,00	12,00	22,21		
No	18,00	8,72	17,14	13,57	21,14		

(*) Significant association a 5 %

(1) Kruskal Wallis Test

(2) Mann-Whitney Test

APÊNDICE D – VERSÃO DO ARTIGO 2 EM INGLÊS

Proposta de submissão para o periódico: **Medical Mycology**

Issue Section: ORIGINAL ARTICLE/ ORIGINAL PAPER

Title: DIAGNOSTIC COMPARISON BETWEEN MICROSCOPY EXAMS AND CULTURE FROM DIFFERENT BIOLOGICAL SAMPLES IN THE HUMAN SPOROTRICHOSIS

Short Title: MYCOLOGICAL EXAMS FROM DIFFERENT SAMPLES IN THE HUMAN SPOROTRICHOSIS

Authors: Cláudia Elise Ferraz¹, Carlos Alberto Tiburcio Valeriano², Daniela Mayumi Takano³, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto⁴, Vera Magalhães⁴

Affiliation:

¹Tropical Medicine Post- Graduation Program, Federal University of Pernambuco (UFPE).

²Department of Mycology, Center of Bioscience, Federal University of Pernambuco (UFPE).

³Department of Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE)

⁴Department of Tropical Medicine, Center of Health Science, Federal University of Pernambuco (UFPE).

Corresponding author:

CLÁUDIA ELISE FERRAZ, Rua Barão de Itamaracá, n.º 355, apto 1701, Espinheiro, Recife – PE. CEP: 52020-070. Phone: 55-81-991031512, e-mail: claudiaelise@yahoo.com.br.

Keywords: Sporotrichosis – *Sporothrix* – diagnosis - mycology

ABSTRACT

Sporotrichosis is an implantation mycosis caused by pathogenic species of the *Sporothrix Complex*. An epidemic of human sporotrichosis has been occurring in Rio de Janeiro from feline transmission since the late 1990s, with a gradual expansion of the number of cases to other states in Brazil. The gold standard diagnostic test of sporotrichosis is the isolation of *Sporothrix* in culture media. Direct microscopic examination has not been used in clinical and laboratory practice often, and it remains little studied. There are no studies that investigate if there is an advantage in obtaining more than one clinical specimen (skin fragment and secretion) for mycological examination. This study aims to evaluate the diagnostic methods in 85 cases of human sporotrichosis in the Northeast of Brazil, verifying their concordance and efficiency, as well as investigate if there is an advantage in using more than one complementary method, and more than one biological specimen for the mycological examination. Culture positivity in the fragment was greater than in the secretion (60% x 24.7%, respectively), which was adopted as the gold standard. Obtaining more than one biological material added sensitivity to the diagnosis, since the specimens were not mutually positive in one patient, with a *Kappa* index (*K*) of 0.19 for culture and *K*=0.27 for direct examination. When performed together and based on secretion and fragment, mycological examinations reached a positive rate of 92.9%, ratifying the importance of the combination of diagnostic methods.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is an implantation mycosis caused by thermophilic pathogenic species of the *Sporothrix Complex*, present in all continents (1–3). This disease has become a public health problem in the last few decades due to the increasing number of cases in humans, epidemiological changes, and geographical distribution, as well as a trend to zoonotic transmission and outbreaks (3–5). In Brazil, an epidemic of human sporotrichosis has been occurring in Rio de Janeiro from feline transmission since the late 1990s, with a gradual expansion of the number of cases to other states in the South, Southeast and Northeast of the country (6,7).

Characteristically, sporotrichosis manifests by ulcerated lesions and nodules that progress in ascending fashion through a lymphatic path, sometimes by fixed and rare disseminated cases (3,8). Clinical suspicion, based on epidemiological and morphological information of the lesions, is the basis for early diagnosis of sporotrichosis, which should be confirmed by complementary examinations(6,8,9).. In general, it is recommended that in open and/or floating lesions, secretion is collected, whereas in closed lesions without exudation, tissue fragment is obtained for mycological culture (10).

The standard gold diagnostic examination of sporotrichosis is isolation of *Sporothrix* in culture media obtained from biological specimens, such as skin exudate or fragment; in disseminated cases, they are sputum, liquor, blood, urine, depending on the affected organs (8). However, the time needed to obtain the result of this examination may take up to four weeks, and it may occasionally present false-negative results (11,12). Due to repetitive reports of shortage of yeast-like cells in human infection, the direct microscopic examination has been little used in clinical and laboratory practice (6,13,14). For this reason, the sensitivity and specificity of the direct examination remain little studied (13). Moreover, there are no studies investigating if there is an advantage in obtaining more than one clinical specimen for mycological examination to approach suspected cases of cutaneous sporotrichosis.

Other examinations may be applied in suspicious cases of human sporotrichosis, such as histopathology, serologies and molecular studies. The latter are still restricted to research purposes (6,15–19). The histopathological examination of the sporotrichosis lesion usually reveals a mixed granulomatous, suppurative reaction in most cases, but the fungus is rarely

found (6,20–22). This anatomopathological assessment of the fragment notably contributes to possible differential diagnoses, corroborating the diagnosis of fungal infection (9,19,20).

This study aimed to evaluate the diagnostic methods of human sporotrichosis, verifying the agreement between diagnostic methods and their efficiency (sensitivity and specificity of mycological examination), as well as verify if it is advantageous to use more than one complementary method and more than one biological specimen for the myological examination.

MATERIALS AND METHODS

A cross-sectional study was carried out with patients with clinical suspicion of sporotrichosis, who that referred to outpatient clinic in the Dermatology Clinic of the university hospital in Pernambuco, Northeast of Brazil, between March 2017 and March 2018. The patients answered a clinical-epidemiological questionnaire, and they were submitted to collection of ulcerated lesion exudate, as well as the biopsy by a 4-mm puncture to collect two fragments of lesion tissue. Both specimens were analysed by direct microscopic examination and cultivated in solid medium. One of the tissue fragments was sent to anatomopathological examination.

The secretion swabs collected with sterile swab and the tissue fragments were made on blades, clarified with potassium hydroxide at 20% and co-administered with Giemsa. All the direct examination blades were analysed with a 1000-x optical microscope. The direct microscopic reading was considered positive when at least one yeast-like structure suggestive of *Sporothrix* sp. was found. Simultaneously, samples of ulcerated skin lesion and tissue fragment were cultivated in Sabouraud Dextrose Agar (Difco) supplemented with cloranphenicol (2g/L), incubated at 25°C, and observed for up to 15 days. Since the growth of the fungus in culture was detected, the micromorphology analysis was performed. The biopsy fragments sent for anatomopathological examination were fixed in in a 10% formaldehyde and submitted to conventional methods of processing, colouring with hematoxylin-eosin (HE) and periodic acid Schiff (PAS), and then evaluated by a dermatologist. After analysing a patient with suspicious lesions and favourable epidemiology, it was concluded that the finding of granulomatous, suppurative inflammation was compatible with sporotrichosis; the encounter of yeast-like suggestive forms of *Sporothrix* to the coloration using PAS led to establishing the diagnosis.

Cases of sporotrichosis were associated to patients with clinical lesions presenting nodules, ulcers or plaques on the skin. At least one complementary examination compatible with sporotrichosis (histopathological examination, direct mycological examination, and/or mycological culture) were performed. These cases were clinically cured with specific antifungal treatment. The patients eligible for this study confirmed the diagnosis of sporotrichosis, and simultaneously performed three complementary examinations (the direct mycological and culture examinations, obtained from the secretion and the skin fragment, as well as the histopathological examination).

The data were stored in EXCEL, and the programme used to obtain statistical calculations was the IBM SPS, version 23. The mycological culture led to establishing the standard diagnostic examination. The results were expressed through absolute and percentage frequencies; also, sensitivity, specificity, Positive Predictive Value (PPV), Negative Predictive Value (NPV), and acuity were calculated. To evaluate an association between two variables, the Fisher's Exact test was used, considering a 5%-significance level. The concordance between the direct examination and mycological culture in the different biological specimens was determined by the *Kappa index*.

This study was approved by the Ethics Committee in Research of the Centre for Health Sciences at the Federal University of Pernambuco, Brazil (CAAE: 71105617.0000.5208).

RESULTS

One hundred and three patients were diagnosed with sporotrichosis in the period from March 2017 to March 2018. Of these, 85 were submitted to the three tests simultaneously (direct mycological examination, examination of exudates and fragments, and histopathological examination), and they were included in the study. Women amounted for 71.8% of the cases. The age of the patients investigated ranged between 19 and 91 years, with an average of 47.78 years (SD+- 17.24 years), and a median of 48.00 years. The disease time ranged from 5 to 280 days, with an average of 41.79 days (SD = 45.10 days), and median time equal to 29 days (TABLE 1).

The mycological culture presented initially hyaline colonies that acquired a dark brown coloration and a wrinkled, folded surface after 5-7 days of cultivation. The micromorphology revealed the presence of septated, delicate hyaline hyphae, and rather ramified conidiophores. They presented synempha-type conidiophores with either fusiform or pyriform sympodial conidia in floral disposition, similar to a daisy-like arrangement (Figure 1). There was greater

culture positivity from the biopsy fragments than among the exudates (61% x 24%, respectively) (table 2). The direct microscopic examination revealed the presence of small, round and elliptic hyaline yeast, as well as elongated ones in 40% of the secretion samples and 67.1 % of the fragments. In only four cases, fungal structures were visualized through PAS in the histopathological examination. The granulomatous, suppurative inflammation was found in most patients as a rule (83.5%).

No differences were found between the positivity of the different examinations and the clinical form of the disease. The acuity parameters are described in table 3. The direct microscopic examination sensitivity of the fragment was 62.7%. The concordance between the results of the cultures and direct examinations of the different specimens is described in table 4.

When the concordance between mycological examinations was compared considering the specimens, a low concordance was found in the culture analysis, with a Kappa index between the cultures equal to 0.19 (95% CI from 0.04 to 0.34), and reasonable concordance of the direct examination was found equal to 0.27 (95% CI from 0.10 to 0.44).

Graph 1 shows the assessment of the positivity of the direct mycological examination and culture between specimens (secretion and lesion skin fragment), and a combination of the method sensitivities. Altogether, it was found that the direct examination and fragment culture resulted in 89.4% of positivity in the sporotrichosis cases.

DISCUSSION

Sporotrichosis may be diagnosed after establishing a correlation between clinical, epidemiological and laboratory examination aspects. A general sensitivity of 64.7% of mycological culture was found. This value was lower than what was described in the literature, ranging from 78% to 95% of positivity (14,23).. These data show that despite being considered a gold standard (8,24,25), the method presents limitations. It is not 100% sensitive (11).. False-negative results usually occur due to inadequate collection or transport, contamination by saprotical micro-organisms, secondary bacterial infections, as well as inadvertent use of antifungal agents before the material was collected (26). These factors were also present in this study, reflecting the real difficulties of health care.

In this study, the culture positivity based on the fragment was greater than in the lesion secretion (60% x 24.7%, respectively), so it was adopted as a gold standard. It is likely that

these results were found because of greater bacterial contamination of the lesion surface secretion compared to the tissue one.

The direct microscopic examination, when carried out using exudate or secretion, is a non-invasive, fast and low-cost examination (23). Interestingly, in 40% of the direct examinations of the lesion secretion of the patients studied with sporotrichosis, hyaline, elliptical yeast-like structures suggestive of *Sporothrix* were visualized, as well as 67.1% of the examinations considering the lesioned skin fragment. These values were greater than the ones described in the literature. There are authors who believe that the direct mycological examination is a useless tool to diagnose human sporotrichosis due to the paucity of fungal cells in the skin lesion, having little practical value as a diagnostic instrument (13,27). Yeast was found in only 5% -10% of the cases of fixed cutaneous and cutaneous lymphatic types of sporotrichosis (8,18,28). It is known that the swabs coloured by Giemsa obtained from the pus or *imprint* based on lesion biopsies may increase test sensitivity (22). The direct examination of the pus without potassium hydroxide also enables to detect asteroid bodies in 43.75% a 93.75% of the cases, with greater sensitivity if secretion is collected more profoundly (23,29,30). No asteroid bodies were found in the direct examinations since a clarification methodology was adopted using KOH.

The findings of the direct examination of hyaline yeast-like cultures or asteroid bodies may assist the start of a specific treatment, whereas the culture or histopathological examination results are not available yet (8,29). It is worth pointing out that the observation of yeast-like structures at direct examination, however, does not provide a conclusive diagnosis of sporotrichosis. The characteristic cigar-shaped cells (2 x 3 or 3 x 10 µm) are not always observed easily. Furthermore, *H. capsulatum* and *Candida glabrata* yeast may be mistakenly identified as *Sporothrix* yeast (31). Thus, clinical and epidemiological correlation is fundamental, as well as excluding other diagnostic possibilities.

Sporotrichosis may not be the first diagnostic hypothesis in non-endemic regions, and general procedures for collection and microbiological processing in order to isolate the fungus may not be properly implemented outside the reference services. In such cases, other diagnostic methods are necessary to establish the differential diagnosis between sporotrichosis and other diseases with similar clinical morphology, whether they are infectious diseases (fungal or non-fungal ones) or even neoplastic lesions(9,11,19,32). Even if the lymphocyte forms have a classical presentation, other diseases such as leishmaniasis, nocardiosis, and atypical

mycobacterial forms may produce morphologically similar lesions (9,33–35). Therefore, when dealing with patients with suspected sporotrichosis, in typical or non-standard forms, conducting a biopsy to perform a histopathological analysis may notably contribute to a diagnostic definition (9). In our study, 81% of granulomatous, suppurative infiltrate were found. This was suggestive of fungal infection, which was compatible with literature findings that also indicate that the fungus is rarely found (18,20). When present, it is presented as small round-wounded yeast or cigar-shaped small yeast, better visualized using PAS coloration or methenamine silver (6,21,22). Nonetheless, of the non-specific findings, the histopathological one is especially important for the differential diagnosis, since it excludes other diagnostic possibilities (9). Furthermore, and it plays the role of guiding the approach of patients who did not receive confirmation of the disease after the mycological examination, but present clinical-epidemiological aspects suggestive of sporotrichosis.

This study is the first one in the Northeast of Brazil to describe the accuracy of the diagnostic methods, comparing the test efficiency in cutaneous sporotrichosis in humans when more than one biological specimen is obtained for mycological examination. The direct examination of the fragment sensitivity was 62.7% compared to the fragment culture. Obtaining more than one biological material added sensitivity to the diagnosis, since the specimens were not mutually positive in the same patient, as demonstrated by the low concordance of culture results with a *Kappa* index equal to 0.19 (95% CI 0.04 a 0.34, $p=0.024$), and reasonable concordance of direct examination ($K=0.27$, 95% CI 0.10 a 0.44, $p=0.003$). When performed together and based on secretion and fragment, the mycological examinations reached a positive rate equal to 92.9%, emphasising the importance of combining diagnostic methods.

Our findings may contribute to better delineate diagnoses in regions that are either endemic or have a greater number of cases of sporotrichosis. Finally, it is suggested that the mycological examination of more than one biological specimen is performed when approaching suspected cases. The direct analysis and cultivation of secretion and the lesioned skin fragment is advised in order to increase the probability of defining the infection in the assisted patients.

REFERENCES

1. McGuinness SL, Boyd R, Kidd S, McLeod C, Krause VL, Ralph AP. Epidemiological investigation of an outbreak of cutaneous sporotrichosis, Northern Territory, Australia. BMC Infect Dis [Internet]. 2016;16(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1338-0>
2. Marques GF, Martins ALGP, Sousa JMP, Brandão LSG, Wachholz PA, Masuda PY. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the State of São Paulo – Brazil, 2003 – 2013. An Bras Dermatol. 2015;
3. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. Med Mycol. 2014;53(1):3–14.
4. López-Romero E, Reyes-Montes MDR, Pérez-Torres A, Ruiz-Baca E, Villagómez-Castro JC, Mora-Montes HM, et al. Sporothrix schenckii complex and sporotrichosis, an emerging health problem. Future Microbiology. 2011.
5. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. Sporothrix schenckii complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. Med Mycol. 2016;54(6):593–9.
6. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. An Bras Dermatol. 2017;92(5):606–20.
7. Gremião IDF, Miranda LHM, Reis EG, Rodrigues AM, Pereira SA. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. PLoS Pathog. 2017;13(1):2–8.
8. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. Sporothrix schenckii and Sporotrichosis. Clin Microbiol Rev. 2011;24(4):633–54.

9. Tirado-Sánchez A, Bonifaz A. Nodular Lymphangitis (Sporotrichoid Lymphocutaneous Infections). Clues to Differential Diagnosis. *J Fungi* [Internet]. 2018;4(2):56. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/4/2/56>
10. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017;
11. Silva JN, Passos SRL, Menezes RC, Gremião IDF, Schubach TMP, Oliveira JC, et al. Diagnostic accuracy assessment of cytopathological examination of feline sporotrichosis. *Med Mycol*. 2015;53(8):880–4.
12. Silva JN, Miranda LHM, Menezes RC, Gremião IDF, Oliveira RVC, Vieira SMM, et al. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *J Comp Pathol*. 2018;160:72–8.
13. Mahajan VK. Sporotrichosis: An overview and therapeutic options. *Dermatol Res Pract*. 2014;2014.
14. Oyarce JA, García C, Alave J, Bustamante B. Caracterización epidemiológica, clínica y de laboratorio de esporotricosis en pacientes de un hospital de tercer nivel en Lima-Perú, entre los años 1991 y 2014. *Rev Chil infectología* [Internet]. 2016;33(3):315–21. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000300012&lng=en&nrm=iso&tlng=en
15. Bernardes-Engemann AR, De Lima Barros M, Zeitune T, Russi DC, Orofino-Costa R, Lopes-Bezerra LM. Validation of a serodiagnostic test for sporotrichosis: A follow-up study of patients related to the Rio de Janeiro zoonotic outbreak. *Med Mycol*. 2014;53(1):28–33.

16. Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;
17. Rodrigues AM, Najafzadeh MJ, De Hoog GS, De Camargo ZP. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1–16.
18. Quintella LP, Lambert Passos SR, Francesconi Do Vale AC, Gutierrez Galhardo MC, De Lima Barros MB, Cuzzi T, et al. Histopathology of cutaneous sporotrichosis in Rio de Janeiro: A series of 119 consecutive cases. *J Cutan Pathol*. 2011;
19. Quintella LP, Passos SRL, De Miranda LHM, Cuzzi T, Barros MBDL, Francesconi-Do-Vale AC, et al. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br J Dermatol*. 2012;
20. Zhang YQ, Xu XG, Zhang M, Jiang P, Zhou XY, Li ZZ, et al. Sporotrichosis: Clinical and histopathological manifestations. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(3):296–302.
21. Vásquez-del-Mercado E, Arenas R, Padilla-Desgarenes C. Sporotrichosis. *Clin Dermatol*. 2012;
22. Morris-Jones R. Sporotrichosis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2002.
23. Civila ES, Bonasse J, Conti-Díaz IA, Vignale RA. Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. *Int J Dermatol*. 2004;43(11):808–10.
24. Rippon JW. Sporotrichosis. In: Rippon JW, editor. *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia; 1988. p. 325–52.
25. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous

- Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. *J Fungi*. 2017;
26. Schwarz J. The diagnosis of deep mycoses by morphologic methods. *Hum Pathol*. 1982;
 27. Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. Cutaneous Involvement in the Deep Mycoses: A Literature Review. Part I—Subcutaneous Mycoses. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 2016;107(10):806–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.adengl.2016.05.026>
 28. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A. Cutaneous Disseminated and Extracutaneous Sporotrichosis: Current Status of a Complex Disease. *J Fungi* [Internet]. 2017;3(1):6. Available from: <http://www.mdpi.com/2309-608X/3/1/6>
 29. Gezuele E, Da Rosa D. Relevancia del cuerpo asteroide esporotricósico en el diagnóstico rápido de la esporotricosis. *Rev Iberoam Micol*. 2005;
 30. De Lima Barros MB, Pacheco Schubach TM, Gutierrez Galhardo MC, De Oliveira Schubach A, Fialho Monteiro PC, Santos Reis R, et al. Sporotrichosis: An Emergent Zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):777–9.
 31. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical microbiology reviews*. 2011.
 32. Miranda LHM, Conceição-Silva F, Quintella LP, Kuraem BP, Pereira SA, Schubach TMP. Feline sporotrichosis: Histopathological profile of cutaneous lesions and their correlation with clinical presentation. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;
 33. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2007;

34. Barros MB d L, Schubach AO, Schubach TMP, Wanke B, Lambert-Passos SR. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: Epidemiological aspects of a series of cases. *Epidemiol Infect.* 2008;136(9):1192–6.
35. Smego RA, Castiglia M, Asperilla MO. Lymphocutaneous syndrome: A review of non-sporothrix causes. *Medicine (Baltimore)*. 1999;

Table 1: Characterization of the sample of cases of human sporotrichosis treated at the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco, Recife- Brazil, from March 2017 to March 2018.

Variable	n	%
TOTAL	85	100.0
Age group (years)		
19 to 39	29	34.1
30 to 59	36	42.4
60 to 91	20	23.5
Sex		
Male	24	28.2
Female	61	71.8
Region		
Recife	31	36.5
RME	45	52.9
Another state	9	10.6
Disease time (days)		
5 to 15	18	21.2
16 a 30	28	32.9
31 a 60	26	30.6
61 days or more	13	15.3
Clinical form		
Fixed	23	27.1
Lymphocutaneous	57	67.1
Disseminated culture	5	5.9

Figure 1 - A. Direct microscopic examination clarified with KOH demonstrating yeast-like structures; B. A *Sporothrix* sp. Colony in Agar Sabouraud a 30°C; C. Micromorphology with hyaline hyphae septated with conidiophores, originating in primary hyaline conidia in a bouquet-like arrangement.

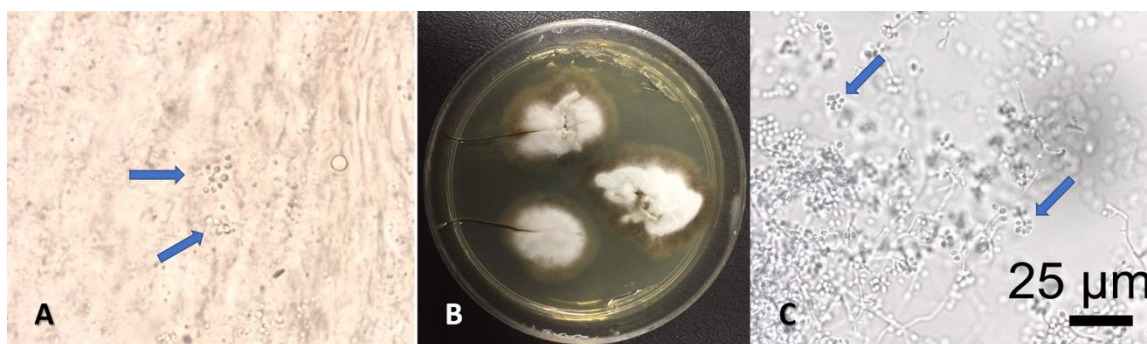


Table 2: Characterization of the sample of cases of human sporotrichosis treated at the Clinical Hospital of the Federal University of Pernambuco, Recife- Brazil, from March 2017 to March 2018.

Examination	n	%
TOTAL	85	100.0
CULTURE	55	64.7
Secretion culture		
Positive	21	24.7
Negative	64	75.3
Fragment culture		
Positive	51	60.0
Negative	34	40.0
DIRECT EXAMINATION	62	72.9
Direct examination of secretion		
Presence of yeast-like cells	34	40.0
Absence	51	60.0
Direct examination of fragment		
Presence of yeast-like cells	57	67.1
Absence	28	32.9
HISTOPATHOLOGICAL		
Granulomatous, suppurative inflammation	71	83.5
Granulomatous, suppurative inflammation with PAS+ yeast	4	4.7
Other findings	10	11.8

Table 3 - Sensitivity, specificity, PPV, NPV and accuracy of the direct examinations in relation to the fragment culture, considered a gold standard in this study.

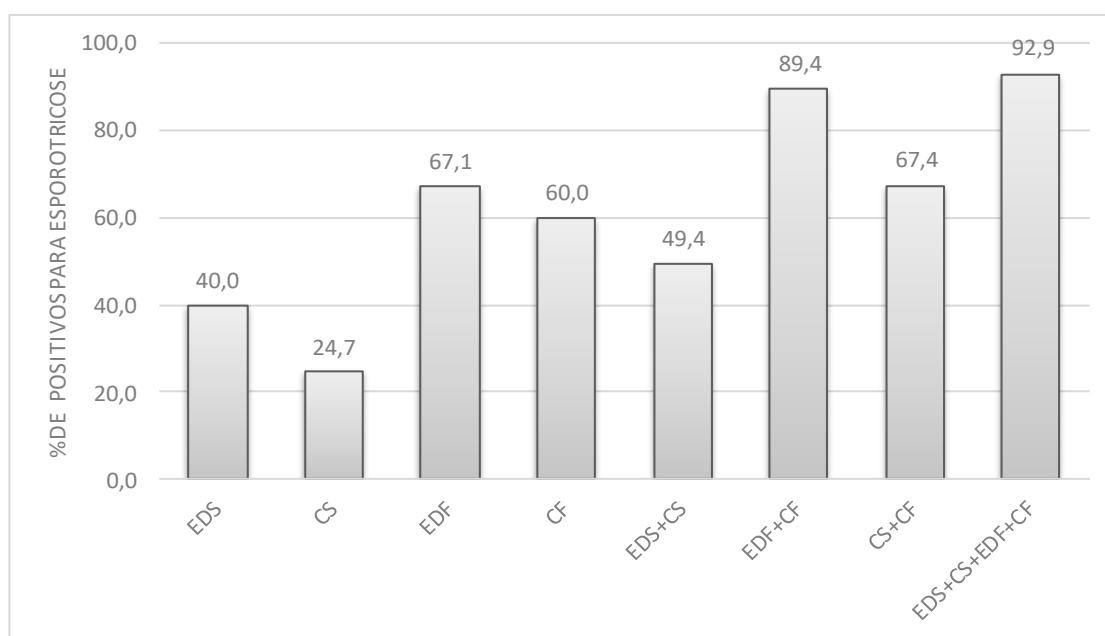
Examination	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
Secretion culture	33.3 (17/51)	88.2 (30/34)	81.0 (17/21)	46.9 (30/64)	55.3 (47/85)
Direct examination of secretion	47.1 (24/51)	70.6 (24/34)	70.6 (24/34)	47.1 (24/51)	56.5 (48/85)
Direct examination of fragment	62.7 (32/51)	26.5 (9/34)	56.1 (32/57)	32.1 (9/28)	48.2 (41/85)

Note: PPV: positive predictive value; NPV: negative predictive value.

Table 4 - Concordance between direct examination and mycological culture in the different biological specimens (n=85).

Fragment	Secretion culture				Total		p-value	Concordance	
	Positive		Negative					Observed	Kappa (95% CI)
	n	%	n	%	n	%		n (%)	
Culture							0.024*		
Positive	17	20.0	34	40.0	51	60.0		47 (55.3)	0.19 (0.04 to 0.34)
Negative	4	4.7	30	35.3	34	40.0			
Total	21	24.7	64	75.3	85	100.0			
Direct examination of secretion									
Direct examination							0.003*		
Positive	29	34.1	28	32.9	57	67.1		52 (61.2)	0.27 (0.10 a 0.44)
Negative	5	5.9	23	27.1	28	32.9			
Total	34	41.2	51	60.0	85	100.0			

Graph 1 - Assessment of direct mycological examination and culture positivity in different specimens (secretion and skin fragment) in order to diagnose human sporotrichosis, either isolated or grouped (N=85).



Note: DES: direct examination of secretion; SC: secretion culture; DEF: direct examination of the fragment; FC: fragment culture.

APÊNDICE E – VERSÃO DO ARTIGO 3 EM INGLÊS

ORIGINAL ARTICLE

OUTBREAK OF HUMAN SPOROTRICHOSIS IN THE BRAZIL NORTHEASTERN: MOLECULAR IDENTIFICATION AND ANTIFUNGAL PROFILE

Cláudia Elise Ferraz^{1,2}, Carlos Tibúrcio Valeriano³, Cícero Pinheiro Inácio³, Rejane Pereira Neves³, Vera Magalhães⁴, Reginaldo Gonçalves de Lima Neto⁴

¹Tropical Medicine Post- Graduation Program, Federal University of Pernambuco (UFPE).

²Department of Dermatology, Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco (UFPE).

³Department of Mycology, Center of Bioscience, Federal University of Pernambuco (UFPE).

⁴Department of Tropical Medicine, Center of Health Science, Federal University of Pernambuco (UFPE).

Keywords: Sporotrichosis, *Sporothrix brasiliensis*, Brazil, Antifungal agentes

Corresponding author:

CLÁUDIA ELISE FERRAZ, Rua Barão de Itamaracá, n.º355, apto 1701, Espinheiro, Recife – PE. CEP: 52020-070. Phone: 55-81-991031512, e-mail: claudiaelise@yahoo.com.br.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection caused by dimorphic fungi of the genus *Sporothrix*, which affects humans and animals worldwide, sporadically or in outbreaks. This mycosis is an epidemic public health problem due to zoonotic transmission in the Southeast region of Brazil, with an apparent extension to other regions of the country. The objective of this study was to identify the species of the *Sporothrix* complex based on sequencing of the calmodulin gene (CAL), from 26 human isolates from Pernambuco, Northeast Brazil. In addition, minimal inhibitory concentrations (MICs) for amphotericin (AMB), itraconazole (ITC), ketoconazole (KTC), voriconazole (VRC), fluconazole (FLC) and terbinafine (TRB) against isolates were determined following M38-A2 protocol. Genotypic analysis based on the PCR reaction of the calmodulin gene showed that 92.3% of the isolates were *Sporothrix brasiliensis* and 7.7%, *S. schenckii*. TRB showed better activity against *Sporothrix* sp., Followed by ITC, CTC and AMB. VRC and FLC were the least active drugs against *Sporothrix* sp. We did not observe strains multiresistant to the tested antifungals. The predominant occurrence of *S. brasiliensis* as an agent of human sporotrichosis in Pernambuco is evident. Knowing the high in vitro efficacy of TRB and ITC and the absence of multiresistant isolates in the local outbreak can help in the choice of antifungal therapy and contribute to the favorable clinical outcome.

INTRODUCTION

Sporotrichosis is a subcutaneous fungal infection caused by dimorphic fungi of the genus *Sporothrix*, which affects humans and animals worldwide, sporadically or in outbreaks.¹ In the last two decades, sporotrichosis has been changing its epidemiological profile from an occasional infection, by inoculation of the fungus of environmental origin, to an epidemic public health problem by zoonotic transmission, in the Southeast region of Brazil, with apparent extension to other regions of the country.²

Most species included in the genus *Sporothrix* are environmental, non-pathogenic saprophytic fungi, which are closely related to decomposing wood, plants and soil.³ The species *S. schenckii sensu strictu*, *S. globosa* are currently recognized as members of the *Sporothrix schenckii* complex, *S. luriei* and *S. brasiliensis*.^{1,4} The *Sporothrix pallida* complex presents low pathogenicity and includes *S. mexicana*, *S. pallida* and *S. chilensis* with only sporadic reports of sporotrichosis caused by these species^{1,5-7}. *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix mexicana* are known to have regional outbreaks in South America, *Sporothrix globosa* in Europe and Asia and *Sporothrix luriei* has been rarely isolated in South Africa.⁸

The clinical manifestations of sporotrichosis depend on the host's immunity, on the size and depth of the inoculum and on the genotype of *Sporothrix*.^{3,8} Recently there has been a growing body of evidence suggesting that different species of *Sporothrix* may have different degrees of virulence, based on their ability to evade immunological recognition⁹, be recognized by human mononuclear cells and induce an immune response.^{10,11} In this way, more atypical and disseminated pictures could be associated with more virulent strains.¹²

Sporothrix, in addition to its high genetic diversity, is accompanied by variable in vitro responses to the main antifungal agents used in the treatment of sporotrichosis.^{13,14} Although amphotericin B (AMB) and itraconazole (ITC) are considered first or second treatment line for various clinical presentations of sporotrichosis¹⁵ have been reported isolated isolates resistant to these drugs and other antifungal agents.^{8,14,16} Differences in sensitivity patterns from different species, sources (human, animal or environmental) and geographic regions emphasize the need to perform the identification of the species and to test antifungal susceptibility to adjust the therapeutic regimen and avoid relapses.^{13,14,17-19}

Up to now, there are no publications regarding the genomic identification or antifungal susceptibility of its etiological agents involved in the recent outbreak of sporotrichosis in Pernambuco, Northeast Brazil. In view of this scenario, the objective of this study was to identify the species of the *Sporothrix* complex based on the sequencing of the calmodulin gene (CAL), from human isolates. In addition, minimal inhibitory concentrations (MIC) for amphotericin (AMB), ITC, voriconazole (VRC), fluconazole (FLC) and terbinafine (TRB) against the isolates were determined.

MATERIAL AND METHODS

Fungal strains

Clinical samples were collected from March 2017 to March 2018 of patients referred to Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco (HC-UFPE) in Recife, Pernambuco, Brazil, with fixed sporotrichosis, lymphobutanos or disseminated. All 26 isolates had previously been identified as *Sporothrix* sp. by culture in routine laboratory mycological diagnosis. Patients were 18 to 71 years of age, and the ratio between women and men was 4: 1. Information on the strains are summarized in Table 1. The isolates were maintained on Sabouraud agar with 20% glycerol at -80 ° C.

Genomic Analysis

DNA extraction

The genomic DNA was extracted according Inácio et al. (2016) with modifications, regarding the fungi biological demands: *Sporothrix* sp. strains were grown at 35 °C for seven days in Petri plates containing Potato Dextrose Agar (PDA-Difco™ Becton, Dickinson and Company/Sparks, MD, USA). The mass of cells was then transferred to a microcentrifuge tube containing glass bead matrix where 1.5 mL of 4% Cetyltrimethylammonium bromide base (CTAB) warmed to 65 °C was added. The tubes were then agitated in a FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) for 1 min at a speed of 5.5 m/s (Meters per second) and incubated at 65 °C for 1 h. Chloroform-isoamyl alcohol (24:1) was used to deproteinize the mycelial fragment, followed by DNA precipitation with isopropanol, a wash with 70% ethanol, and resuspension in sterile ultrapure water. The *Sporothrix* sp. DNA extraction was performed with the fungal in your filamentous phase.

PCR reactions and sequencing of Calmodulin gene

The extracted DNA was amplified by PCR using the primers CL1 (5-GA (GA) T (AT) CAAGGAGGCCTTCTC-3) and CL2A (5-TTTTTGCAT CATGAGTTGGAC-3) (Marimon et al. 2007, Suzuki, 2016). CAL regions were amplified according the following cycle parameters: primary denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1min, annealing at 56 °C for 1min, with a final extension at 72 °C for 10 min. The amplicons were purified using the illustra™ Alkaline Phosphatase and Exonuclease A kit (illustra™ ExoProStar™, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions, and sequencing was performed at the Platform of Sequencing-LABCEN/CCB (UFPE).

Phylogenetic analysis

The sequences were edited in the BioEdit software version 7.2.6.1 and the clinical strains were identified at the species level through a search for similar sequences ($\geq 99\%$ similarity) in GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). The alignment was performed in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software version 7.0 (Mega7), where also the phylogenetic tree was constructed by the Maximum likelihood statistical method. The distance between the sequences was calculated using the Kimura 2-parameter²⁰ plus Gamma (K2P+G). This substitution model was selected using the FindModel tool (<https://www.hiv.lanl.gov/cgi-bin/findmodel/findmodel.cgi>). A bootstrap with 1.000 replications was conducted. Species of the *Sporothrix pallida* Complex was chosen as an out group in order to provide a better understanding of the evolutionary relationships within the phylogram²¹.

Antifungal susceptibility tests

Standard antifungals currently used in the sporotrichosis treatment were tested against the *Sporothrix* sp. isolates: AMB (Bristol-Myers Squibb, USA), ITC (Janssen Pharmaceutica, Belgium), TRB (EMS, Brazil) and FLC (Pfizer, USA) (Orofino-Costa, 2017) with concentrations varying between 0,03 and 0,016 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for AMB and ITC, and between 0,0125 and 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for TRB and FLC in the 96 wells microtitulation plane plates (TPP; Trasadingen, Suíça). VRC (Pfizer, USA) and KTC (Medley, Brazil) were also tested, though not be commonly used in the sporotrichosis treatment, with concentrations varying between 0,03 and 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The determination of the MIC followed the CLSI M38-A2 protocol, with

some modifications in the reading criteria, that was made considering 100% of inhibition compared to the growth in the control well for all drugs. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 was the quality control strain for the test. RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA), sterilized in 22mm (Millipore, Darmstadt, Germany) membranes, with L-glutamine, without sodium bicarbonate and pH $7,0 \pm 0,1$, buffered with 3-[N-morpholine] propano-acid sulfonic (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich) was the medium used for dilution of the drugs and for the addition of 100µL of standardized inocula in each well. *Sporothrix* sp. isolates was incubated at 35 °C during 7 days in PDA medium. The inocula suspension was prepared in saline solution (0,85g/L), and the density adjusted according the MacFarland scale at 80% to 82% of the transmittance in spectrophotometer at 530nm. The inocula suspension were diluted in RPMI 1640 to concentration of $2\text{-}5 \times 10^3 \text{ cells.mL}^{-1}$. The plates were incubated at 35 °C during 48h before the test reading.

RESULTS

The genotypic analysis shows that 92,3% (24/26) of the isolates were identified as *Sporothrix brasiliensis* and 7,7% (2/26) as *S. schenckii*, according it's displayed in the Table 1. The Figure 1 shows the phylogenetic tree of the isolates based in the CAL gene PCR reaction. The high bootstrap values support the genotypic identification of the clinical strains. The MIC ranges of the six antifungal agents tested against *S.brasiliensis* and *S. schenckii* its shown in the Table 2. The MICs of AMB, KTC, ITC, FLC, TRB and VRC vary between 0,125-8, 0,03- ≥ 16 , 0,03- ≥ 16 , 2->64, 0,125-8 and 1->16 µg/mL respectively. The tested drugs MICs for *Candida parapsilosis* ATCC 22019 shows ranges within the standards preconized in the CLSI. TRB showed the best activity against *Sporothrix* sp. strains, followed by ITC, KTC and AMB sequentially. VRC and FLC was the drugs with less activity against *Sporothrix* sp., with most part of the inhibition occurring in the higher concentration well or with no inhibition. Não observamos cepas multirresistentes aos antifúngicos testados.

DISCUSSION

The Northeastern region of Brazil has demonstrated a growing number of cases of sporotrichosis. In the present study, we identified the species of 26 isolates of skin lesions in patients with sporotrichosis, identifying *S. brasiliensis* as prevalent in the recent outbreak in the state of Pernambuco. The State of Pernambuco is located 2300 km north of the Metropolitan Region of Rio de Janeiro, the nucleus where the zoonosis caused by *Sporothrix brasiliensis* has

started, and has been experiencing an outbreak of sporotrichosis transmitted by cats. In South and Southeastern Brazil, the zoonotic transmission of sporotrichosis is well documented, with absolute prevalence of *S. brasiliensis* as an etiological agent.^{2,5,22} It is noteworthy that *S. schenckii* s. str. may also affect cats, however, at a significantly lower frequency^{23,24}

Genotypic analysis revealed *Sporothrix brasiliensis* as the pathogenic species prevalent in the occurrence of sporotrichosis in the State, similar to the case of the outbreak in Rio de Janeiro. The phylogenetic analysis shown in Figure 1 provides robust support for genotypic identification. It is important to note that cases of sporotrichosis were concentrated in the urban area of the Metropolitan Region of Recife, where the climate is hot and humid, similar to the city of Rio de Janeiro. Although it is not possible to affirm that the universe of patients with sporotrichosis in this service is the reality of the state, we can assume that the sample is representative of the current situation of the disease since this hospital has the only qualified and specialized center for diagnosis and treatment of human sporotrichosis in the region.

Our study showed profiles of antifungal susceptibility with MIC data for several antifungal agents, which is particularly relevant in view of the recent taxonomic changes of the species of *Sporothrix*. In agreement with several studies, we demonstrated that TRB is the most effective antifungal against isolates of *Sporothrix*, presenting low MICs (GM of 0.279 µg / ml and 0.125 µg / ml for *S. brasiliensis* and *S. schenckii*, respectively) .13,17 , 25.26. In vivo studies support these findings.^{27,28} Chapman et al. (2004) reported a high efficacy of BTR in the treatment of cutaneous and lymphobutan sporotrichosis.²⁷ In contrast, Almeida-Paes et al. (2016) observed a terbinafine resistant *S. schenckii* isolate and attributed this resistance to melanin protection of the fungus wall.²⁹

ITC is another drug of choice for treating sporotrichosis, although its efficacy against strains of *Sporothrix* spp is still uncertain. In the current study, the ITR showed good in vitro antifungal activity similar to that reported in other reports^{18,19,30}. On the other hand, there appears to be a variation in antifungal activity according to species. Studies have reported high MIC values for ITC against *S. schenckii* 13,31 but with good activity against *S. brasiliensis* isolates. So far, there are no *breakpoints* for this fungus, however, document M38-A2 proposes, for analytical purposes, that filamentous fungi with MIC $\geq 4\mu\text{g} / \text{ml}$ for ITC are considered resistant.

AMB is one of the drugs of choice in the treatment of some clinical forms of sporotrichosis.¹⁵ In the present study, AMB had MIC variability from 0.125 to 8.00 µg / ml, as

previously reported.^{17,19,32} Primary resistance of some isolates from *Sporothrix* to AMB, leading to therapeutic failure in patients infected with these resistant strains³³.

We found a low antifungal activity of VRC against *Sporothrix* (GM > 16 µg / ml) for the mycelial phase of the isolates, as already demonstrated in the literature^{13,18,25,26,34}. The VRC show weak inhibitory activity against species of *Sporothrix*, with very high MICs. For voriconazole, GM ranged from 3.88 to 27.2 µg / ml, according to Marimon et al. (2008) and McGinnis et al. (2001)^{13,35}.

In common with our findings (GM = 30.34 µg / ml), FLC has shown little or no activity against *Sporothrix* sp. in vitro.^{18,31,32} Despite these results, fluconazole is still considered as an alternative treatment for lymphocutaneous sporotrichosis, with reports of good clinical response against fixed forms of infection in some Iranian patients³⁶.

The varied results in the literature and the disagreement of some results among the studies are probably due to differences in the genotypes of isolates¹⁹, variations in incubation time and temperature, modifications of the antifungal sensitivity testing protocols of the *S. schenckii* complex^{17,26,37}, the source (in the present study, exclusively human)³⁸ or even the geographical origin of the isolates¹⁸. It is important to note that before *S. Schenckii* was recognized as a complex, all the isolates studied were considered as a single species. This may also explain the disagreement between the results of different studies¹⁹.

Although yeasts are the infective forms of the *Sporothrix schenckii* complex in humans and animals, most studies have used the filamentous form of the fungus, probably due to increased nutritional requirements and challenges associated with the conversion of the growth phase.^{13,17, 39}.

To our knowledge, the present study was the first to genotypically identify the species of the *Sporothrix* complex in Northeast Brazil. The low efficacy of VRC and FLC and the wide variability of MICs for AMB point to a probable fungistatic role of this drug. The existence of strains or species within the *Sporothrix* complex with multiple drug resistance corroborates the need to monitor MIC values during treatment¹⁹.

In conclusion, the molecular identification of sporotrichosis agents in Pernambuco showed a predominant occurrence of *S. brasiliensis*. The increase in the efficiency of sporotrichosis transmission from felines is evident, as a result of the irrefutable prevalence of this species in the region. Knowing the high in vitro efficacy of TRB and ITC and the absence

of multiresistant isolates in the local outbreak can help in the choice of antifungal therapy in different groups of epidemiological risk, with potential impact on the clinical outcome.

Aknowledgements

The authors thank the Sequencing Platform of the Department of Genetics of UFPE for and the Laboratory of Medical Mycology of the Center of Biosciences of UFPE for the infrastructure to carry out the sensitivity tests.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

1. Orofino-Costa R, Rodrigues AM, de Macedo PM, Bernardes-Engemann AR. Sporotrichosis: An update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *An Bras Dermatol*. 2017. doi:10.1590/abd1806-4841.2017279
2. Montenegro H, Rodrigues AM, Dias MAG, da Silva EA, Bernardi F, de Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: An emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Vet Res*. 2014;10(1). doi:10.1186/s12917-014-0269-5
3. Barros MB de L, de Almeida Paes R, Schubach AO. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clin Microbiol Rev*. 2011. doi:10.1590/S0001-37652006000200009
4. Zhang Z, Liu X, Lv X, Lin J. Variation in Genotype and Higher Virulence of a Strain of *Sporothrix schenckii* Causing Disseminated Cutaneous Sporotrichosis. *Mycopathologia*. 2011;172(6):439-446. doi:10.1007/s11046-011-9441-7
5. Rodrigues AM, De Hoog GS, De Camargo ZP. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.01.004
6. Rodrigues AM, Cruz Choappa R, Fernandes GF, de Hoog GS, de Camargo ZP.

- Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol.* 2016;120(2):246-264. doi:10.1016/j.funbio.2015.05.006
7. Chakrabarti A, Bonifaz A, Gutierrez-Galhardo MC, Mochizuki T, Li S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Med Mycol.* 2014;53(1):3-14. doi:10.1093/mmy/myu062
 8. Zhang Y, Hagen F, Stielow B, et al. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia - Mol Phylogeny Evol Fungi.* 2015;35(1):1-20. doi:10.3767/003158515X687416
 9. Hernández-Chávez M, Pérez-García L, Niño-Vega G, Mora-Montes H. Fungal Strategies to Evade the Host Immune Recognition. *J Fungi.* 2017. doi:10.3390/jof3040051
 10. Alba-Fierro CA, Pérez-Torres A, Toriello C, Romo-Lozano Y, López-Romero E, Ruiz-Baca E. Molecular Components of the *Sporothrix schenckii* Complex that Induce Immune Response. *Curr Microbiol.* 2016;73(2):292-300. doi:10.1007/s00284-016-1045-5
 11. Conceição-Silva F, Morgado FN. Immunopathogenesis of Human Sporotrichosis: What We Already Know. 2018:22-32. doi:10.3390/jof4030089
 12. Almeida-Paes R, De Oliveira LC, Oliveira MME, Gutierrez-Galhardo MC, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the sporothrix complex. *Biomed Res Int.* 2015;2015. doi:10.1155/2015/212308
 13. Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. In vitro antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. doi:10.1128/AAC.01012-07
 14. Rodrigues AM, de Hoog GS, de Cássia Pires D, et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC Infect Dis.* 2014. doi:10.1186/1471-2334-14-219
 15. Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society

- of America. *Clin Infect Dis*. 2007. doi:10.1086/522765
16. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, et al. Susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol*. 2015. doi:10.1093/mmy/myu056
 17. Silveira CP, Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, et al. MICs and minimum fungicidal concentrations of amphotericin B, itraconazole, posaconazole and terbinafine in *Sporothrix schenckii*. *J Med Microbiol*. 2009. doi:10.1099/jmm.0.007609-0
 18. Stopiglia CDO, Magagnin CM, Castrill MR, et al. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *J Music Ther*. 2015;52(1):56-64. doi:10.3109/13693786.2013.818726
 19. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol*. 2016;54(6):593-599. doi:10.1093/mmy/myw006
 20. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980. doi:10.1007/BF01731581
 21. Suzuki R, Yikelamu A, Tanaka R, Igawa K, Yokozeki H, Yaguchi T. Studies in phylogeny, development of rapid identification methods, antifungal susceptibility, and growth rates of clinical strains of *Sporothrix schenckii* complex in Japan. *Japanese J Med Mycol*. 2016;57(3):E 47-E 57. doi:10.3314/mmj.16-00005
 22. Rodrigues AM, de Melo Teixeira M, de Hoog GS, et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013. doi:10.1371/journal.pntd.0002281
 23. Rodrigues AM, De Hoog S, De Camargo ZP. Emergence of pathogenicity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Med Mycol*. 2013;51(4):405-412. doi:10.3109/13693786.2012.719648
 24. Kano R, Okubo M, Siew HH, Kamata H, Hasegawa A. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. *Mycoses*. 2015. doi:10.1111/myc.12302
 25. Meinerz ARM, Nascente PDS, Schuch LFD, et al. In vitro susceptibility of isolates of

- Sporothrix schenckii* to terbinafine and itraconazole. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2007.
26. Galhardo MCG, De Oliveira RMZ, Do Valle ACF, et al. Molecular epidemiology and antifungal susceptibility patterns of *Sporothrix schenckii* isolates from a cat-transmitted epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Med Mycol*. 2008. doi:10.1080/13693780701742399
 27. Chapman SW, Pappas P, Kauffmann C, et al. Comparative evaluation of the efficacy and safety of two doses of terbinafine (500 and 1000 mg day⁻¹) in the treatment of cutaneous or lymphocutaneous sporotrichosis. *Mycoses*. 2004. doi:10.1046/j.1439-0507.2003.00953.x
 28. Heidrich D, Stopiglia CDO, Senter L, Vetoratto G, Valente P, Scroferneker ML. Successful treatment of terbinafine in a case of sporotrichosis. *An Bras Dermatol*. 2011.
 29. Almeida-Paes R, Figueiredo-Carvalho MHG, Brito-Santos F, Almeida-Silva F, Oliveira MME, Zancoppe-Oliveira RM. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0152796
 30. Reis RS, Almeida-Paes R, Muniz M de M, et al. Molecular characterisation of *Sporothrix schenckii* isolates from humans and cats involved in the sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009. doi:10.1590/S0074-02762009000500018
 31. OLIVEIRA DC, LORETO ÉS de, MARIO DAN, et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combines antifungal agenst and characterization of enzymatic profiles. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(4):289-294. doi:10.1590/S0036-46652015000400003
 32. Alvarado-Ramírez E, Torres-Rodríguez JM. In vitro susceptibility of *Sporothrix schenckii* to six antifungal agents determined using three different methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. doi:10.1128/AAC.01176-06
 33. Ellis D1. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2002;49(1):7-10.
 34. Mahmoudi S, Zaini F, Kordbacheh P, Safara M, Heidari M. *Sporothrix schenckii*

- complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Med Mycol.* 2016. doi:10.1093/mmy/myw006
35. McGinnis MR, Nordoff N, Li RK, Pasarell L, Warnock DW. Sporothrix schenckii sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Med Mycol.* 2001.
 36. Ghodsi, Shams, Naraghi, et al. Case report. An unusual case of cutaneous sporotrichosis and its response to weekly fluconazole. *Mycoses.* 2000. doi:10.1046/j.1439-0507.2000.00525.x
 37. Borba-Santos LP, Rodrigues AM, Gagini TB, et al. Susceptibility of Sporothrix brasiliensis isolates to amphotericin B, azoles, and terbinafine. *Med Mycol.* 2015. doi:10.1093/mmy/myu056
 38. Oliveira MME, Almeida-Paes R, Gutierrez-Galhardo MC, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of the sporothrix schenckii complex. *Rev Iberoam Micol.* 2014. doi:10.1016/j.riam.2013.09.008
 39. Oliveira MME, Maifrede SB, Ribeiro MA, Zancope-Oliveira RM. Molecular identification of Sporothrix species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013. doi:10.1590/0074-0276130239

Table 1. Results of Genotypic analysis by the partial sequencing of the CAL gene of 26 *Sporothrix* spp. Strains

STRAIN	HUMAN SOURCE	GENOTYPIC IDENTIFICATION
HCPE 48	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 53	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 54	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 63	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 103	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 111	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 112	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 113	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 148	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 170	Lymphocutaneous	<i>S. schenckii</i>
HCPE 178	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 180	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 195	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 227	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 289	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 313	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 314	Lymphocutaneous	<i>S. schenckii</i>
HCPE 340	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 355	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 356	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 358	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 360	Fixed cutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1027	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1028	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1030	Disseminated	<i>S. brasiliensis</i>
HCPE 1035	Lymphocutaneous	<i>S. brasiliensis</i>

Table 2. MIC values of six antifungal drugs against 26 strains of the *Sporothrix schenckii* Complex (24 of *S. brasiliensis* and two of *S. schenckii*).

		Antifungal Drugs					
		AMB	KTC	ITC	FLC	TRB	VRC
Species (n)		MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
<i>Sporothrix brasiliensis</i> (24)	Range GM	0,125-8 µg/mL 1,091	0,03-≥16 µg/mL 0,576	0,03-≥16 µg/mL 0,838	2-≥64 µg/mL 33,903	0,125-8 µg/mL 0,297	0,5-≥16 µg/mL 5,339
<i>S. schenckii</i> (2)	Range GM	0,25-2 µg/mL 0,707	0,06-1 µg/mL 0,245	0,03-0,06 µg/mL 0,043	1-≥64 µg/mL 8	0,125 µg/mL 0,125	0,5-≥16 µg/mL 2,828

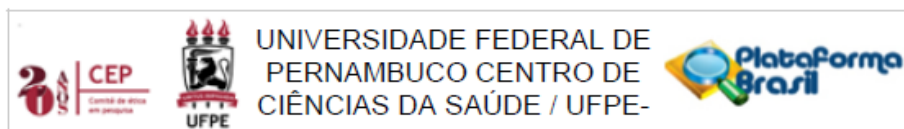
AMB: amphotericin B, KTC: ketoconazole, ITC: itraconazole, FLC: fluconazole, TRB: terbinafine, VRC: voriconazole, MIC: minimal inhibitory concentration; GM: geometric mean

Figure 1: Phylogenetic relationships of calmoduline-encoding gene among clinical samples of *Sporothrix*. The high bootstrap values supports the formed clades



ANEXOS

ANEXO A – PARECER COSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Esporotricose humana em Pernambuco: Caracterização clínica e epidemiológica, identificação das espécies do complexo *Sporothrix* e Susceptibilidade antifúngica in vitro

Pesquisador: CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71105617.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.199.609

Apresentação do Projeto:

O projeto se refere a uma pesquisa de doutorado vinculada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Tropical. Tem como pesquisador principal a doutoranda Cláudia Elise Ferraz Silva orientada pela Profa. Vera Magalhães da Silveira e Co-orientada pelo Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto. Será desenvolvida na Clínica Dermatológica do Hospital das Clínicas com pacientes que apresentarem clínica sugestiva da doença em estudo e desse modo, responder a questões epidemiológicas ainda desconhecidas.

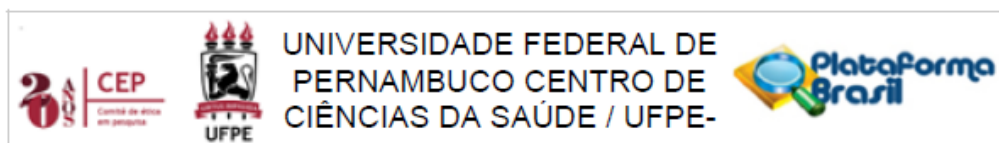
Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar características clínicas, epidemiológicas e de sensibilidade antifúngica entre as espécies do complexo *S. schenckii* isoladas de casos humanos de esporotricose em Pernambuco, no período de setembro de 2017 a março de 2018.

- Descrever características clínicas (forma clínica, sítio da lesão primária, tempo de doença, condições imunossupressoras de base) e epidemiológicas (procedência, história de contato com gatos doentes ou com material orgânico rural) dos pacientes com esporotricose.
- Descrever as características histopatológicas das lesões de esporotricose.
- Descrever achados dos testes diagnósticos: exame direto por escarificação e cultura micológica

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2128-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.199.609

de exsudato e de fragmento do tecido.

- Identificar as espécies do complexo *Sporothrixschneckii* isolados de pacientes com esporotricose, baseado nas características morfológicas, fisiológicas e por PCR
- sequenciamento do gene da calmodulina (CAL). Determinar o perfil de sensibilidade antifúngica (concentração inibitória mínima – MIC) para cetoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, iodeto de potássio, terbinafina e anfotericina B nas fases leveduriforme e filamentosa das espécies de *Sporothrix* envolvidas com os casos de esporotricose humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O paciente poderá se sentir constrangido em prestar informações quanto à sua doença e ao ser fotografado. Como forma de minimizar o possível constrangimento, o atendimento será realizado de forma individual e em ambiente reservado. Os dados pessoais e de identificação do paciente serão conhecidos apenas pela equipe de estudo e guardados em sigilo. As lesões serão fotografadas de forma que não possibilite a sua identificação. Estas serão arquivadas em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora. Quanto à da biópsia de pele que será realizada, esta é necessária para o diagnóstico desta doença, mesmo em circunstâncias assistenciais. A técnica de biópsia pode deixar uma cicatriz, geralmente discreta, na área acometida.

Benefícios:

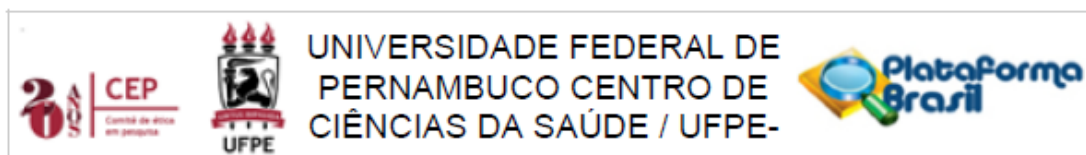
Benefícios diretos: incluem o acesso à investigação diagnóstica da doença, contribuindo para a definição e o tratamento específico de cada paciente. Todos os pacientes serão acompanhados em ambulatório até a conclusão do tratamento de suas doenças dermatológicas, incluindo aqueles que não confirmarem o diagnóstico de esporotricose.

Benefícios indiretos, os resultados desta pesquisa fornecerão informações valiosas sobre o padrão epidemiológico local da doença, sobre agentes etiológicos envolvidos e suas manifestações clínicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata de estudo transversal de abordagem quantitativa envolvendo pacientes com suspeita de esporotricose atendidos no ambulatório especializado de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE. Os dados obtidos serão processados para comparar características epidemiológicas (sexo, idade, ocupação, exposição a gatos, contato com terra/jardinagem) e clínicas (tempo de doença,

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.199.609

sítio anatômico acometido, forma clínica, reação de hipersensibilidade, condições de imunossupressão) entre as espécies isoladas dos pacientes com esporotricose humana através de análise multivariada. Serão descritas características gerais da amostra, padrões de susceptibilidade antifúngica entre as espécies e formas clínicas. Os pacientes serão examinados, fotografados e responderão questionário clínico-epidemiológico, o qual contém o registro do paciente, dados epidemiológicos, dados clínicos, tratamento e exames complementares (conforme ficha anexada em anexo no projeto apresentado). Apenas serão incluídos na pesquisa, pacientes com diagnóstico de esporotricose, maiores de 18 anos. Contudo, pacientes gestantes ou lactantes serão excluídos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados, contudo o TCLE deve ser corrigido indicando que a amostra clínica, além de enviada para o laboratório de patologia, também será enviada para laboratório de micologia médica. Ainda, alterar a ordem da orientação colocando o nome da orientadora antes do co-orientador.

Recomendações:

No TCLE, alterar a ordem da orientação colocando o nome da orientadora antes do co-orientador e indicar que a amostra clínica, além de enviada para o laboratório de patologia, também será enviada para laboratório de micologia médica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

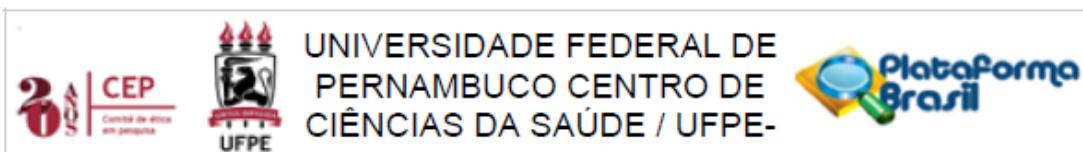
Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-800
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.199.609

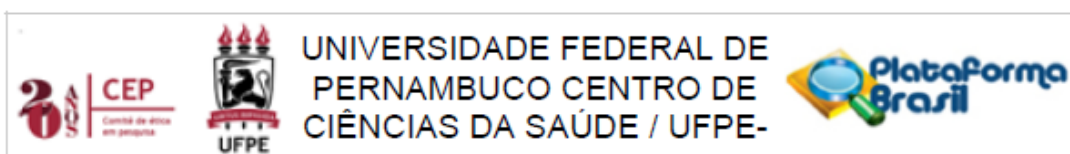
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_916453.pdf	12/07/2017 02:38:13		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOESPOROTRICOSECEP.docx	12/07/2017 02:33:14	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	Declaracaomatriculadoutorado.pdf	11/07/2017 23:50:32	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	Termodecompromissoeconfidencialidade.pdf	11/07/2017 23:49:58	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	CurriculoCoorientadorReginaldo.pdf	11/07/2017 23:49:17	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	CurriculolattesOrientadoraVERA.pdf	11/07/2017 23:48:41	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	CurriculoClaudia.pdf	11/07/2017 23:48:12	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	11/07/2017 23:46:41	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	AnuenciaDermato.pdf	19/06/2017 23:31:02	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
Outros	AnuenciaMicologia.pdf	19/06/2017 23:30:37	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEEsportricose.docx	19/06/2017 23:03:19	CLAUDIA ELISE FERRAZ SILVA	Aceito

Situação do Parecer:

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-800
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.199.609

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 03 de Agosto de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
 (Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepcos@ufpe.br