



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

GISELLE DA SILVA BARBOSA

**ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO, SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA E
EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE**

Recife

2020

GISELLE DA SILVA BARBOSA

**ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO, SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA E
EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Barbosa, Giselle da Silva

Estratégia de diagnóstico, suscetibilidade antifúngica e epidemiologia da esporotricose / Giselle da Silva Barbosa - 2020.

62 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Oliane Maria Correia Magalhães

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Esporotricose 2. Diagnóstico precoce 3. Epidemiologia
I. Magalhães, Oliane Maria Correia (Orientadora) II. Título

618.9 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-010

GISELLE DA SILVA BARBOSA

**ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO, SUSCETIBILIDADE ANTIFÚNGICA E
EPIDEMIOLOGIA DA ESPOROTRICOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Aprovada em: 17/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Oliane Maria Correia Magalhães (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Dra. Rejane Pereira Neves (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Armando Marsden Lacerda Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação até aqui, este trabalho foi fruto do apoio, incentivo e torcida de todos.

A querida e excelente Professora Oliane, pela oportunidade, paciência, orientação e por me fazer evoluir tanto nesse período.

Aos professores do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, por todos os ensinamentos sobre os fungos, em especial aos do Laboratório de Micologia Médica: Dra. Rejane Neves, e Dr. Armando Marsden e Dr. Reginaldo Gonçalves.

Ao Professor Dr. Rinaldo Mota, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ceder culturas fúngicas de felinos.

Aos companheiros de laboratório que estiveram sempre à disposição, ajudando e sanando dúvidas em relação aos experimentos, especialmente, Jucieli e Bruna.

Aos diversos educadores que passaram, e continuam, na minha vida até hoje Professores Ailton, Hugo e Fernanda que sempre me incentivaram a ir mais longe, e graças a isso hoje eu sonho mais alto.

Aos meus pais, Osvaldina e José, que e com muito carinho e apoio me incentivaram todos esses anos de vida acadêmica. E aos outros familiares, irmãos e sobrinhos, que sempre confiaram em mim e estiveram disponíveis quando precisei.

Aos amigos da turma de mestrado, técnicos e demais colegas do Departamento de Micologia pelo companheirismo, risadas, carinho, e amizade, que foram essenciais na caminhada nesta cidade.

“De olhos abertos para o telhado, pensa na sua ida para Belém.
Seu grande sonho é ir para Belém, estudar”
(JURANDIR, 1991, p. 84).

RESUMO

Membros do complexo *S. schenckii* são agentes etiológicos da esporotricose. Devido a transmissão zoonótica tem sido mais frequente no ambiente urbano. Em Pernambuco, a secretaria de saúde incluiu esta micose como doença de notificação compulsória estadual. O diagnóstico precoce e a correta identificação dos agentes etiológicos é de extrema relevância para melhor prognóstico e direcionamento terapêutico. Conhecer tendências epidemiológicas da esporotricose permite o desenvolvimento de políticas públicas relacionadas à esporotricose humana e animal. Os objetivos deste trabalho foram diagnosticar e identificar com abordagem fenotípica e genotípica os agentes da esporotricose no Estado de Pernambuco, bem como determinar as melhores abordagens terapêuticas para tratamento da doença e traçar o perfil epidemiológico dos pacientes com esporotricose humana. As amostras clínicas humanas foram coletadas e obtidas de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos e no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas, ambos da UFPE, 08/2018 a 07/2019, e culturas fúngicas de felinos atendidos no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos da UFRPE. O diagnóstico foi realizado através do exame direto e obtenção do agente etiológico em cultura. A caracterização fenotípica foi baseada nas características morfofisiológicas e genotípica utilizando primers espécie-específico. A sensibilidade antifúngica seguiu as recomendações descritas no documento M38-A2 do CLSI (2008) e os dados epidemiológicos obtidos a partir de informações diretamente dos pacientes e consulta do livro de registros. De 138 pacientes suspeitos de esporotricose, 96 tiveram diagnóstico conclusivo através da obtenção do agente; destes, 40 culturas foram isoladas para realização dos testes de identificação fenotípica, ensaios moleculares e sensibilidade, e 10 culturas de *Sporothrix* sp. de felinos foram adicionadas. A caracterização fenotípica identificou todos os isolados como *S. schenckii*, divergindo da genotípica onde todos os 50 isolados pertencem a *S. brasiliensis*. Os testes de suscetibilidade mostraram que itraconazol e terbinafina são os fármacos mais adequadas na terapêutica desta micose. A esporotricose em Pernambuco atinge mais pessoas do sexo feminino, não há distinção quanto à profissão nem idade. O elevado número de casos na cidade de Recife, região Metropolitana e Grande Recife representa um alerta as autoridades de Saúde Pública do Estado de Pernambuco.

Palavras-chave: Surto. Doença-negligenciada. Pernambuco.

ABSTRACT

Members of the *S. schenkii* complex are etiological agents of sporotrichosis. Due to zoonotic transmission, new reports on urban areas have been more frequent. In Pernambuco, the *Secretaria de Saúde* added this mycosis as a disease of compulsory notification to the state. The early diagnosis and the exact identification of the etiological agents are highly relevant for a better prognosis and therapeutic direction. Knowing epidemiological tendencies of sporotrichosis allows the developments of public policies related to human and animal sporotrichosis. The aims of this study were to diagnose and identify the agents of sporotrichosis in Pernambuco state using a phenotypic and genotypic approach, as well as, to determine better therapeutic approaches to treat the disease and to trace the epidemiological profile of patients with human sporotrichosis. The human clinical samples were collected and obtained from patients treated at the Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos and Serviço de Dermatologia of Hospital das Clínicas, both at UFPE, 08/2018 to 07/2019, and fungal culture of cats treated at Laboratório de Doenças Infecção-contagiosas dos Animais Domésticos at UFRPE. The diagnosis was carried by direct examination and the etiological agents were cultured. The phenotypic characterization was based on morphological and genotypical features using species-specific primers. The antifungal susceptibility testing followed the recommendations described in M38-A2 document by CSLI (2008), the epidemiological data was obtained based from patients information, and consulting the medical charts. From 138 patients suspected of sporotrichosis, only 96 had a conclusive diagnose by direct examination; of these, 40 culture were isolated for phenotypic identification, molecular assays and susceptibility tests, and 10 cultures of *Sporothrix* sp. of cats were added as well. By phenotypic characterization all the samples were identified as *S. schenckii*, diverging from the genotypical characterization where all the 50 samples were identified as *S. brasiliensis*. The susceptibility test indicated that Itraconazole and Terbinafine are the indicated drugs to treat this mycosis. Sporotrichosis in Pernambuco affected more women, and there's no profession or age distinction. The high number of cases in the city of Recife, Metropolitan Region and Greater Recife represents a warning to the Public Health authorities of the state of Pernambuco.

Keywords: Outbreak. Disease-neglected. Pernambuco.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Imagens de lesões atípicas de pacientes confirmados para esporotricose.....	36
Figura 2 -	Microscopia direta de amostras biológicas observando células leveduriformes, coradas por Panótico Rápido (1000x), compatíveis as do complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	37
Figura 3 -	Cultura de amostras biológicas em pontos equidistantes, evidenciando crescimento de colônia de fungo filamentoso, em Ágar Sabouraud a 28° C.....	38
Figura 4 -	Micromorfologia de Cultura evidenciando conídios com disposição floral semelhante a “margarida características do fungo do gênero <i>Sporothrix</i> , coradas com Lactofenol Azul de Algodão(400x).....	38
Figura 5 -	Testes para medir diâmetro da colônia (esquerda) e termotolerância (direita).....	40
Figura 6 -	Testes para verificação da morfologia dos conídios.....	41
Figura 7 -	Amostras de <i>Sporothrix</i> submetidas a PCR espécie-específica com primers para <i>S. brasiliensis</i>	41
Figura 8 -	Amostras de <i>Sporothrix</i> submetidas a PCR espécie-específica com primers para <i>S. brasiliensis</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>S. mexicana</i> , <i>S. globosa</i> , e <i>S. pallida</i>	41
Figura 9 -	Árvore filogenética com o gene Calmodulina.....	42
Figura 10 -	Taxa de incidência da esporotricose de municípios do estado de Pernambuco.....	46
Figura 11 -	Bairros da cidade de Recife com caso(s) confirmado(s) para esporotricose.....	48
Gráfico 1 -	Números de casos notificados e positivos de 2016 a novembro/2019 em Pernambuco.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Drogas avaliadas in vitro para espécies de <i>Sporothrix</i> (Garcia-Canero et al., 2018).....	28
Tabela 2 -	Chave de identificação fenotípica de espécies do complexo <i>Sporothrix schenckii</i> proposta por Marimon et al. (2007).....	31
Tabela 3 -	Resultados dos testes de identificação fenotípica.....	39
Tabela 4 -	CIMs dos antifúngicos testados frente a 50 isolados de <i>S. brasiliensis</i> ...	43
Tabela 5 -	Resumo dos dados epidemiológicos de pacientes positivos para esporotricose.....	44
Tabela 6 -	Taxa de incidência dos casos de esporotricose humana em Pernambuco, segundo município de residência dos pacientes.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
BDA	Ágar Batata Dextrose
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAL	Calmodulina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI C	clinical Laboratory Standards Institute
CTAB	Cetyl Trimetyl Ammonium Bromide
CTZ	Cetoconazol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ED	Exame Direto
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
FCZ	Fluconazol
HD	Hipótese Diagnóstico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ITC	Itraconazol
KI	Iodeto de Potássio
MOPS	3-[N-morfolino] propano-ácido sulfônico
MALDI-TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization-Time of Flight
mtDNA	DNA mitocondrial
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polimerase Chain Reaction
PCZ	Posaconazol
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
TA	Temperatura Ambiente
TAE	Tris/Borato/EDTA
TBF	Terbinafina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
URM	University of Recife Mycology
VCZ	Voriconazol
YNB	Yeast Nitrogen Base

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.2	OBJETIVOS.....	15
1.2.1	Objetivo Geral.....	15
1.2.2	Objetivos Específicos.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	COMPLEXO <i>Sporothrix schenckii</i>	16
2.2	BREVE HISTÓRICO DA ESPOROTRICOSE.....	17
2.3	PATOGÊNSE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS.....	19
2.4	DIAGNÓSTICO.....	21
2.4.1	Exame Direto.....	22
2.4.2	Cultura.....	22
2.4.3	Testes Moleculares.....	23
2.4.4	Outros Testes para Diagnóstico.....	24
2.5	TRATAMENTO E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	25
2.6	EPIDEMIOLOGIA.....	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	30
3.2	DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	30
3.3	OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS.....	30
3.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL: EXAME DIRETO E CULTURA.....	30
3.5	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA.....	31
3.5.1	Morfologia e Termotolerância.....	32
3.5.2	Auxonograma.....	32
3.6	IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA.....	32
3.6.1	Extração de DNA.....	32
3.6.2	PCR com Primer Espécie-Específico.....	33
3.6.3	Análises Filogenéticas.....	34
3.7	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i>	34

3.8	ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO.....	36
4.2	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	37
4.3	OBTENÇÃO DOS ISOLADOS.....	38
4.4	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA.....	39
4.5	SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.....	42
4.6	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	43
5	CONCLUSÕES.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXO A – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	59

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Sporothrix* Hektoen & C.F. Perkins, fungo termodimórfico, incluído no filo Ascomycota (WIJAYAWARDENE et al., 2017), é formado por aproximadamente 51 espécies, sendo em sua maioria representadas por fungos encontrados em madeira, plantas e solo. Os membros do complexo *S. schenckii*, incluindo *S. brasiliensis*, *S. schenckii* stricto sensu, *S. globosa* e *S. luriei*, na fase anamórfica, são agentes etiológicos da esporotricose tanto no homem quanto em outros animais (RODRIGUES et al., 2013).

A esporotricose é uma micose usualmente benigna e restrita à pele e ao tecido subcutâneo; entretanto, formas disseminadas podem ocorrer, sobretudo, em imunocomprometidos. É considerada a micose subcutânea mais frequente em países de clima quente e úmido, e a transmissão clássica ocorre por inoculação traumática com esporos do fungo *Sporothrix* em seu habitat (FALCÃO et al., 2019). Porém, especialmente no Brasil têm sido descritos casos de transmissão zoonótica (gato-humano) associada a arranhões ou mordeduras de felinos infectados (BONIFAZ & TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

A transmissão zoonótica provocou nos últimos anos uma mudança no perfil epidemiológico da esporotricose, a qual tem sido mais frequente no ambiente urbano (BIMBI & BRZEZINSKI, 2017), por consequente o aumento do número de casos em gatos é seguido por um maior número de casos humanos, tornando esta micose um grave problema de saúde pública (RODRIGUES et al., 2013). A transmissão zoonótica constatada especialmente em Pernambuco, conduziram a atenção e atuação de políticas públicas voltadas a assistência a saúde e incluíram esta micose como doença de notificação compulsória no estado de Pernambuco (PERNAMBUCO, 2016).

A surto em Pernambuco requer diagnóstico precoce, bem como a correta identificação dos agentes etiológicos é de extrema relevância tanto para melhor prognóstico e direcionamento terapêutico dos pacientes, quanto para fins de vigilância epidemiológica, possibilitando a implementação adequada de políticas de saúde pública (RODRIGUES et al., 2015a).

O padrão ouro para diagnóstico laboratorial da esporotricose em humanos é baseado na obtenção do agente etiológico em cultura. Visto que, no exame direto as estruturas fúngicas são difíceis de serem detectadas, devido a pouca quantidade de células (BARROS et al., 2011).

A identificação do agente etiológico baseada apenas com os critérios estabelecidos na taxonomia clássica fenotípica, não é possível definir uma precisa identificação das espécies do

complexo *S. schenckii*, além de que o tempo decorrido para o fungo crescer em cultura é geralmente longo e o processo de identificação fenotípica pode atrasar ainda mais o diagnóstico (RUDRAMURTHY & CHAKRABARTI, 2017). Com a utilização da abordagem genotípica é possível à rápida identificação da espécie, para isso foi demonstrado que o gene calmodulina é um bom marcador para reconhecimento de espécies do gênero *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007, RODRIGUES et al., 2015b).

Além do diagnóstico preciso e precoce, uma terapêutica adequada é primordial para um bom prognóstico. Na maioria dos casos o tratamento é realizado com itraconazol, terbinafina ou iodeto de potássio, e a anfotericina B usualmente é recomendada em casos de infecções graves (Kauffman et al., 2007). Testes de suscetibilidade são realizados para nortear o tratamento, e para *S. schenckii lato sensu* na fase micelial há descrição do teste no documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), porém não são definidos valores que definem a resistência da cepa (níveis *cutoff*).

Trabalhos relacionados à epidemiologia da esporotricose humana em Pernambuco são escassos na literatura, havendo apenas um disponível que aborda casos da doença em felinos (SILVA et al., 2018).

Diante do exposto, conhecer tendências epidemiológicas da esporotricose, assim como o perfil de suscetibilidade, a fim de identificar possíveis cepas resistentes aos antifúngicos é de grande importância para estabelecer a correta terapia, e desenvolvimento de políticas públicas relacionadas à esporotricose humana e animal (GREMIÃO et al., 2017).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Realizar identificação mais eficiente de agentes causadores da esporotricose no Estado de Pernambuco, bem como determinar as melhores abordagens terapêuticas para tratamento da doença e traçar o perfil epidemiológico dos pacientes com esporotricose humana.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o diagnóstico micológico a partir de exame direto e obtenção do agente etiológico em cultura em amostras clínicas de humanos;
- Identificar os agentes etiológicos através de ferramenta polifásica (fenotípica e genotípica);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos isolados do complexo *S. shenckii* frente aos antifúngicos comercialmente disponíveis;
- Traçar dados epidemiológicos da esporotricose em Pernambuco;
- Estudar a distribuição geográfica da esporotricose humana em Pernambuco;
- Depositar os fungos identificados na Micoteca URM.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

O gênero *Sporothrix* Hektoen e Perkins contém mais de 50 espécies (ZHANG et al., 2019), pertence ao Reino Fungi, Subreino Dikarya, Filo Ascomycota, Subfilo Pezizomycotina, Classe Sordariomycetes, Subclasse Sordariomycetidae, Ordem Ophiostomatales, Família Ophiostomataceae (MYCOBANK, 2019).

Sporothrix foi descrito por Hektoen e Perkins em 1900, que isolaram o fungo do dedo de um menino americano, e descreveram como *S. schenckii*, epíteto originado do nome de B.R. Schenck, o qual descreveu um fungo semelhante isolado de feridas infectadas em um homem adulto, em 1898, porém foi identificado como *Sporotrichum* Link (SCHENCK, 1898). Entretanto, o gênero foi considerado inválido pela maioria dos trabalhos subsequentes que se referiram ao fungo como *Sporotrichum* (CARMICHAEL, 1962).

Observações morfológicas descritas por Carmichael, em 1962, confirmou a nomenclatura do fungo causador da esporotricose como *Sporothrix schenckii*, após verificar diferenças significativas na esporulação dos conídios desta espécie comparada as do gênero *Sporotrichum* (CARMICHAEL, 1962).

Patógenos humanos e de outros animais do gênero *Sporothrix*, podem ser encontrados no solo, madeira em decomposição, e em corpos de frutificação de basidiomicetos (DE BEER et al. 2016).

Estudos filogenéticos com *S. schenckii*, baseados em análises fenotípica e genotípica, demonstraram que esta espécie constituiu um complexo de espécies com distribuições geográficas diferentes (MARIMON et al., 2007). Estes autores relataram que *S. albicans*, *S. inflata* e *S. schenckii* var. *luriei* representam espécies diferentes de *S. schenckii stricto sensu*; além disso propuseram que as novas espécies *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* integravam o complexo *S. schenckii*. Porém, em estudo posterior foi observado que *S. schenckii* var. *luriei* apresenta diferenças das do complexo *S. schenckii* e propuseram que esta variedade fosse elevada a categoria taxonômica de espécie *S. luriei* (MARIMON et al., 2008).

Espécies de *Sporothrix* foram consideradas como anarmorfos de *Ophiostoma* spp.; porém, em 2016, De Beer et al., ao realizar pesquisas sobre relação filogenética entre *Ophiostoma* e *Sporothrix* confirmaram que estruturas assexuais do tipo *Sporothrix* não constituem uma linhagem monofilética de *Ophiostomatales*; agrupando-se em uma linhagem bem suportada do gênero *Sporothrix*, distinguindo-se de *Ophiostoma s. str.*

De Beer et al. (2016) também indicaram a presença de seis complexos para o gênero, com o clado patogênico sendo formado por: *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. schenckii*. Enquanto, que três espécies do complexo *S. pallida* (*S. mexicana*, *S. chilensis*, *S. pallida*) são citadas como patógenos oportunistas, sendo raros agentes de doenças em humanos.

Espécies de *Sporothrix schenckii lato sensu* são termodimórficas, ou seja, vivem na natureza (25°C) na forma filamentosa, e como patógenos exibem a fase leveduriforme (37°C ou em tecidos vivos) (LACAZ et al., 2002). A temperatura ótima de crescimento para as espécies está entre 20°C a 30°C, não havendo crescimento *in vitro* a 40°C (MARIMON et al., 2007).

Quanto a distribuição geográfica, *S. brasiliensis* é restrita ao Brasil, assim como *S. mexicana* ao México, enquanto que *S. globosa* e *S. schenckii stricto sensu* sendo amplamente distribuídas no mundo, *S. globosa* ocorrendo principalmente na Ásia; e *S. schenckii stricto sensu* no continente americano (MARIMON et al., 2007; CHAKRABARTI et al., 2015).

2.2 BREVE HISTÓRICO DA ESPOROTRICOSE

O primeiro caso descrito do agente etiológico da esporotricose foi relatado em 1898, o qual foi identificado pelo micologista Erwin Frink Smith como um fungo pertencente ao gênero *Sporotrichum*, o qual foi isolado pelo médico Benjamin Robinson Schenck, no Johns Hopkins Hospital em Baltimore-EUA, de nódulos ulcerados nos dedos e antebraço de uma paciente adulta de 36 anos (SCHENCK, 1898; TÉLLEZ et al., 2014).

Também nos Estados Unidos, o segundo caso suspeito foi observado por Hektoen e Perkins, em 1900, em uma criança do sexo masculino que apresentava uma lesão no dedo, que regrediu espontaneamente, sendo o agente etiológico denominado de *Sporothrix schenckii* (HEKTON & PERKINS, 1900).

No Brasil Adolf Lutz e Alfonso Splendore, em 1907, mencionaram pela primeira vez a possibilidade de cultivo de *S. schenckii* em sua fase leveduriformes *in vitro*, e a infecção natural destes patógenos em ratos (LUTZ & SPLENDORE, 1907). Após anos, foi sugerido que as infecções naturais nestes roedores são resultados de mordeduras, pelas quais o agente etiológico é inoculado nos tecidos (PUPO, 1917).

Em 1912, Terra e Rabelo descreveram o primeiro caso de esporotricose no Brasil, no estado do Rio de Janeiro e, desde então, casos isolados são descritos em várias regiões do país (DONADEL et al., 1993).

Tradicionalmente a doença ocorre na forma de surtos epidêmicos (LARSSON, 2011). Em Witwatersrand, uma cadeia de montanhas sul-africanas, um surto de esporotricose em trabalhadores de minas de ouro foi registrado entre os anos de 1938 e 1947, chegando a aproximadamente 3300 mineiros doentes. Traumas na pele por lascas de madeira das vigas de sustentação, provavelmente, representam a penetração do propágulo fúngico (LURIE, 1963; GOVENDER et al., 2015).

Nos Estados Unidos, em 1988, foram registrados 84 casos de esporotricose em 15 estados diferentes; o surto ocorreu em trabalhadores que estiveram em contato com palha, adquirido de um mesmo distribuidor (DIXON et al., 1991).

A Europa não é um continente frequentemente afetado, embora tenha ocorrido, na França, no início do século XX, um grande surto (RIPPON, 1988). Depois desse episódio houve uma diminuição no número de casos (CHAKRABARTI et al., 2015).

No Peru, entre os anos de 1985 e 2012, Ramírez-Soto (2015), contabilizou um total de 1503 casos, destacando a província de Abancay com maior número de ocorrências (88%).

Nas últimas décadas outros países também diagnosticaram casos de esporotricose humana como: Itália (CRISEO et al., 2008), Índia (VERMA et al., 2012), China (SONG et al., 2013), Austrália (DHINGRA et al., 2015), Venezuela (CAMACHO et al., 2015), Colômbia (RUBIO et al., 2010) e Uruguai (CIVILA et al., 2004).

Além de humanos, a doença acomete também felinos, caninos, equinos, primatas, bovinos, camelínos, murinos, caprinos, suínos, aves, artrópodes, tatus e golfinhos e podem ser fonte de infecção ao homem (LARSSON, 2011).

A esporotricose é uma micose subcutânea que tem se tornado um problema de saúde pública nos últimos anos na América do Sul, principalmente no Brasil, onde, desde 1998, é relatada uma hiperendemia de esporotricose no Estado do Rio de Janeiro, em consequência de transmissão zoonótica por gatos (BARROS et al., 2001). *S. brasiliensis* destaca-se como a mais comumente relacionada à esporotricose felina (CHAKRABARTI et al., 2015). No ano de 2006, foi também demonstrada a presença da doença em cachorros de rua nesta mesma cidade, revelando seu papel na transmissão zoonótica (SCHUBACH et al., 2006).

Em levantamento realizado por Barros et al. (2010) entre 1998 e 2009 foram descritos aproximadamente 2200 casos humanos e 3244 felinos com esporotricose diagnosticados no

Estado Rio de Janeiro, sendo considerada, a partir de então, endêmica da região metropolitana no município do Rio de Janeiro.

Em Pernambuco casos esporádicos de esporotricose animal e humana são encontrados na literatura (LACERDA-FILHO et al., 2019; SILVA et al., 2018; ARAÚJO & LEAL, 2016), e no ano de 2015 a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco incluiu esta micose na lista de doenças de notificação compulsória, estabelecido na Portaria SES/PE Nº 279 de 23/07/2015.

Além deste estado a esporotricose é de notificação compulsória no Rio de Janeiro, Paraíba e municípios de Guarulhos (São Paulo), Camaçari (Bahia) e Conselheiro Lafaiete (Minas Gerais).

2.3 PATOGÊNESE E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os fatores de virulência de *Sporothrix* spp. estão relacionados a termotolerância, atividade proteolítica, produção de urease, adesinas, peróxido de ergosterol e melanina (FREITAS et al. 2015), e *S. brasiliensis* como a espécie mais virulenta (ARRILLAGA-MONCRIEFF et al. 2009) e com evidências de que sua virulência pode ser crescente *in vivo* (FREITAS et al. 2015a), com capacidade de disseminação para o sistema nervoso central (DELLA TERRA et al. 2017). Ainda, Gremião et al (2017) sugerem que um aumento na virulência de *S. brasiliensis* pode ser um fator que contribui para o surto de esporotricose no Rio de Janeiro.

Em estudo realizado por Rossato et al. (2018) foi feita uma comparação genômica e proteômica expressada de espécies do complexo *S. schenckii*, e encontram 60 proteínas expressas exclusivamente em *S. brasiliensis*, algumas das quais possuem papel importante na virulência de outros fungos.

A transmissão clássica é caracterizada pela inoculação traumática do fungo que vive no solo, nas plantas e em materiais em decomposição; em casos raros podem ocorrer também por inalação dos conídios, levando a formas pulmonares ou disseminadas (KAUFFMAN et al., 2007), e no Brasil ganha destaque por ser geralmente transmitida por arranhões e mordeduras de gatos, e é sugerido que a propagação de estruturas leveduriformes por felinos seja tão intensa que nenhum trauma seja detectado (BONIFAZ E TIRADO-SÁNCHEZ, 2017).

Devido ao dimorfismo de *Sporothrix* spp. não são apenas as células leveduriformes que podem ser transmitidas na forma zoonótica, mas também as hifas podem estar presente no ambiente e ser transmitidas por arranhões de gato (FERREIRA et al., 2019).

O período de incubação depende do tamanho do inóculo; para casos cutâneos, é relatado um tempo médio de incubação de três semanas (BONIFAZ E TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Após inoculação, a extensão da doença depende do estado de imunidade do hospedeiro (KAUFFMAN, 1999).

Quando no tecido ou órgão alvo os conídios do fungo se converte na forma leveduriforme e pode induzir uma reação granulomatosa supurativa, onde ocorrem nódulos, úlceras e placas verrucosas com ou sem disseminação linfática em pacientes com imunidade normal (BARROS et al., 2011).

Estudo realizado por Figueiredo et al (2004) buscando entender a interação entre *S. schenckii lato sensu* e células endoteliais da veia umbilical humana, confirmaram que as células leveduriformes aderem e são fagocitadas pelas células endoteliais, além disso sugeriram a possibilidade de atuação do endotélio como reservatório de estruturas leveduriformes do fungo.

Orofino-Costa et al. (2017) constataram que o fungo possui componentes na parede celular que levam a proteção do hospedeiro contra o patógeno, e da mesma forma aumentam o potencial invasivo do mesmo, por meio da adesão dos conídios ao epitélio.

O maior número de casos relatados de esporotricose envolve a pele e tecidos subcutâneos, mas esporadicamente pode ocorrer disseminação osteoarticulares e vísceras, geralmente em pacientes com histórico de alcoolismo ou imunossuprimidos, particularmente com AIDS (KAUFFMAN et al., 2007).

Devido à epidemia zoonótica no Rio de Janeiro, vem ocorrendo formas clínicas atípicas de esporotricose, assim, Orofino-Costa et al. (2017) propõem a seguinte classificação: a) Cutânea (linfocutânea, cutâneo fixa, inoculação múltipla); b) Membrana mucosa (Ocular, nasal, outros); c) Sistêmica (ostearticular, cutâneo disseminada, pulmonar, neurológica, outros locais/sepsis); d) Imunorreativa (Eritema nodoso, Eritema multiforme, Síndrome de Sweet, Artrite reativa), e) Regressão espontânea.

Na forma linfocutânea, manifestação mais comum da esporotricose, no local de inoculação do fungo, entre duas a quatro semanas, surge uma lesão papulonodular, em seguida pode ocorrer a ulceração e fistula liberando uma secreção purulenta; após algumas semanas os nódulos progridem ao longo do sistema canais linfáticos regionais, esses mesmos nódulos também podem ulcerar, fistular e curar (LOPES-BEZERRA 2006). As formas cutâneas localizadas de evolução benigna predominam (FREITAS et al., 2014), consistem em lesão única, no ponto de inoculação, sem disseminação linfática regional. A lesão pode aparecer localizada em áreas expostas no local da inoculação, como úlceras, lesões

eritematosas-escamosas, papulopustulares, vegetativas, infiltrada em placas ou tuberosa (LOPES-BEZERRA 2006; BARROS et al., 2011; OROFINO-COSTA et al., 2017). Quando sucede múltiplos traumas, pacientes apresentam lesões cutâneas múltiplas surgindo ao mesmo tempo, pacientes que geralmente são indivíduos imunocompetentes (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Qualquer membrana mucosa pode ser afetada pela esporotricose, mas a mucosa ocular é mais comumente envolvida (OROFINO-COSTA et al., 2017). Na nasal, as lesões comumente comprometem o septo; e o desenvolvimento dessa forma clínica pode ser favorecido com contato próximo de felinos doentes (BARROS et al., 2011). Outras mucosas igualmente atingidas podem ser as do palato, faringe e traqueia (FONTES et al., 2007).

O tecido ósseo é o mais afetado depois do cutâneo (BARROS et al., 2011), com ossos e as articulações envolvidos, devido a trauma direto, pela invasão de lesão cutânea sobrejacente preexistente ou disseminação hematogênica secundária (OROFINO-COSTA et al., 2017). Esta condição pode torna-se grave quando ocorre envolvimento de múltiplos órgãos (LOPES-BEZERRA et al., 2006).

Os pulmões pela inalação dos propágulos do fungo e o sistema nervoso central representam formas graves da doença (OROFINO-COSTA et al., 2017).

Alguns pacientes podem desenvolver formas clínicas de hipersensibilidade, como eritema nodoso, eritema multiforme e síndrome de Sweet, devido a uma resposta imune exacerbada contra o fungo (OROFINO-COSTA et al., 2017, LOPES-BEZERRA et al., 2006). Ademais, sugere-se que o contato próximo e frequente com gatos domésticos doente leve a reinfecções e reações de hipersensibilização de humanos (GUTIERREZ-GALHARDO et al., 2005).

Regressão espontânea não é rara em lugares com elevado número de casos (LOPES-BEZERRA et al., 2006). Quando curam, as lesões podem deixar cicatrizes fibróticas que podem alterar a função do órgão dependendo do local da infecção (OROFINO-COSTA et al., 2017).

2.4 DIAGNÓSTICO

A correlação de dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais é essencial para o diagnóstico (BARROS et al., 2011). Visto que, clinicamente a esporotricose assemelha-se a outras doenças dermatológicas. Problema que se intensifica ainda mais em casos de esporotricose atípica.

2.4.1 Exame direto (ED)

O exame direto pode ser realizado de fragmento de tecido, secreção ou escamas epidérmicas de lesões. Quando se tratando de lesões disseminadas, podem ser analisados também: escarro, urina, sangue ou fluidos cefalorraquidiano, sinovial, dentre outras (BARROS et al., 2011).

Geralmente laminae são preparadas utilizando hidróxido de potássio a 10%, a fim de observar as células leveduriformes parasitárias (células em “forma de charuto”). As estruturas fúngicas são pequenas (2 a 6 μm de diâmetro) e escassas, e assim são difíceis de serem detectadas em material biológico de humanos, insuficientes para o diagnóstico conclusivo (MAHAJAN, 2014). Contrariamente em amostras felinas, que devido à alta carga fúngica, as células podem ser facilmente observadas, com uma ampliação de 400x (BARROS et al., 2011a).

Em manifestações disseminadas a coloração de Gram, Giemsa, Periodic-Schiff (PAS) e Grocott-Gomori (coloração com prata) pode ser usada, porém não é conclusiva, pois a reação tecidual assemelha-se a outras doenças granulomatosas, como infecções fúngicas sistêmicas, tuberculose cutânea, hanseníase, sarcoidose e granulomas de corpos estranhos (MAHAJAN, 2014; LOPEZ-BEZERRA et al., 2018).

Sendo assim, a cultura do fungo em meios artificiais permanece como padrão ouro para diagnóstico (MAHAJAN 2014).

2.4.2 Cultura

As amostras normalmente são cultivadas em Ágar Sabouraud, adicionado de cloranfenicol e cicloheximida, e mantidas a 25°C e a 37°C para obter o agente etiológico. Com duas semanas de incubação pode-se ter o resultado das culturas, porém por vezes é necessário até 30 dias para descartá-las como negativas (LOPEZ-BEZERRA et al., 2018).

De culturas cultivadas por 5 a 8 dias, entre 25 e 28 °C, é possível obter a fase filamentosa caracterizada por colônias irradiadas e esbranquiçadas ou bege com micélio aéreo (BONIFAZ & VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, 2013). Destas culturas são montadas lâminas com o corante Lactofenol azul de algodão, com o auxílio de microscópio óptico, são visualizadas hifas delgadas com conidióforos eretos com vários conídios unicelulares hialinos, dispostos em arranjo em forma de flor “semelhante a margarida”. Os numerosos conídios sésseis, marrons, (sub)globosos ou triangulares são visíveis ao longo de hifas indiferenciadas (LOPEZ-BEZERRA et al., 2018). A incubação de culturas a 37 ° C no ágar glicose-cisteína

no sangue ou caldo de infusão cérebro-coração produzirá sua forma de leveduriforme (MAHAJAN 2014).

2.4.3 Testes moleculares

Geralmente o diagnóstico da esporotricose é liberado apenas com a designação do gênero do agente etiológico, mas a identificação da espécie é essencial para melhor terapêutica, já que há diferença de virulência entre as espécies, além de contribuir para estudos epidemiológicos (FREITAS et al., 2015).

A biologia molecular tem fomentado diversas técnicas aplicáveis para identificação das espécies, podendo assim definir a espécie agente da esporotricose (ZHANG et al., 2019).

Em 2006, foram realizadas análises dos genes que codificam três proteínas (quitina sintase, β -tubulina e calmodulina) de 60 isolados de *S. schenckii lato sensu* foi observada a presença de espécies crípticas (MARIMON et al., 2006). Posteriormente, Marimon et al. (2007) caracterizaram fenotipicamente 127 isolados e comparou com sequências do gene calmodulina, sendo confirmado a existência do complexo e descrevendo três novas espécies. Neste estudo, foi proposto uma chave de identificação fenotípica e comprovou que o gene de calmodulina é um bom marcador para diferenciação destas espécies.

Oliveira et al. (2011) ao realizar identificação fenotípica de 246 isolados de *Spotothrix* spp, demonstraram que em 25 isolados não foi possível definir a espécie e os submeteu a teste molecular utilizando os primers CL1 e CL2A. Ao final do estudo, concluíram que houve 11,7% de discordância na classificação das espécies ao utilizar ambas metodologias (fenotípica e genotípica), as mesmas propostas por Marimon et al., (2007).

Ensaio de Nested PCR foi realizado para detectar padrão de amplificação de DNA mitocondrial de *S. schenckii lato sensu* em isolados de várias partes do mundo e compará-los com os de fragmentos de tecidos de humanos e ratos com esporotricose. O resultado mostrou que a sensibilidade 100x maior de Nested PCR em detectar o DNA alvo que a PCR de rotina (XU et al., 2010). Hayashi et al (2019) ao avaliar o valor diagnóstico da aplicação de Nested PCR em esporotricose cutânea de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina concluiu que é um método rápido e preciso de diagnóstico para casos de esporotricose cutânea, com 100% de sensibilidade e 98,7% de especificidade. Apesar de este método apresentar alta sensibilidade e especificidade não se têm a identificação da espécie causadora da infecção.

Oliveira et al. (2012) realizaram PCR *fingerprinting* de T3B para diferenciar 15 cepas clínicas de *Sporothrix* no nível de espécies. A identificação realizada pela técnica foi comparada com sequências de calmodulina, e obteve-se 100% de concordância. Este resultado foi confirmado na pesquisa conduzida por Oliveira et al. (2015a) utilizando cepas ambientais e sugeriram a aplicação da técnica em laboratórios clínicos de micologia e possível criação de um banco de dados.

Kawasaki et al. (2012) em estudo preliminar de PCR-RFLP de mtDNA, utilizando enzima de restrição *Asel*, afirmam que este é um método promissor para a identificação de isolados de *Sporothrix* spp. Mais tarde, PCR-RFLP usando como alvo o gene da calmodulina digerido com a enzima de restrição *HhaI*, apresentou cinco padrões eletroforéticos diferentes para *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* e *S. luriei*, porém não permitiu a identificação de *S. mexicana* e *S. pallida* (RODRIGUES et al., 2014a).

Rodrigues et al. (2015a) buscaram estabelecer RCA (*Rolling Circle Amplification*) como uma ferramenta de triagem de identificação espécie-específica de *Sporothrix* spp., a partir da observação do polimorfismos no gene que codifica a calmodulina, sendo possível a identificação de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. pallida*, com 100% de especificidade e sensibilidade.

Rodrigues et al. (2015b) desenvolveram novos marcadores baseados nas sequências genicas da calmodulina. Os primers espécies-específicos foram eficazes na identificação de cepas de *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. pallida* e *S. stenocera*, Demonstraram alta sensibilidade, detectando até 10 fg de DNA. No modelo murino de esporotricose disseminada a taxa de detecção do fungo foi de 100% em amostras do baço, fígado, pulmões, coração, cérebro, rins e cauda.

Zhang et al. (2019) elaboraram um novo método da PCR Real-Time Multiplex para esporotricose causada por *S. brasiliensis*, *S. schenckii stricto sensu* e *S. globosa*, comparando os resultados com os da cultura e da PCR espécie-específica. Obteve bons resultados na detecção do fungo, e os autores concluem que o novo ensaio com PCR Real-Time é eficaz, rápido, preciso e altamente sensível.

2.4.4 Outros testes para diagnóstico

Estudo realizado com 198 pacientes com suspeita de esporotricose, dos quais foram obtidas informações sobre o isolamento da cultura e detecção de anticorpos por um ensaio imunoenzimático (ELISA). A cultura obtida e a detecção de anticorpos foram observadas em

42,4% dos indivíduos, e resultado falso negativo de ELISA em 23 pacientes (DE OLIVEIRA et al., 2019). Segundo Coelho et al. (2019) esse teste pode ser melhorado utilizando a solução de ureia 6 M, capaz de reduzir os limites químicos responsáveis por reações inespecíficas, e demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade.

Teste cutâneo do antígeno esporotriquina demonstrou sensibilidade de 94,5% e especificidade de 95,2% das amostras, sendo observados 4 casos falsos positivos, assim os autores sugerem que o teste pode auxiliar no diagnóstico, e sendo excelentes para estudos epidemiológicos (BONIFAZ et al., 2018).

Oliveira et al. (2015b) utilizou, pela primeira vez, MALDI-TOF MS para identificar 50 isolados ambientais e clínicos do complexo *Sporothrix*. Um banco de dados foi estabelecido e foi possível a identificação correta de todos os isolados, pertencentes a *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. schenckii*, *S. luriei* e *S. pallida*,

2.5 TRATAMENTO E SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

A cura espontânea da esporotricose ocorre em raros casos, geralmente é necessário tratamento para grande parte dos pacientes (KAUFFMAN et al. 2007), seja com uso de antifúngicos ou outras medidas locais, que normalmente resultam em boa resposta terapêutica (BONIFAZ et al., 2010). A escolha terapêutica depende da manifestação clínica, imunidade do hospedeiro e espécie de *Sporothrix* causadora (GARCIA-CANERO et al., 2018).

No ano de 1950, o uso de calor para tratamento de esporotricose cutânea foi descoberto por acaso quando um homem doente recebeu vacina contra febre tifoide e foi observada a regressão de nódulos de esporotricose, depois de oito dias de febre, obtendo a cura com o uso de iodeto de potássio (KI) (THOMAS et al., 1951). A partir daí, a aplicação local de calor (ex.:banho de água, compressa quente) é considerada um tratamento auxiliar e pode ser particularmente eficaz nos estágios iniciais da infecção com lesão leve no tecido (XUE et al., 2009). Este procedimento é indicado a pacientes que não são candidatos adequados ou não toleram terapia sistêmica, por exemplo, grávidas (DOHERTY et al., 2010).

Iodeto de potássio foi o medicamento largamente utilizado no tratamento da esporotricose por cerca de 100 anos, especialmente em países em desenvolvimento, por causa do baixo custo, eficácia e perfil de segurança, apesar do gosto desagradável; mas não tem o mecanismo de ação esclarecido (XUE et al., 2009). É indicado para formas limitadas da doença, para pacientes imunocompetentes (MACEDO et al., 2015).

De acordo com a IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) deve ser administrada solução saturada de KI, iniciada na dosagem de 5 gotas 3x/dia e aumentando, conforme tolerado, para 40-50 gotas 3x/dia (KAUFFMAN et al., 2007), porém não informa como a solução é preparada; no Brasil administra-se 4-6g/dia, que é tomada em três doses (OROFINO-COSTA et al., 2013).

De acordo com Bustamantes e Campos (2011) a maioria dos pacientes precisa de menos de 3 meses de tratamento. Este medicamento não é recomendado para casos de esporotricose disseminada e sistêmica (KAUFFMAN et al., 2007). Contudo, quando combinado com Itraconazol (ITC) pode ser uma estratégia de tratamento alternativa em pacientes com esporotricose disseminada que não podem ser tratados com Anfotericina B (AMB) por qualquer razão (KHAITAN et al., 2018).

Itraconazol é a droga antifúngica de primeira escolha no tratamento da esporotricose (KAUFFMAN et al., 2007), ocupando o lugar do KI, desde a década de 1990, devido a facilidade de dosagem (OROFINO-COSTA et al., 2013) e a intolerância gastrointestinal que leva ao desuso de iodeto de potássio (MACEDO et al., 2015). O ITC impede a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana celular dos fungos (BUSTAMANTE E CAMPOS, 2011).

A IDSA (KAUFFMAN et al., 2007) recomenda para a esporotricose cutânea lifocutânea a administração de itraconazol (200 mg/dia) até 2 a 4 semanas depois da resolução das lesões, tratamento durando de 3 a 6 meses. Para crianças é sugerido tratamento com dosagem de 6 a 10 mg/kg. A dosagem do medicamento pode ser em cápsula de 100 mg ou solução de 100 mg por 10 mL; a formulação em cápsula é melhor absorvida quando ingerida com alimentos, já a solução é melhor absorvida quando tomada com o estômago vazio. Para pacientes com esporotricose visceral e linfocutânea, mas com falha terapêutica, devem ser acompanhados os níveis séricos de ITC a fim de garantir que o paciente tenha absorção adequada do medicamento. Em estudo posterior realizado por de Barros et al. (2011b) foi observada a cura de 547 pacientes utilizando a dosagem de 100 mg/dia, se mostrando um tratamento eficaz, seguro e de menor custo.

Em geral, o ITC tem um bom perfil de segurança, sem eventos adversos graves no tratamento de esporotricose (BUSTAMANTE E CAMPOS, 2011). Fluconazol (FCZ) e cetoconazol (CTZ), apesar de pertencerem a mesma classe do ITC (azólicos), não são preferencialmente a escolha na falha do ITC, devido suas recomendações de altas doses para o tratamento (400 a 600mg/dia) com efeitos colaterais (MAHAJAN, 2014).

Para casos de esporotricose pulmonar, meningeal, sistêmica e em gestantes é recomendado AMB, administrado como uma formulação lipídica de 3 a 5 mg/ kg por dia, ou desoxicolato de anfotericina B, em doses de 0,7 a 1,0 mg/kg por dia. É usado no início da terapêutica, até que o paciente apresente melhora, e substituído por ITC (KAUFFMAN et al., 2007). Está disponível para uso intravenoso e tópico, alguns efeitos adversos do tratamento são: febre, calafrios, dor de cabeça, mal-estar e vômito (MAHAJAN, 2014).

Ela se liga a esteróis da membrana citoplasmática dos fungos, aumentando a permeabilidade e causando a morte celular (MAHAJAN, 2014).

Quando os tratamentos dos casos de esporotricose cutânea e linfocutânea não respondem a ITC, ou quando este não é tolerado, a terbinafina (TBF) é um agente alternativo. Este medicamento inibe a síntese de ergosterol, mas não há consenso sobre a dosagem ideal e duração do tratamento (MAHAJAN, 2014). Mas, Francesconi et al. (2011) relataram a cura de 50 pacientes com o uso de 250 mg/dia com o tratamento variando de 2 a 24 meses e segundo Almeida-paes et al. (2016) o tratamento com esta droga raramente falha.

A diferença de suscetibilidade entre as espécies, o extenso período de tratamento, o alto custo dos medicamentos e os efeitos colaterais são os motivos que levam a aplicação de terapias alternativas para terapêutica da esporotricose, como, por exemplo, a combinação de drogas (GARCIA-CANERO et al., 2018).

O documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) possui uma descrição do teste de suscetibilidade de *S. schenckii sensu lato* na fase micelial, mas os níveis *cutoff*, que definem a resistência, não foram estabelecidos. Além disso, não foi definida qual a correlação entre os resultados dos testes *in vitro* e os resultados clínicos.

Estudo realizado em 2005 mostrou que os valores da concentração inibitória mínima (CIM) são influenciados pela temperatura e pelo tipo de fase de crescimento utilizada para realizar o teste (TRILLES et al., 2005). E as espécies de *Sporothrix* respondem de maneira diferente aos antifúngicos (GARCIA-CANERO et al., 2018).

Garcia-Canero et al., (2018) apresentam uma tabela com resultados de teste de sensibilidade *in vitro* contra espécies de *Sporothrix* (Tabela 1). Para *S. brasiliensis* ITC, Posaconazol (PCZ), TBF e KI apresentaram boa atividade antifúngica; enquanto AMB atividade moderada e caspofungina, voriconazol (VCZ), FCZ e flucitosina, baixa. Para *S. schenckii* AMB, PCZ e TBF demonstraram ter boa ação antifúngica; ITC moderada e VCZ, FCZ e equinocandinas, baixa ação. Frente a *S. globosa* TBF exibiu boa atividade, FCZ e VCZ atividade moderada e ITC, baixa. Contra *S. mexicana* TBF e CTZ ação antifúngica boa, AMB moderada e PCZ baixa.

Tabela 1. Drogas avaliadas *in vitro* para espécies de *Sporothrix* (Garcia-Canero et al., 2018).

Complexo <i>Sporothrix</i>	Bom	Moderada	Baixa
<i>S. brasiliensis</i>	Itraconazol, posaconazol e iodeto de potássio	Anfotericina B	Caspofungina, voriconazol, fluconazol e flucitosina
<i>S. schenckii</i>	Anfotericina B, posaconazol e terbinafina	Itraconazol	Voriconazol, fluconazol e equinocandinas
<i>S. globosa</i>	Terbinafina	Fluconazol e voriconazol	Itraconazol
<i>S. mexicana</i>	Terbinafina e cetoconazol	Anfotericina B	Posaconazol

Almeida-Paes et al. (2016) realizaram teste de susceptibilidade antifúngica em cepas de *S. brasiliensis* de pacientes com esporotricose refratária. TBF foi a droga que exibiu menores CIMs (0,03 a 0,12mg/l), enquanto que ITC apresentou CIMs que variaram de 1 a 2 mg/l, PCZ 0,5 a 1 mg/l, VCZ 2 a >16 mg/l, AMB 0,5 a 4 mg/l. Os autores compararam com resultados de trabalhos anteriores, sendo observado que o perfil de susceptibilidade se manteve ao longo dos anos.

Em trabalho mais recente, Li et al. (2019), realizaram teste de suscetibilidade baseado no documento M27-A3 do CLSI e concluíram empiricamente que as cepas de *S. schenckii* e *S. globosa* testadas foram resistentes a FCZ, com resultados similares para AMB, VCZ e 5-fluorocitosina; e CIMs baixos para ITZ, PCZ e TBF.

2.6 EPIDEMIOLOGIA

Esporotricose é uma doença que ocorre em todo o mundo, em áreas tropicais e subtropicais, e tem se revelado como maior infecção fúngica das últimas décadas. São relatados casos na África, Oceania, Ásia, Europa e América (CHAKRABARTI et al., 2015). As áreas mais endêmicas são: China, África do Sul, e Brasil (ZHANG et al., 2015).

Classicamente a doença é adquirida por humanos através da inoculação do fungo por trauma (CHAKRABARTI et al., 2015), podendo ocorrer também por inalação dos conídios

(AUNG et al., 2013), e no caso do Brasil por contato com animais doentes, principalmente gatos (SCHUBACH et al., 2008).

A esporotricose pode afetar qualquer pessoa, independentemente da idade, sexo ou profissão, a infecção depende da exposição da vítima ao patógeno. Os modos de vida diferentes das populações ao redor do mundo e a distribuição geográfica das espécies causadoras levam a prevalência em grupos distintos de vítimas (CHAKRABARTI et al., 2015).

No estudo realizado do Zhang et al. (2015), globalmente, a forma clínica mais comum observada foi a esporotricose linfocutânea, o trauma foi mencionado em muitos casos, mas a ausência de trauma foi mencionada explicitamente por alguns, concluindo assim que inoculação subcutânea não precisa ser aparente para o início da doença. Para infecções com *S. globosa* e *S. schenckii* o contato com o material vegetal em decomposição foi observado, enquanto *S. brasiliensis* foi significativamente mais associado à transmissão por gatos; outras fontes de transmissão zoonótica também foram mencionadas como peixe, esquilo, tatu, rato, cachorro e inseto, em infecções com *S. schenckii* e *S. brasiliensis*.

No Brasil são mais afetadas mulheres de meia idade, de baixo nível socioeconômico, que se envolvem em atividades domésticas, pois tem maior exposição ao fungo, dado que, são geralmente responsáveis pelo cuidado de animais infectados (BARROS et al., 2008), com infecção comumente relacionada a *S. brasiliensis*. Ocorrendo casos inclusive em crianças, uma vez que têm contato mais prolongado e frequente com os animais doentes (OROFINO-COSTA et al., 2017). Quando o agente etiológico passar a ser *S. schenckii stricto sensu* a forma de transmissão mais comum é a clássica, atingindo homens que realizam atividades agrícolas (RODRIGUES et al., 2014c).

Acredita-se que as condições na saliva animal na temperatura corporal dos gatos podem ser um fator estimulante para a produção da fase leveduriformes de *Sporothrix*, e apesar da presença de anticorpos, pode-se esperar uma colonização repetida pelo fungo, uma vez que já está adaptado a essas condições; e pressupõe-se que ao lamberem suas garras contaminam-nas com o fungo, podendo assim transmiti-los a outros gatos durante brincadeiras ou brigas, e para os humanos por arranhão ou mordedura (ZHANG et al., 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CCS/UFPE Protocolo de submissão N^o 73003017400005208, e as atividades apenas foram iniciadas mediante aprovação e atendeu a Resolução n^o 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Todos os sujeitos envolvidos na pesquisa assinaram ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

3.2 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Os critérios de hipóteses de diagnóstico clínico-epidemiológico de esporotricose foi estabelecido quando os pacientes apresentavam lesões com história de trauma por matéria orgânica ou, principalmente, contato com gato doente (SCHUBACH et al., 2005).

Antes da realização das coletas nos pacientes, foram observadas as Requisições com a solicitação do exame, contendo dados referentes às descrições das lesões, algumas vezes com a forma de infecção, e Hipótese Diagnóstico (HD). Quando a HD referia-se a esporotricose os pacientes foram convidados a participar da pesquisa, com a assinatura do TCLE, e assim incluídos como casos suspeitos.

3.3 OBTENÇÃO E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS CLÍNICAS

As amostras clínicas humanas foram coletadas e obtidas de pacientes atendidos no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos do Departamento de Micologia e no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas, ambos da UFPE, entre agosto de 2018 a julho de 2019. Os espécimes clínicos como fragmento de tecido, secreção e escamas epidérmicas de lesões típicas e atípicas de manifestação linfocutânea, foram manipulados para o diagnóstico laboratorial micológico. Ainda, foram obtidas culturas fúngicas de secreções de felinos atendidos no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

3.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL: EXAME DIRETO E CULTURA

No Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, lâminas foram preparadas de fragmentos de tecidos e escamas epidérmicas utilizando hidróxido de potássio a 20% como substância clarificante; de secreções foram preparados esfregaços “á fresco”; e corado por Panótico Rápido (bateria de corantes com predominância de tons vermelhos, pH ácido e azulados, pH básico, que cora as células em 1 min), utilizado para o diagnóstico em felinos (MACEDO-SALES et al., 2018).

Concomitantemente, as amostras foram semeadas (secreção) ou inoculadas (fragmento de tecido e escamas epidérmicas), em pontos equidistantes, sob Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) adicionado de cloranfenicol (50mg/L), para obtenção do agente etiológico; e mantidas à temperatura de ambiente ($TA = 28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$) por até 15 dias. Após o surgimento das colônias, foram preparadas lâminas para observação de estruturas fúngicas do agente etiológico, quando necessário foi utilizada a Técnica de Microcultivo (Rudramurthy & Chakrabarti, 2017).

Após confirmação do gênero, a cultura foi purificada para realização de diferentes ensaios. Das colônias primárias, foram retirados fragmentos e transferidos para placa com SDA adicionado de cloranfenicol (50mg/L), e mantidas a TA. Quando confirmada a pureza das colônias, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio com SDA a TA e armazenadas para análises posteriores.

3.5 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

A caracterização fenotípica foi baseada na chave de identificação proposta por Marimon *et al.* (2007) (Tabela 2), que considera os padrões de absorção de fontes de carbono, diâmetro da colônia em Batata Dextrose Ágar (BDA) a 30°C e a 37°C (termotolerância) após 21 dias de incubação, além da verificação da morfologia dos conídios em Ágar Corn Meal.

Tabela 2. Chave de identificação fenotípica de espécies do complexo *Sporothrix schenckii* proposta por Marimon et al. (2007).

Espécies	Conídios sésseis pigmentados	Colônias maiores que 50mm em BDA a 30°C por 21 dias	Crescimento a 37°C	Teste de assimilação	
				Sacarose	Rafinose
<i>S. albicans</i>	Não	Sim	Sim	+	-

<i>S. brasiliensis</i>	Sim	Não	Sim	-	-
<i>S. globosa</i>	Sim	Não	Não	+	-
<i>S. mexicana</i>	Sim	Sim	Sim	+	+
<i>S. schenckii</i>	Sim	Não	Não	+	+

3.5.1 Morfologia e Termotolerância

A morfologia dos conídios de *Sporothrix* spp. foi observada a partir de lâminas preparadas com material obtido do crescimento do fungo em Ágar Corn Meal após 10 dias de crescimento a 28°C. Fragmentos da colônia foram semeados em placas de Petri contendo meio BDA, as quais foram incubadas por 21 dias, a 30°C e 37°C, para verificar o diâmetro da colônia e termotolerância dos isolados, respectivamente (MARIMON et al., 2007).

3.5.2 Auxonograma

O auxonograma foi realizado utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços, cada um contendo 150 µL de meio Yeast Nitrogen Base (YNB), adicionado do substrato testado a uma concentração de 10%, exceto no poço controle negativo, onde foi adicionado 50 µL do meio em 100 µL de água destilada filtrada e esterilizada; e no controle positivo onde foi adicionado 50 µL do meio em 100 µL de glicose. Para validação do teste, uma cepa padrão de *Rhodotorula* sp. foi usada, devido a sua capacidade de absorver todos os açúcares testados: glicose (controle positivo), sacarose e rafinose (GOLUBEV & SCORZETTI, 2010). Os inóculos foram padronizados em leitor de microplacas ajustado em 530 nm a uma densidade óptica de 0,21 a 0,29 para atingir uma concentração de 2×10^5 a 2×10^6 UFC/mL. Posteriormente uma suspensão de 50 µL foi adicionada a cada micropoço e as placas foram incubadas a 25°C, e lidas no 5º e no 10º dia após o teste (MARIMON et al., 2007).

3.6 IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA

3.6.1 Extração de DNA

O protocolo de extração foi adaptado de Góes-Neto et al. (2005). Inicialmente, fragmento de cultura com 7 dias de crescimento em meio BDA foi transferido para tubo de

extração de DNA contendo matriz de pérolas de vidro, adicionado de 600µL do tampão de extração (CTAB 2%, NaCl 1.5 M, 100mM de Tris-HCl, 20mM de EDTA, polivinilpirrolidona 1%) previamente aquecido a 65°C e incubado a 65°C por 10 min. Em seguida, foi submetido a 5.5 m/s por 60s em FastPrep® (BIO 101, Farmingdale, New York, USA) e novamente incubado a 65 °C por 10min. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado, colocado em outro tubo e adicionado 650 µL de clorofórmio álcool-isoamilico (24:1), homogeneizado em vortex e centrifugado a 13000g por 10min. Novamente, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, adicionando isopropanol gelado, e a amostra foi mantida a -20°C por 30min. Subsequentemente, a amostra foi centrifugada (13000g por 10min), o sobrenadante desprezado e em seguida adicionado etanol a 70% ao tubo contendo o DNA. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado (13000g por 2min), e mais uma vez o sobrenadante foi desprezado para secagem do DNA a 37°C em estufa.

Ao final do processo, o DNA foi ressuspense em 50µl de água MiliQ autoclavada e mantido a 4°C até o momento das análises.

3.6.2 PCR com Sequências Iniciadoras Espécie-Específico

Para identificação das espécies do complexo *S. schenkii* foi realizada a amplificação da região genômica da calmodulina pela utilização de primers espécie- específico para *Sporothrix schenckii* (Ssch-F e Ssch-R); *S. brasiliensis* (Sbra-F e Sbra-R); *S. globosa* (Sglo- F e Sglo-R); *S. mexicana* (Smex-F e Smex-R); *S. pallida* (Spa-F e Spa-R) segundo Rodrigues et al. (2015b).

As reações de PCR foram realizadas em volumes finais de 12,5 µL contendo 8,75µL de ddH₂O, 0,4µL de cada primer (10 pmol/µL), 1,6 µL de 10x PCR Buffer (adicionado de MgCl₂), 0.30 µL de dNTP (10mM), 0.05 µL de Taq DNA polymerase 5U (Sigma) e 1µL de DNA molde (100 ng/µL).

A PCR foi realizada em termociclador (Techne) de acordo com os seguintes parâmetros de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 5min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 1min, anelamento a 60°C durante 1min, e extensão a 72°C durante 1min, com uma extensão final a 72°C por 10min. Os amplicons obtidos foram montados em parafilme (3µL do produto da PCR, 2µL GLB e 2 µL GelRed), em gel de agarose a 1% em cuba de eletroforese contendo o tampão TAE e submetidas a eletroforese (100v por 25min). Posteriormente, os produtos da PCR foram visualizados em transiluminador, para verificação do padrão de amplificação das amostras frente aos primers testados, e então fotografados.

3.6.3 Análises Filogenéticas

Para confirmação da identificação foram realizados os sequenciamentos de dois isolados identificados pela PCR espécie-específica como *S. brasiliensis*. As seguintes sequências iniciadoras foram utilizadas: senso Sbra-F (5'-CCC CCG TTT GAC GCT TGG-3') e antisenso Sbra-R (5'-CCC GGA TAA CCG TGT GTC ATA AT-3'). Após a obtenção dos produtos da PCR, os fragmentos de DNA obtidos foram purificados utilizando o kit ilustra™ Alkaline Phosphatase e Exonuclease (ilustra™ ExoProStar™, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK) segundo recomendações do fabricante. O sequenciamento foi realizado na Plataforma Multiusuária de Sequenciamento e Expressão Gênica do Centro de Biociências da UFPE.

Para a análise filogenética, as sequências obtidas foram editadas no Mega v.7 (Kumar et al., 2016), posteriormente comparadas com sequências similares. Os cromatogramas do sequenciamento foram analisados para auxiliar na edição manual das sequências através do programa Mega v.6 (Kumar et al., 2016). Após a edição, as duas sequências foram utilizadas para busca das mais similares depositadas no *GenBank*, utilizando a ferramenta *BLASTn*. As sequências obtidas foram alinhadas em conjunto com outras recuperadas da base de dados utilizando o programa MAFFT on-line (KATO & STANDLEY, 2013) e ajustadas manualmente utilizando o programa MEGA v. 6. para verificar sua relação com base nas análises de máxima verossimilhança (ML) e inferência bayesiana (BI).

As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (1×10^6 gerações) foram realizadas no MrBayes no XSEDE hospedado no portal científico CIPRES (MILLER et al., 2010). Para a Máxima Verossimilhança foi utilizado o modelo de substituição de nucleotídeos padrão GTR+I+G e para a Inferência Bayesiana foi utilizado o modelo de substituição nucleotídica gerado por meio do programa MrBayes 3.1.2 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003). As árvores obtidas foram visualizadas no FigTree v.1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

Culturas representativas dos fungos do complexo *S. schenkii* identificados foram depositadas no acervo da Coleção de Culturas – Micoteca URM da UFPE.

3.7 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO*

O método utilizado seguiu as condições descritas no documento M38-A2 do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Foram utilizados os antifúngicos itraconazol, voriconazol com concentrações variando de 0,015 a 16 µg.mL⁻¹, iodeto de potássio e terbinafina nas concentrações de 0,125 a 64 µg.mL⁻¹.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) tanto dos antifúngicos seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008). Os isolados do complexo *S. schenkii* foram mantidos em BDA e incubados a 35°C durante sete dias. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85g/L), e a densidade ajustada em espectrofotômetro a 530nm em 80% a 82% de transmitância. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração final de $2-5 \times 10^3$ céls. mL⁻¹. Foram utilizadas placas de microtitulação planas de 96 poços (TPP; Trasadingen, Suíça). O inóculo foi adicionado aos poços com os antifúngicos, sendo as placas incubadas a 35°C, durante 48h. Posteriormente, foi procedida à leitura visual dos resultados para determinação da CIM frente aos antifúngicos testados, sendo esta aquela concentração capaz de inibir o crescimento do fungo.

3.8 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS

Dos pacientes incluídos na pesquisa, quando possível, foram obtidas informações referentes à: localidade de origem, forma de infecção e tempo da lesão. Outros dados como: sexo, idade, ocupação, localização da lesão, e resultado do exame direto e da cultura foram coletados a partir da consulta do livro de registros de atendimentos dos referidos laboratórios. Informações dos pacientes com esporotricose foram tabuladas e analisadas.

A partir do local de residência dos pacientes com esporotricose foram elaborados mapas, a fim de visualizar a distribuição espacial aproximada da doença nos municípios do Pernambuco e, em especial, na cidade do Recife.

Para estimativa da taxa de incidência da esporotricose humana nos municípios do Pernambuco, foi calculada a taxa de incidência da doença por 100.000 habitantes com população aproximada segundo dados do IBGE em 2019 (IBGE, 2019).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 1279 pacientes atendidos em ambos os laboratórios durante o ano de coleta de dados, 138 foram incluídos como pacientes suspeitos de esporotricose; destes 96 tiveram diagnóstico conclusivo.

4.1 DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico clínico realizado pelo dermatologista não é conclusivo, visto que as lesões apresentam variadas manifestações clínicas, como pápulas que pustulizam e ulceram, abscessos, lesões eritematosas, entre outras. Quanto a características clínicas observadas neste estudo, muitas lesões apresentaram formas atípicas, assemelhando-se a outras doenças, como leishmaniose cutânea, cromomicose, micobacteriose atípica, entre outras, segundo Mahajan (2014) (Figura 1).



Figura 1. Imagens de lesões atípicas de pacientes confirmados para esporotricose.

4.2 DIAGNÓSTICO LABORATÓRIO

O diagnóstico de 96 pacientes foi confirmado com a obtenção do agente etiológico em cultura, visto que ao exame direto foram observadas estruturas fúngicas leveduriformes em parasitismo (Figura 2) em amostras de 47 pacientes (Tabela 5). As estruturas observadas em parasitismo não são conclusivas para o diagnóstico da esporotricose humana, devido à escassez de células fúngicas (Mahajan, 2014), podendo ainda ser confundidas com células leveduriformes de *Histoplasma capsulatum* ou leveduras de *Candida glabrata* (LARONE, 2002 apud RUDRAMURTHY & CHAKRABARTI).

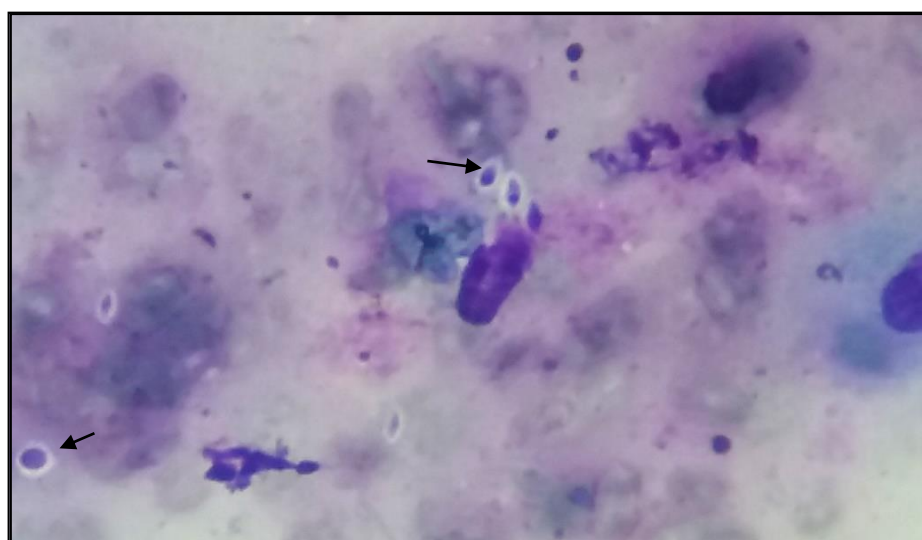


Figura 2. Microscopia direta de amostras biológicas observando células leveduriformes, coradas por Panótico Rápido (1000x), compatíveis as do complexo *Sporothrix schenckii*.

Nossos resultados reafirmam a relevância do padrão ouro no diagnóstico da esporotricose humana, isto é a obtenção do agente em meio de cultura.

Do material semeado e ou inoculado em meio Ágar Saboraud incubado a temperatura de ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2$) foi observado crescimento de fungo filamentosos com colônia hialina que pode pigmentar, tornando-se marrom escura, devido à produção de melanina (Figura 3).

Nas lâminas preparadas a partir das culturas foram observados filamentos micelianos hialinos, septados, bastante ramificados e medindo cerca 1,5 a 2 μm de espessura, podendo apresentar conídios demáceos ou hialinos em formato arredondado (ovalado), fusiforme ou piriforme em disposição floral lembrando uma “margarida”, ou ligados diretamente aos filamentos micelianos lateralmente, podendo medir de 2 a 6 μm , confirmando o diagnóstico para esporotricose (Figura 4). As características macroscópicas e as estruturas descritas são típicas do gênero *Sporothrix* conforme descrito por Orofino-Costa et al. (2017).

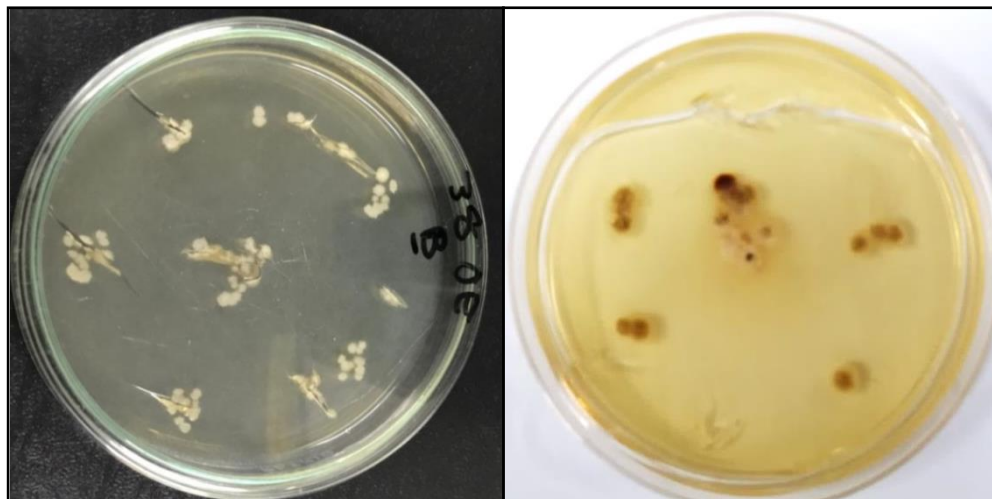


Figura 3. Cultura de amostras biológicas em pontos equidistantes, evidenciando crescimento de colônia de fungo filamentoso, em Ágar Sabouraud a 28° C.

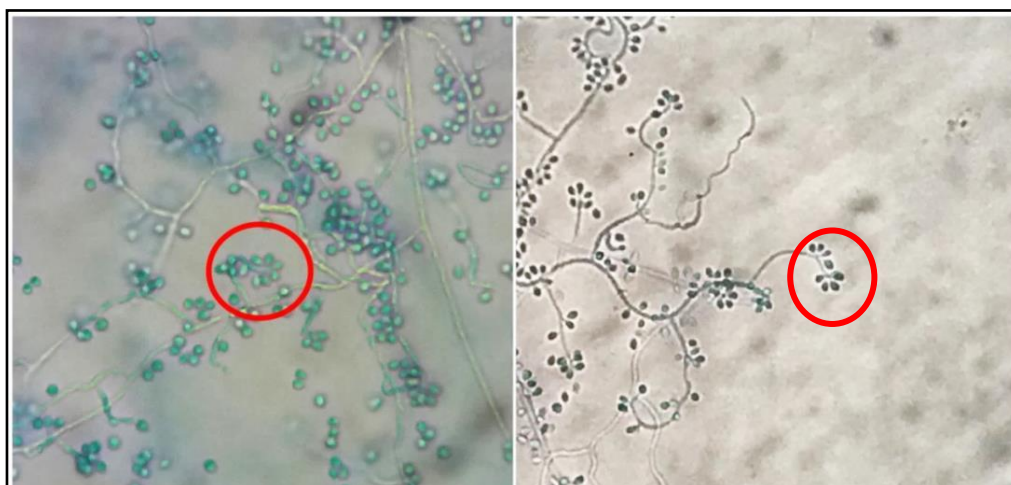


Figura 4. Micromorfologia de Cultura evidenciando conídios com disposição floral semelhante a “margarida” características do gênero *Sporothrix*, coradas com Lactofenol Azul de Algodão(400x).

Após confirmação da pureza das colônias, as mesmas foram transferidas para tubos de ensaio com SDA ou BDA a TA e armazenadas para análises posteriores.

4.3 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS

Dos 96 casos confirmados para esporotricose baseado no diagnóstico padrão ouro, 40 culturas foram purificadas e isolados e incluídas neste trabalho para realização dos teste de identificação morfológica, ensaios moleculares e sensibilidade. Além destes, foram adicionadas 10 culturas de *Sporothrix* sp. de felinos diagnosticados com esporotricose, obtidas do Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos da UFRPE.

4.4 IDENTIFICAÇÕES FENOTÍPICA E GENOTÍPICA

Os resultados da caracterização fenotípica, baseada na chave proposta por Marimon et al. (2007), mostraram que todos os isolados foram identificados como *S. schenckii*, visto que, apresentaram conídios pigmentados, exibiram crescimento a 37°C, diâmetro da colônia a 30°C menores que 50 mm e foram capazes de absorver sacarose e rafinose (Tabela 3, Figura 5 e 6).

A identificação genotípica utilizando primers espécie-específica (RODRIGUES et al., 2015b) revelou que todos os 50 isolados pertencem a espécie *S. brasiliensis*, apresentando bandas de aproximadamente 650pb (Figura 7 e 8), divergindo da identificação fenotípica realizada, e da afirmação de Marimon et al. (2007) que declaram que apenas com os testes de morfologia e fisiologia é possível distinguir entre as espécies do complexo *S. schenckii*. Estudos anteriores já mostraram imprecisão nesta chave, devido à variabilidade fenotípica dentro das espécies (OLIVEIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2013).

Para acurácia de tais identificações foi realizado sequenciamento de dois isolados, e foi confirmado como pertencentes a *S. brasiliensis* (Figura 9).

Observada a relevância de se fornecer um diagnóstico preciso para esporotricose, este trabalho reforça a implementação da PCR com primers espécie-específica, como proposto por Rodrigues et al. (2015b), a fim de aperfeiçoar o processo de identificação das espécies, visto que, a chave fenotípica (MARIMON et al., 2007) não mostrou-se segura, e os métodos de PCR tradicionais necessitam de sequenciamento e análises posteriores para determinação da espécie. Além disso, estes métodos demandam bastante tempo.

Tabela 3. Resultados dos testes de identificação fenotípica.

Isolados	Presença de conídio pigmentado	Diâmetro da colônia a 30°C (mm)	Crescimento a 37° C	Assimilação de carboidratos			Identificação Fenotípica
				GLI	SAC	RAF	
M38/19	+	23	Sim	+	+	+	<i>Sporothrix schenckii</i>
M216/19	+	28	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D229/18	+	28	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D231/18	+	25	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D248/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D266/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D278/18	+	27	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D295/18	+	28	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D298/18	+	28	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D299/18	+	26	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D301/18	+	22	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D307/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D317/18	+	25	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D318/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D319/18	+	27	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>

D329/18	+	27	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D347/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D348/18	+	28	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
M380/18	+	31,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D403/19	+	26	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D418/19	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D427/19	+	14	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D448/19	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D449/19	+	14	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D461/19	+	31,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D462/19	+	28,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D468/19	+	30	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D470/19	+	32	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D471/19	+	34	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D475/19	+	26	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D479/19	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D480/19	+	30	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D484/19	+	26,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
M481/18	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D481/19	+	36	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D510/19	+	32	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
D511/19	+	28,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
M680/18	+	26	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
M991/18	+	27	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
M994/18	+	26,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F1	+	14	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F2	+	31,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F3	+	28,5	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F4	+	32	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F5	+	34	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F6	+	26	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F7	+	29	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F8	+	36	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F9	+	32	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>
F10	+	20	Sim	+	+	+	<i>S. schenckii</i>

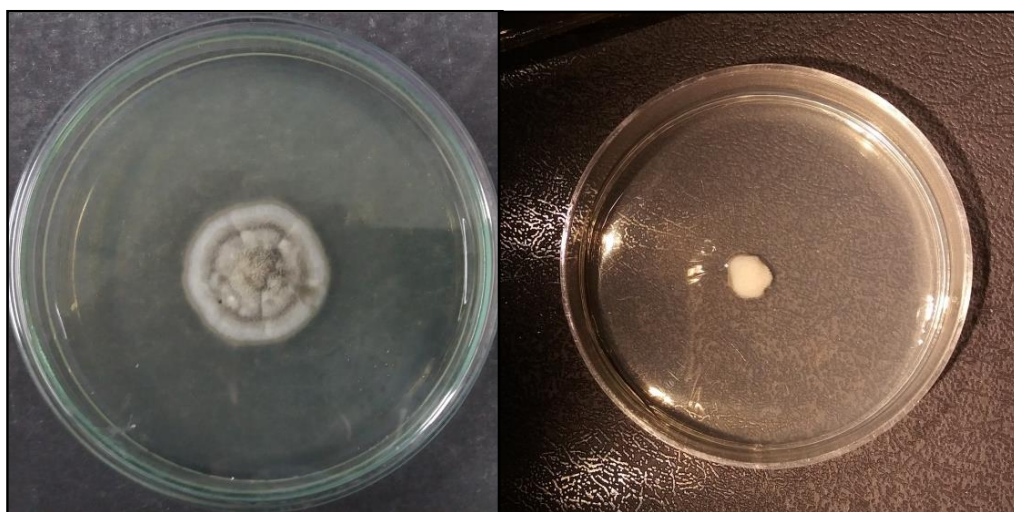


Figura 5. Testes para medir diâmetro da colônia (esquerda) e termotolerância (direita).

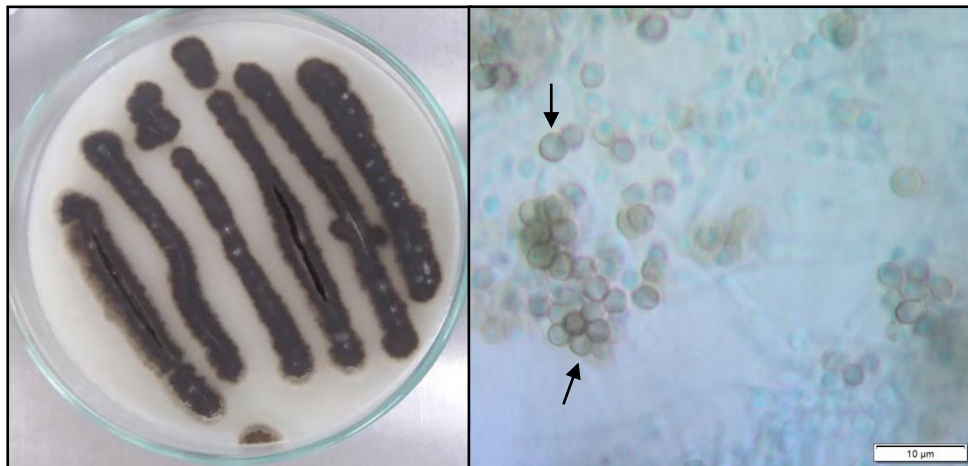


Figura 6. Testes para verificação da morfologia dos conídios. Setas evidenciando a presença de conídios pigmentados.

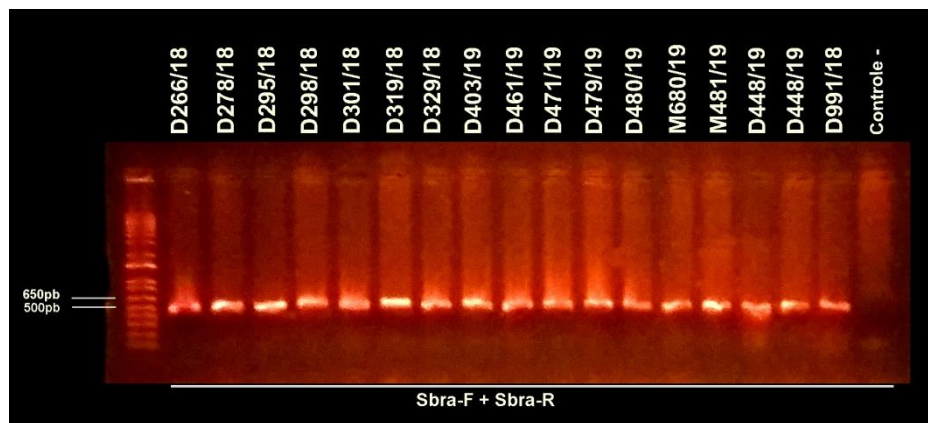


Figura 7. Amostras de *Sporothrix* submetidas a PCR espécie-específica com primers para *S. brasiliensis*.

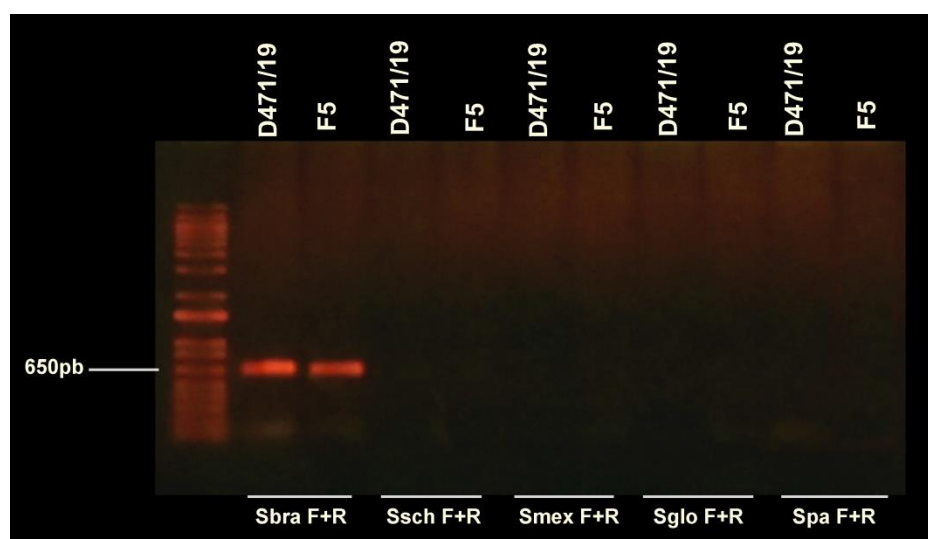


Figura 8. Amostras de *Sporothrix* submetidas a PCR espécie-específica com primers para *S. brasiliensis*, *S. schenckii*, *S. mexicana*, *S. globosa*, e *S. pallida*.

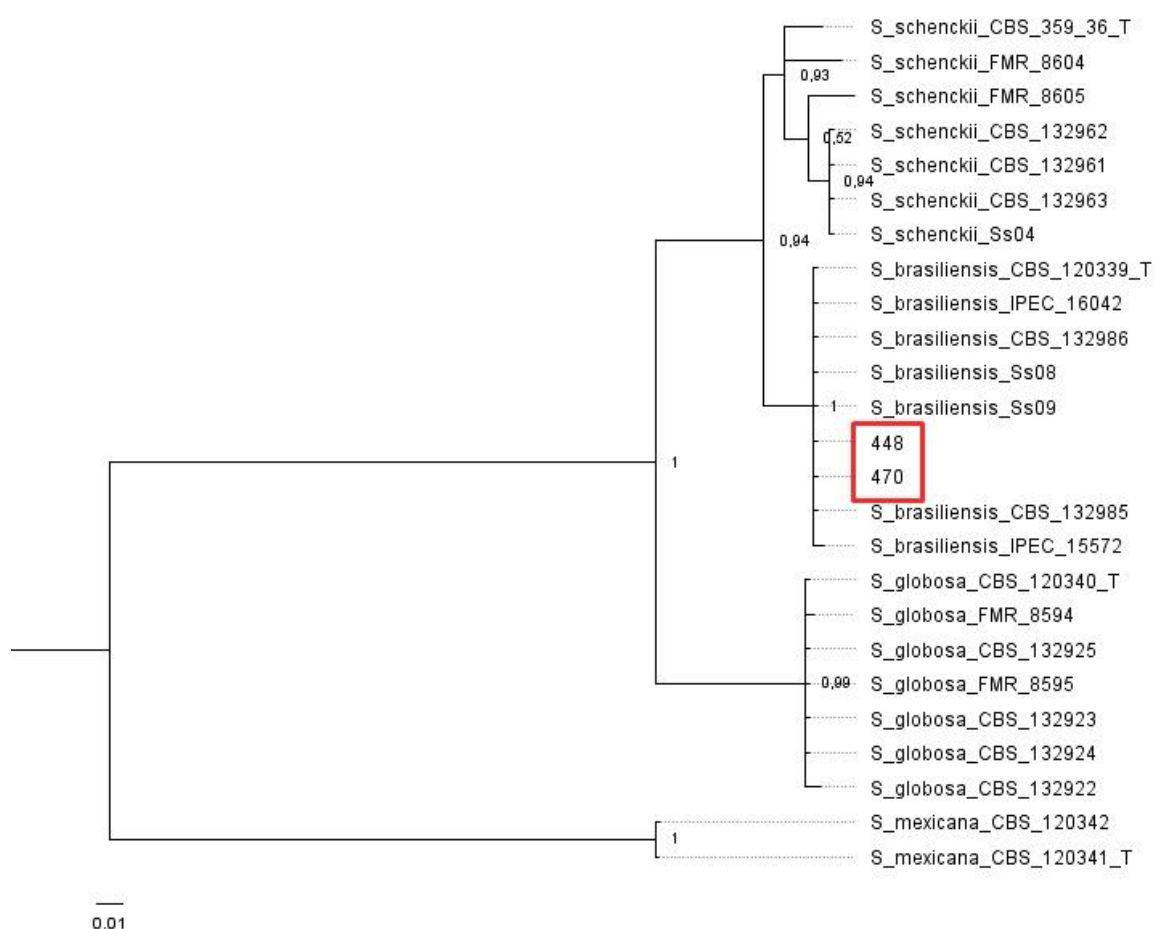


Figura 9. Árvore filogenética com o gene Calmodulina.

Após identificação das espécies foi depositado um exemplar proveniente de cada espécime clínico incluído neste estudo (fragmento de tecido humano, escamas epidérmicas humanas, exsudato de lesão supurativa humana e felina), segundo recomendações da Coleção de Culturas Micoteca URM Prof. Maria Auxiliadora Cavalcanti-UFPE. Os isolados depositados foram: D248/18 (URM 8249), D470/19 (URM 8248), M994/18 (URM 8247) e F6 (URM 8250).

4.5 SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA

Os testes de suscetibilidade mostraram que para voriconazol, todos os isolados apresentaram sensibilidade nas concentrações que variaram de 8 a ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$; frente à terbinafina demonstraram que todos os isolados tiveram seus crescimentos inibidos a concentração $\leq 0,12$ $\mu\text{g/mL}$. Nenhum dos isolados se mostrou sensível na presença de iodeto

de potássio. Frente a itraconazol as CIMs variaram de 0,12 a 2 µg/mL, a concentração 1 µg/mL foi aquela capaz de inibir 94% dos isolados (Tabela 4).

Na maioria dos casos de esporotricose o tratamento é realizado com itraconazol e terbinafina, antifúngicos que se mostraram eficazes em impedir o crescimento fúngico neste trabalho, sendo esses fármacos os mais adequadas na terapêutica desta micose. Iodeto de potássio, também amplamente utilizado no tratamento, não foi efetivo em inibir os isolados *in vitro* nas concentrações testadas, mas autores destacam que seu mecanismo de ação ainda é pouco compreendido (OROFINO-COSTA et al., 2013).

O iodeto de potássio é a primeira escolha para o tratamento da esporotricose, com efeito curativo definido. No entanto, devido ao seu uso inconveniente e a alguns efeitos colaterais (erupção cutânea, irritação gastrointestinal, artralgia, supressão da tireóide, etc.), sua aplicação é limitada.

Tabela 4. CIMs dos antifúngicos testados frente a 50 isolados de *S. brasiliensis*.

Antifúngicos	Nº de isolados inibidos por CIM (µg/mL)											
	≥64	32	≥16	8	4	2	1	0,5	0,25	≤0,12	0,06	0,03
Itraconazol	-	-	0	0	0	3	16	23	7	1	0	0
Terbinafina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	-	-
Iodeto de Potássio	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Voriconazol	-	-	41	9	0	0	0	0	0	0	0	0

4.6 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Neste estudo foram incluídos 96 casos confirmados para esporotricose, por meio do isolamento de fungos do complexo *S. schenckii* no diagnóstico laboratorial.

Destes, 65 (67,7%) foram provenientes de pacientes do sexo feminino e 31 (32,3 %) do masculino. Ressalta-se a mudança no perfil epidemiológico quanto ao sexo, visto que as principais vítimas da esporotricose eram homens que trabalhavam no campo (BIMBI & BRZEZINSKI, 2017). Barros et al. (2010), demonstraram que no Estado do Rio de Janeiro a maior incidência também foi em mulheres, provavelmente devido estas permanecerem mais tempo em casa, e estarem mais relacionadas aos cuidados de gatos doentes.

Por décadas, a esporotricose foi considerada “doença do jardineiro”, dado que acometiam homens que trabalhavam em contato direto com o solo (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2011), contudo segundo Bimbi e Brzezinski, (2017) com a mudança do perfil epidemiológico, afetam pessoas de variadas profissões, como demonstrado neste estudo:

auxiliar de informática, costureira, catador, chapeiro, operador de caixa, comerciante, entre outros (Tabela 5).

Tabela 5. Resumo dos dados epidemiológicos de pacientes positivos para esporotricose.

		Número de pacientes	
		Com dados disponíveis	Sem dados disponíveis
Sexo	Masculino	31	
	Feminino	65	
Faixa Etária (anos)	0 – 10	3	
	11 – 20	12	
	21 – 30	12	
	31 - 40	15	
	41 – 50	18	
	51 – 60	19	
	61 - 70	7	
	71 ou mais	10	
Região*	Membro Superior	80	
	Membro Inferior	7	
	Tórax	2	
	Face	6	
	Pescoço	2	
	Glúteo	1	
	Abdômen	1	
	Costas	3	
			1
Modo de infecção	Contato com gato diagnosticado com esporotricose	70	
	Paciente não recorda	7	
			19
Tempo de lesão até o momento da coleta	Menos de 1 mês	17	
	1 a menos de 2 meses	25	
	Mais de 2 meses	19	
			35
Resultado do Exame Direto**	Observadas estruturas fúngicas	47	
	Não observadas estruturas fúngicas	29	
	Não realizado	13	
			7

*de alguns pacientes foram coletados de mais de uma região, gerando mais de uma amostra por paciente.

** foi considerado o resultado por registro/paciente, não por amostra.

Na tabela 5 é possível observar que a esporotricose atualmente atinge pessoas de qualquer idade, desde 1 a 80 anos; com maior prevalência, neste estudo, em pessoas entre 41 a 60 anos, 37 casos. Indicando que a infecção na atualidade depende apenas da exposição ao patógeno (CHAKRABARTI et al., 2015).

As regiões afetadas com as lesões da doença continuam sendo os membros superiores, que neste estudo representou 80 amostras (Tabela 5), visto que são áreas mais expostas a traumas (BARROS et al., 2010).

A forma de infecção que prevalece, como tem sido observada nos últimos anos no Brasil, é a transmissão zoonótica (BONIFAZ & TIRADO-SÁNCHEZ, 2017), que tem o felino como principal transmissor da esporotricose. Do total de pacientes incluídos nesta pesquisa, 7 não recordavam do modo de infecção, de 19 não foi obtida esta informação, e 70 (72,9%) relataram contato com gato diagnosticado com esporotricose (Tabela 5). Reforçando que o gato merece atenção ao se planejar políticas públicas para o controle dessa doença.

Em geral, o período de incubação depende do tamanho dos inóculos; para casos cutâneos, é relatado um tempo médio de incubação de três semanas (BONIFAZ & TIRADO-SÁNCHEZ, 2017). Neste trabalho o tempo entre o surgimento da lesão no paciente até a procura por atendimento médico foi de até 4 meses.

Dos pacientes dos quais foi possível obter a localidade de origem (74), Recife foi a cidade de proveniência mais comum, com 39 casos, mas também foram registrados casos de pacientes residentes de outros municípios de Pernambuco: Jaboatão dos Guararapes, Olinda, Paulista, Camaragibe, Cabo de Santo Agostinho, Igarassu, Abreu e Lima, Ipojuca, São Lourenço da Mata e Amaraji (Tabela 6).

Nos municípios de Recife, Olinda, Amaraji e Camaragibe foram encontradas as maiores taxas de incidência municipal por 100.000 habitantes (Tabela 6).

Tabela 6. Taxa de incidência dos casos de esporotricose humana em Pernambuco, segundo município de residência dos pacientes.

Município de residência dos pacientes	Nº de casos confirmados	População estimada (2019)	Taxa de Incidência aproximada/100.000hab
Recife	38	1.645.727	2,42
Olinda	11	392.482	2,8
Jaboatão dos Guararapes	9	702.298	1,28
Paulista	6	331.774	1,8

Camaragibe	4	157.828	2,53
Igarassu	1	117.019	0,9
Abreu e Lima	1	99.990	1
Cabo de Santo Agostinho	1	207.048	0,5
Ipojuca	1	96.204	1
São Lourenço da Mata	1	113.230	0,9
Amaraji	1	22.829	4,38
Total	74		

A distribuição espacial dos casos aponta para uma maior tendência de concentração dos casos na região litorânea de Pernambuco (Figura 10), destacando-se Recife e região metropolitana com maior número de casos confirmados, fato que pode ser justificado devido a localização dos ambulatórios. Ainda assim, é uma situação preocupante, pois estes municípios abrigam aproximadamente 40,43% do total de habitantes do estado (IBGE, 2019).

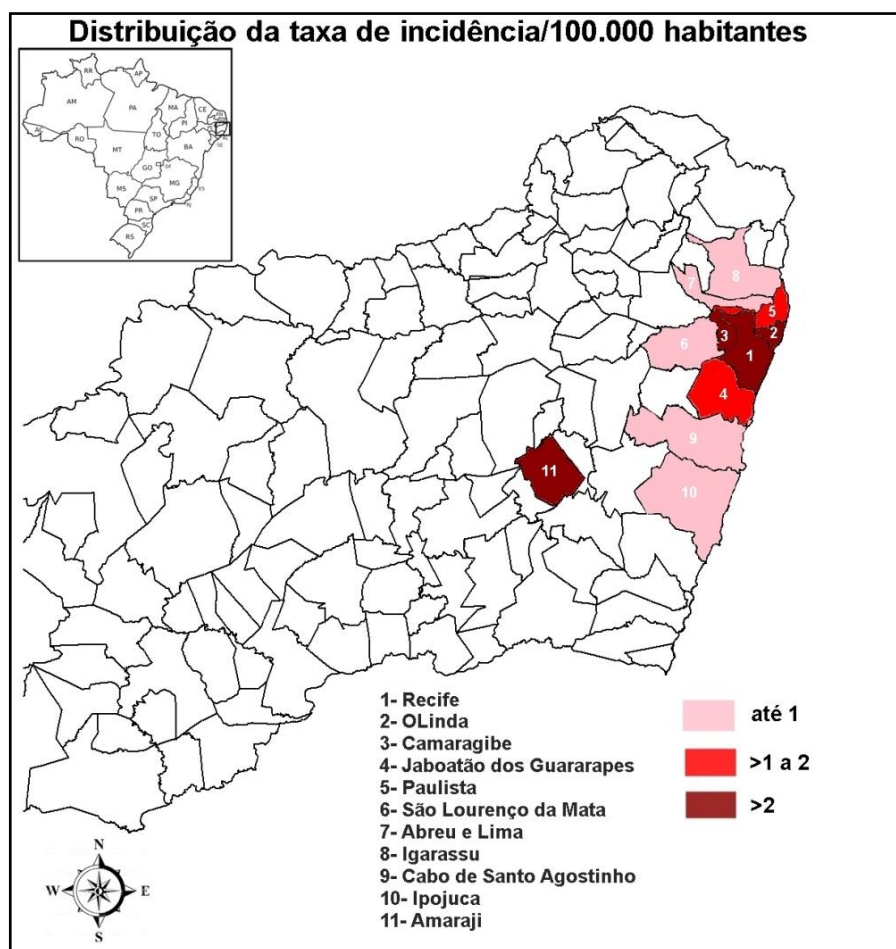


Figura 10. Taxa de incidência da esporotricose de municípios do estado de Pernambuco.

Foi registrada neste estudo uma paciente do interior do estado, Amaraji, com diagnóstico confirmado para esporotricose, após contato com gato doente. Acreditamos que há outros lugares de Pernambuco nos quais a doença está presente, uma vez que já foi relatado felino infectado no município de Bezerros (ARAÚJO & LEAL, 2016), localizado a 36 km de Amaraji e 96 km de Recife. Não há dados sobre outros municípios do Estado.

Em Recife, pacientes de 24 bairros foram diagnosticados com esporotricose, e a maioria deles mencionou contato com gato doente. Ao se observar a distribuição espacial da doença por bairros (Figura 11), constata-se sua ampla disseminação pela cidade, o que é um alerta para a população, visto que, gatos doentes possuem grandes quantidades de estruturas fúngicas infectantes e repassam a doença para outros gatos e pessoas, contribuindo para surtos, como o que ocorre atualmente em Pernambuco.

Silva et al. (2018) relataram um surto de esporotricose felina em Recife e Região Metropolitana, registrando 59 casos confirmados. Acredita-se que as condições na saliva dos felinos podem ser um fator estimulante para a produção da fase leveduriformes de *Sporothrix*, e pressupõe-se que ao lamberem suas garras contaminam-nas com o fungo, podendo transmiti-los a outros gatos durante brincadeiras ou brigas, e para os humanos por arranhão ou mordedura (ZHANG et al., 2015).

O surto de esporotricose zoonótica no Brasil teve início no estado do Rio Janeiro na década de 1990 (SILVA et al., 2012), nos anos seguintes a doença se espalhou para estados do Sul (GREMIAO et al., 2017) e atualmente sabe-se da presença da enfermidade no nordeste. É sugerida uma fonte comum para os casos de transmissão zoonótica no Brasil, pois o patógeno identificado pertence a uma única espécie, *S. brasiliensis*, estando também restrita a este país (RODRIGUES et al., 2013).

Em pesquisa na literatura observa-se que há falta de estudos epidemiológicos em Pernambuco, havendo apenas um artigo disponível (SILVA et al., 2018) que trata de casos felinos. Estes estudos são necessários, pois norteiam elaboração e aplicação de políticas públicas.

Os dados obtidos neste estudo não incluem todos os casos da doença em Pernambuco, visto que há outros ambulatorios pelo estado que realizam o diagnóstico da esporotricose, além de casos subnotificados, ainda assim pode-se ter uma visão abrangente sobre a atual situação epidemiológica no estado e, especialmente, em Recife.

A esporotricose é atualmente um agravo de interesse estadual e foi inserida no ano de 2015 na lista de notificação do estado, conforme a portaria SES/PE Nº 279 de 23/07/2015, sendo Doença de Notificação Compulsória (DNC) estadual. Dados da Coordenação de

Diagnóstico de Zoonoses e Outras Endemias do Laboratório Central de Saúde Pública – CDZOE/LACEN PE mostram o aumento progressivo de notificação desta micose no estado de Pernambuco, principalmente em Recife e região metropolitana, porém sendo registrada redução na notificação de casos em 2019, que se dá, provavelmente, por demora na notificação ou inserção dos dados no SINAN (Gráfico 1).

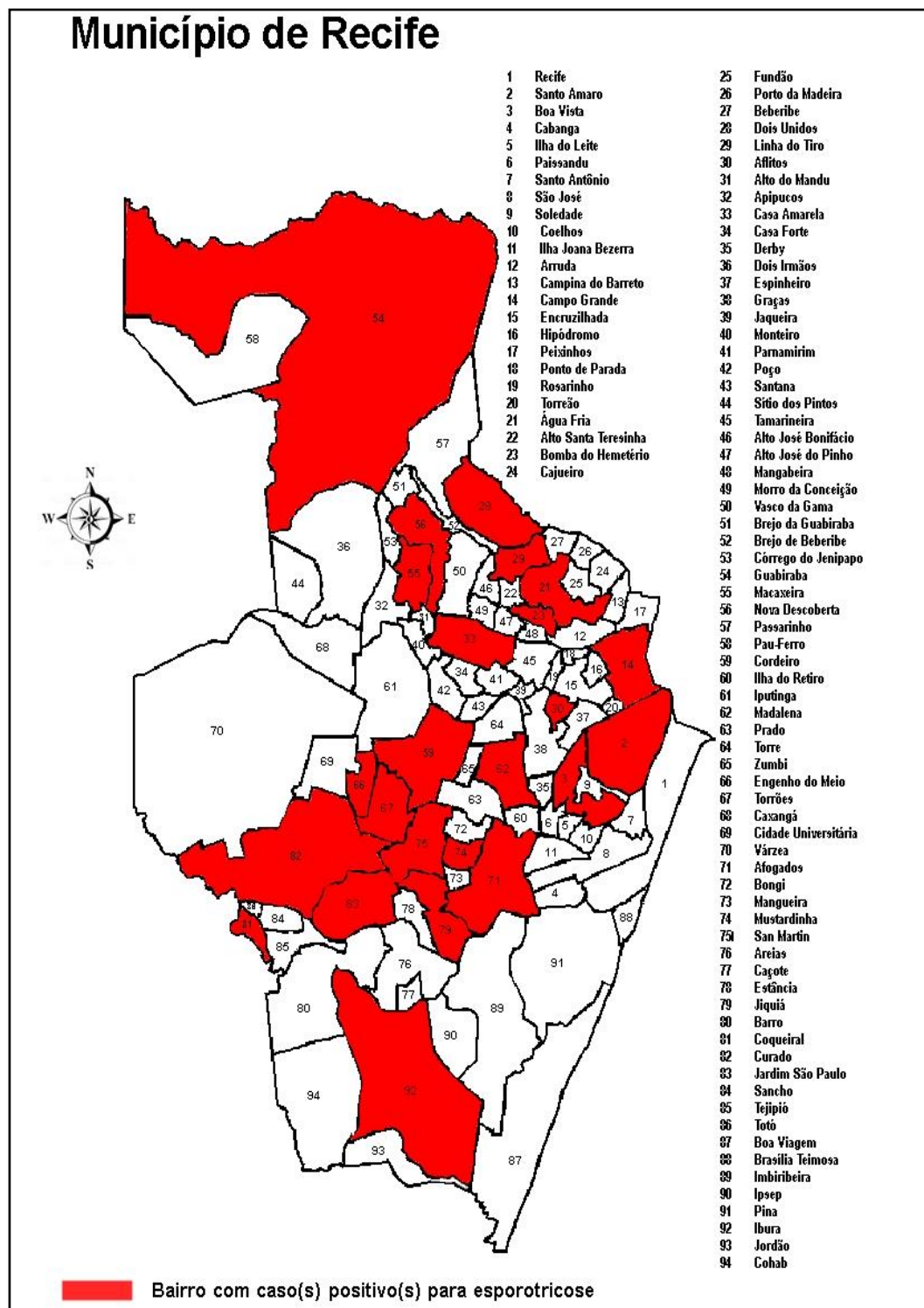
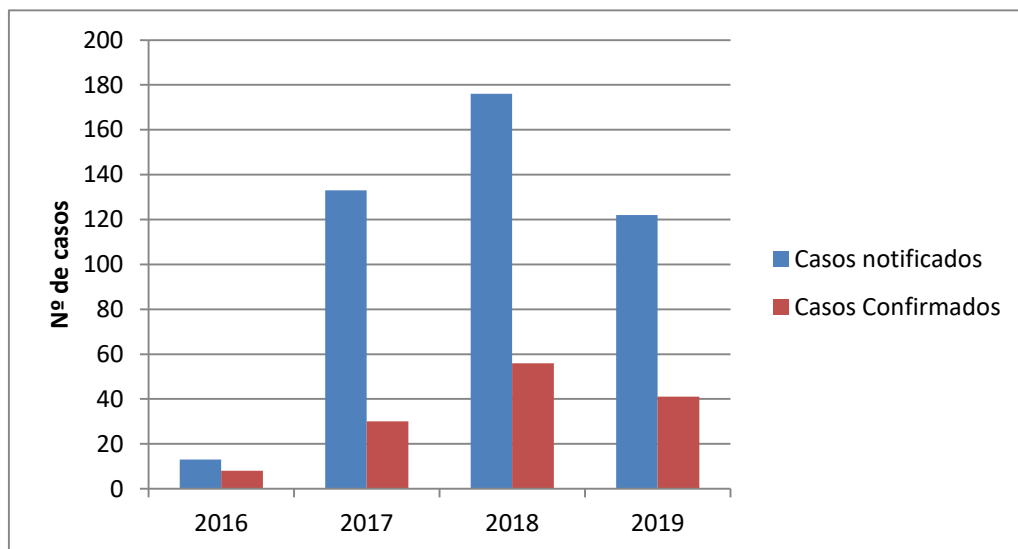


Figura 11. Bairros da cidade de Recife com caso(s) confirmado(s) para esporotricose.

Gráfico 1. Números de casos notificados e confirmados de 2016 a novembro/2019 em Pernambuco.



Fonte: Sinan/SES/PE.

Barros et al. (2010) relatam a falta de preparo dos profissionais dos sistemas público e privado para a identificação da esporotricose, o que reflete na demora para diagnóstico e terapêutica incorreta das vítimas.

Embora raramente leve a óbito, a esporotricose afeta a capacidade funcional dos doentes e autoestima, por causa do aspecto das lesões.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A obtenção do agente etiológico em cultura permanece o padrão ouro no diagnóstico da esporotricose.
- *Sporothrix brasiliensis* é a única espécie agente etiológico da esporotricose humana e felina diagnóstica nos casos de surto em município de Recife-Pernambuco.
- O método de PCR espécie-específica representa uma ferramenta acurada com especificidade de 100% para identificação dos 40 isolados de origem humana e 10 de felinos.
- Os fármacos itraconazol e terbinafina são eficazes em inibir o crescimento dos isolados *in vitro*, consequentemente os mais adequados na terapêutica.
- A infecção de transmissão zoonótica apresenta algumas mudanças no perfil epidemiológico, como a maior frequência no sexo feminino, ampla faixa etária e profissões.
- Os membros superiores permanecem os mais afetados mesmo nos casos de infecção zoonótica.
- O elevado número de casos de esporotricose na cidade de Recife, região Metropolitana e Grande Recife representa um alerta as autoridades de Saúde Publica do Estado de Pernambuco.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PAES, Rodrigo et al. Refractory sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in humans appears to be unrelated to in vivo resistance. **Medical mycology**, v. 55, n. 5, p. 507-517, 2016.
- ARAÚJO, Adjanna Karla Leite; LEAL, Carlos Adriano de Santana. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. **Pubvet**, v. 10, p. 795-872, 2016.
- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I. et al. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 7, p. 651-655, 2009.
- AUNG, Ar Kar et al. Pulmonary sporotrichosis: case series and systematic analysis of literature on clinico-radiological patterns and management outcomes. **Medical mycology**, v. 51, n. 5, p. 534-544, 2013.
- BARROS, Mônica Bastos de Lima et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 6, p. 777-779, 2001.
- BARROS, Mônica Bastos de Lima et al. An epidemic of sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: epidemiological aspects of a series of cases. **Epidemiology & Infection**, v. 136, n. 9, p. 1192-1196, 2008.
- BARROS, Monica Bastos de Lima et al. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 455-460, 2010.
- BARROS, Monica Bastos de Lima; DE ALMEIDA PAES, Rodrigo; SCHUBACH, Armando Oliveira. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 633-654, 2011a.
- BARROS, Monica Bastos de Lima et al. et al. Treatment of cutaneous sporotrichosis with itraconazole—study of 645 patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 12, p. e200-e206, 2011b.
- BIMBI, César; BRZEZIŃSKI, Piotr. Cutaneous sporotrichosis as an occupational disease: Case report. **Our Dermatology Online**, v. 8, n. 1, p. 37, 2017.
- BONIFAZ, Alexandro; TIRADO-SÁNCHEZ, Andrés. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. **Journal of Fungi**, v. 3, n. 1, p. 6, 2017.
- BONIFAZ, Alexandro; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: what are the options?. **Current Fungal Infection Reports**, v. 7, n. 3, p. 252-259, 2013.
- BONIFAZ, Alexandro; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, Denisse; PERUSQUÍA-ORTIZ, Ana María. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 8, n. 8, p. 619-628, 2010.

BONIFAZ, Alexandro et al. Sporotrichin Skin Test for the Diagnosis of Sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 2, p. 55, 2018.

BUSTAMANTE, Beatriz; CAMPOS, Pablo E. Sporotrichosis treatment: overview and update. **Current Fungal Infection Reports**, v. 5, n. 1, p. 42-48, 2011.

CAMACHO, Emma et al. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. **BMC infectious diseases**, v. 15, n. 1, p. 94, 2015.

CARMICHAEL, J. W. Chrysosporium and some other aleuriosporic hyphomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v. 40, n. 8, p. 1137-1173, 1962.

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

CIVILA, Eduardo S. et al. Importance of the direct fresh examination in the diagnosis of cutaneous sporotrichosis. **International journal of dermatology**, v. 43, n. 11, p. 808-810, 2004.

CLSI, C. 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi; Approved Standard—Second Edition—Document M38-A2.

COELHO, Letícia Maria Leomil et al. Effects of metaperiodate and urea solutions on the serological diagnosis of human sporotrichosis using an indirect ELISA test. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 139-145, 2019.

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

DE BEER, Z. Wilhelm; DUONG, Tuan A.; WINGFIELD, Michael J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. **Studies in mycology**, v. 83, p. 165-191, 2016.

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

DE OLIVEIRA, Luã Cardoso et al. Diagnostic performance of mycologic and serologic methods in a cohort of patients with suspected sporotrichosis. **Revista iberoamericana de micologia**, 2019.

DHINGRA, Deeksha et al. Sporotrichosis outbreak and mouldy hay in NSW. **Australian family physician**, v. 44, n. 4, p. 217, 2015.

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

DOHERTY, Christy Badgwell; DOHERTY, Sean D.; ROSEN, Theodore. Thermoherapy in dermatologic infections. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 62, n. 6, p. 909-927, 2010.

DONADEL, Kathia Welang et al. Esporotricose: revisão. **An Bras Dermatol**, v. 68, n. 1, p. 45-8, 49-52, 1993.

FALCÃO, Eduardo Mastrangelo Marinho et al. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. e00109218, 2019.

FERREIRA, Beatriz H. et al. Ploidy determination in the pathogenic fungus *Sporothrix* spp. **Frontiers in microbiology**, v. 10, 2019.

FIGUEIREDO, Camila Castro et al. The in vitro interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. **Microbial pathogenesis**, v. 36, n. 4, p. 177-188, 2004.

FRANCESCONI, Glaucia et al. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 349-354, 2011.

FONTES, Patrícia Campos et al. Sporotrichosis in an HIV-Positive Man with Oral Lesions. **Acta cytologica**, v. 51, n. 4, p. 648-650, 2007.

FREITAS, Dayvison Francis Saraiva et al. Sporotrichosis: an emerging neglected opportunistic infection in HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 8, p. e3110, 2014.

FREITAS, Dayvison FS et al. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. **Virulence**, v. 6, n. 2, p. 112-120, 2015.
GARCIA CARNERO, Laura Cristina et al. Immunity and treatment of sporotrichosis. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 3, p. 100, 2018.

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

GÓES-NETO, Aristóteles; LOGUERCIO-LEITE, Clarice; GUERRERO, Rosa Trinidad. DNA extraction from frozen fieldcollected and dehydrated herbarium fungal basidiomata: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**, v. 18, n. 2, p. 19-32, 2005.

GOLUBEV, Wladslav; SCORZETTI, Gloria. *Rhodotorula rosulata* sp nov., *Rhodotorula silvestris* sp. nov. and *Rhodotorula straminea* sp. nov., novel myoinositol-assimilating yeast species in the microbotryomycetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Miami, v. 60, n. 0, 2501-2506, out. 2010.

GOVENDER, Nelesh P. et al. An outbreak of lymphocutaneous sporotrichosis among mine-workers in South Africa. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 9, p. e0004096, 2015.

GUTIERREZ-GALHARDO, M. C. et al. Erythema multiforme associated with sporotrichosis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 19, n. 4, p. 507-509, 2005.

HAYASHI, Shujiro et al. Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction for diagnosing cutaneous sporotrichosis from paraffin-embedded skin tissue. **Mycoses**, 2019.

HEKTOEN, Ludvig; PERKINS, C. F. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. **The Journal of experimental medicine**, v. 5, n. 1, p. 77, 1900.

IBGE, 2019. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/recife>> Acessado em 07 de novembro de 2019.

JURANDIR, Dalcídio. **Chove nos campos de Cachoeira**. Edição crítica. 3ª edição. Belém: UNAMA, 1991.

KATOHK., STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol. Biol. Evol.** 30, 772–780, 2013.

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

KAUFFMAN CA. Sporotrichosis. *Clin Infect Dis*. 1999;(29):231-236.

KAWASAKI, Masako et al. New strain typing method with *Sporothrix schenckii* using mitochondrial DNA and polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) technique. **The Journal of dermatology**, v. 39, n. 4, p. 362-365, 2012.

KHAITAN, Binod et al. Successful treatment outcome with itraconazole and potassium iodide in disseminated sporotrichosis. **Indian journal of dermatology, venereology and leprology**, v. 84, n. 1, 2018.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. 1870-1874, 2016.

LACAZ, Carlos da Silva; PORTO, Edward; MARTINS, José Eduardo Costa; HEINSVACCARI, Elisabeth Maria; MELO, Natalina Takahashi de. **Tratado de micologia médica**. 9. Ed., São Paulo: Sarvier, 2002.

LACERDA FILHO, Armando Marsden et al. High-Virulence Cat-Transmitted Ocular Sporotrichosis. **Mycopathologia**, p. 1-3, 2019.

LARSSON, Carlos Eduardo. Carlos Eduardo Larsson: 40 anos de dedicação à Medicina Veterinária [Depoimento ao CRMV]. **Informativo CRMV-SP**, v. 26, n. 73, p. 8, 2019.

LI, Jie et al. Prevalence and antifungal susceptibility of *Sporothrix* species in Jiangxi, central China. **Medical mycology**, 2019.

LURIE, H. I. et al. Five unusual cases of sporotrichosis from South Africa showing lesions in muscles, bones, and viscera. **Brit. J. Surgery**, v. 50, n. 224, p. 585-591, 1963.

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

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

LUTZ, Adolpho; SPLENDORE, Alffonso. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. **Rev Med, São Paulo**, v. 10, p. 443-450, 1907.

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

MACÊDO-SALES, Pâmella Antunes et al. Diagnóstico laboratorial da esporotricose felina em amostras coletadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil: limitações da citopatologia por imprint. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 9, n. 2, p. 7-7, 2018.

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

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

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

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

MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: **2010 gateway computing environments workshop (GCE)**. Ieee, 2010. p. 1-8.

MYCOBANK. Disponível em:

<http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=39097> Acesso em: 21 de outubro de 2019.

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

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

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista et al. Evaluation of T3B fingerprinting for identification of clinical and environmental *Sporothrix* species. **FEMS microbiology letters**, v. 362, n. 6, p. fnv027, 2015a.

OLIVEIRA, Manoel Marques Evangelista et al. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. **Research in microbiology**, v. 166, n. 2, p. 102-110, 2015b.

OROFINO-COSTA, Rosane et al. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 396-402, 2013.

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

PERNAMBUCO: Secretaria Estadual de Saúde. Gabinete do Secretário. Portaria SES Nº 390, de 14 de setembro de 2016. Acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Diário Oficial do Estado de Pernambuco, em 15 de set. 2016. Seção 1, p. 26.

PUPPO, J. A. Frequência da sporotricose em São Paulo. **Ann. Paulistas Med. Cirurgia**, v. 8, p. 53-68, 1917.

RAMBAUT, Andrew. FigTree v1. 4. 2012.

RAMÍREZ-SOTO, M. C. Sporotrichosis: the story of an endemic region in Peru over 28 years (1985 to 2012). **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0127924, 2015.

RIPPON JW. Sporotrichosis. In: Rippon JW, ed. **Medical Mycology: The Pathogenic Fungi and the Pathogenic Actinomycetes**. Philadelphia; 1988:325-352.

RODRIGUES, Anderson Messias et al. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2281, 2013.

RODRIGUES, Anderson Messias; DE HOOG, G. Sybren; DE CAMARGO, Zoilo Pires. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 4, p. 383-387, 2014a.

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

RODRIGUES, Anderson Messias et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 219, 2014c.

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

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

ROSSATO, Luana et al. Proteins Potentially Involved in Immune Evasion Strategies in *Sporothrix brasiliensis* Elucidated by Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry. **mSphere**, v. 3, n. 3, p. e00514-17, 2018.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

RUBIO, Gustavo et al. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 75-79, 2010.

RUDRAMURTHY, Shivaprakash M.; CHAKRABARTI, Arunaloke. Sporotrichosis: Update on diagnostic techniques. **Current Fungal Infection Reports**, v. 11, n. 3, p. 134-140, 2017.

SANTI, M.M., Sanches, F.S., Silva, J.F.M., Santos, P.M.L. 2014. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 16 :256-261. Disponível: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722014000200014&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 Maio 2017.

SCHENCK, B.R. On refractory subcutaneous abcess caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. Bull. Johns Hopkins Hosp. v.9, p. 286-290, 1898. In Z.W. de Beer, T.A. Duong, M.J. Wingfield, The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship, Stud. Mycol. 83 (2016) 165–191.

SCHUBACH, Tânia MP et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998–2003). **Sabouraudia**, v. 44, n. 1, p. 87-92, 2006.

SCHUBACH, Armando; DE LIMA BARROS, Mônica Bastos; WANKE, Bodo. Epidemic sporotrichosis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SILVA, Margarete Bernardo Tavares da et al. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 28, n. 10, p. 1867-1880, 2012.

SILVA, Grasiene M. et al. Outbreak of feline sporotrichosis in the metropolitan area of Recife. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 9, p. 1767-1771, 2018.

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

TÉLLEZ, M. D. et al. Sporothrixschenckii complex biology: environment and fungal pathogenicity. **Microbiology**, v. 160, n. 11, p. 2352-2365, 2014.

THOMAS, Carmen C.; PIERCE, Harold E.; LABINER, Gerald W. Sporotrichosis responding to fever therapy. **Journal of the American Medical Association**, v. 147, n. 14, p. 1342-1343, 1951.

TRILLES, Luciana et al. In vitro antifungal susceptibilities of Sporothrix schenckii in two growth phases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3952-3954, 2005.

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

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

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

WIJAYAWARDENE, Nalin N. et al. Outline of ascomycota: 2017. **Fungal Diversity**, v. 88, n. 1, p. 167-263, 2018.

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

ZHANG, Shu; ZHANG, Yong-Jie; LI, Zhi-Liang. Complete mitogenome of the entomopathogenic fungus Sporothrix insectorum RCEF 264 and comparative mitogenomics in Ophiostomatales. **Applied microbiology and biotechnology**, p. 1-13, 2019.

Zaitz, C.; Campbell, I.; Marques, S.A.; Ruiz, L.R.B.; Framil, V.M.S. Compêndio de Micologia Médica. 2ª Ed.. Rio de Janeiro: Editora Guanabara – Koogan, 2010. 432 p

ANEXO A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Novo status da esporotricose: da doença negligenciada à intervenção robusta no diagnóstico e inovação terapêutica**”. Esta pesquisa é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) Rejane Pereira Neves, Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária – Recife/PE – 50.670.901, Recife-PE-Telefone (81) 2126 8000/ (81) 9958 9247; e-mail rejadel@yahoo.com, inclusive ligações a cobrar. Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em 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 o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa: Diagnosticar, notificar e prevenir casos de esporotricose no Estado de Pernambuco, bem como validar e desenvolver novas ferramentas para diagnóstico preciso e rápido desta micose, além de determinar as melhores formas de tratamento e busca por novas substâncias com potencial medicamentoso para cura desta doença.

Análise de riscos e benefícios diretos e indiretos para os voluntários e para a comunidade.

- Para a coleta das amostras biológicas, serão adotados métodos que não tragam riscos a saúde dos pacientes, uma vez que será realizada por profissionais qualificados/habilitados dos centros hospitalares. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico microbiológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, aos pacientes, poderá ser solicitada a captura de imagem (Fotografias) das lesões sem, entretanto, causar constrangimento aos mesmos uma vez que será assegurada a confidencialidade do indivíduo. Deste modo, o pesquisador se compromete com a manipulação de forma adequada de todo material obtido (amostras clínicas, fotografias), segura e com a manipulação adequada do prontuário e a confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil. No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.
- Os benefícios diretos e indiretos aos participantes da pesquisa e a comunidade incluem: os sujeitos envolvidos na pesquisa serão beneficiados diretamente com o diagnóstico de seu agente infeccioso, o que direcionará a um tratamento rápido e eficaz dos pacientes com esporotricose. Os dados advindos desta pesquisa proporcionarão a elaboração de estratégias públicas de combate e prevenção da esporotricose, uma vez que os dados estatísticos obtidos nortearão na identificação das populações e fatores de risco a fim de combatê-los de maneira mais efetiva. Adicionalmente, é garantido ao paciente o direito de receber todos os esclarecimentos antes e durante o transcurso da pesquisa, podendo afastar-se em qualquer momento se assim o desejar, estando assegurado o

absoluto sigilo das informações obtidas; Os preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 da CONEP serão respeitados e as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa, constarão no TCLE.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação do/a voluntário (a). Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador e do Orientador, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

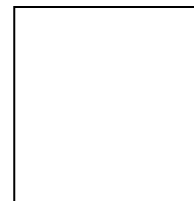
(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Novo status da esporotricose: da doença negligenciada à intervenção robusta no diagnóstico e inovação terapêutica”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Recife, ____/____/____

Assinatura do participante: _____



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

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(PARA ADULTOS NÃO ALFABETIZADOS OU JURIDICAMENTE INCAPAZES - Resolução 466/12)**

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “**Novo status da esporotricose: da doença negligenciada à intervenção robusta no diagnóstico e inovação terapêutica**”. Esta pesquisa é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) Rejane Pereira Neves, Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária – Recife/PE – 50.670.901, Recife-PE-Telefone (81) 2126 8000/ (81) 9958 9247; e-mail rejadel@yahoo.com, inclusive ligações a cobrar.

Este Termo de Consentimento pode conter alguns tópicos que o/a senhor/a não entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa a quem está lhe entrevistando, para que o/a senhor/a esteja bem esclarecido (a) sobre tudo que está respondendo. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, caso aceite em 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 o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. Também garantimos que o (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento da sua participação em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa: Diagnosticar, notificar e prevenir casos de esporotricose no Estado de Pernambuco, bem como validar e desenvolver novas ferramentas para diagnóstico preciso e rápido desta micose, além de determinar as melhores formas de tratamento e busca por novas substâncias com potencial medicamentoso para cura desta doença.

Análise de riscos e benefícios diretos e indiretos para os voluntários e para a comunidade:

Para a coleta das amostras biológicas, serão adotados métodos que não tragam riscos a saúde dos pacientes, uma vez que será realizada por profissionais qualificados/habilitados dos centros hospitalares. Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico microbiológico, independente de execução do projeto. Adicionalmente, aos pacientes, poderá ser solicitada a captura de imagem (Fotografias) das lesões sem, entretanto, causar constrangimento aos mesmos uma vez que será assegurada a confidencialidade do indivíduo. Deste modo, o pesquisador se compromete com a manipulação de forma adequada de todo material obtido (amostras clínicas, fotografias), segura e com a manipulação adequada do prontuário e a confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil. No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma.

Serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa amostras biológicas de pacientes que tiverem solicitação médica para diagnóstico microbiológico, independente de execução do projeto. Deste modo, o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada, segura e com a manipulação adequada do prontuário e a confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil. No entanto, será esclarecido ao paciente sobre o direito de não querer participar da pesquisa ou de desistir em qualquer etapa da mesma. Os benefícios diretos e indiretos aos participantes da pesquisa e a comunidade incluem: os sujeitos envolvidos na pesquisa serão beneficiados diretamente com o diagnóstico de seu agente infeccioso, o que direcionará a um tratamento rápido e eficaz dos pacientes com esporotricose. Os dados advindos desta pesquisa proporcionarão a elaboração de estratégias públicas de combate e prevenção da esporotricose, uma vez que os dados estatísticos obtidos nortearão na identificação das populações e fatores de risco a fim de combatê-los de maneira mais efetiva. Adicionalmente, é garantido ao paciente o direito de receber todos os esclarecimentos antes e durante o transcurso da pesquisa, podendo afastar-se em qualquer momento se assim o desejar, estando assegurado o absoluto sigilo das informações obtidas; Os

preceitos éticos preconizados na resolução 466/2012 da CONEP serão respeitados e as informações pertinentes às condutas éticas da pesquisa, constarão no TCLE.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação do/a voluntário (a). Os dados coletados nesta pesquisa, ficarão armazenados em pastas de arquivo e computador pessoal, sob a responsabilidade do pesquisador e do Orientador, no endereço acima informado pelo período de mínimo 5 anos.

O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: **(Avenida da Engenharia s/n – Prédio do CCS - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).**

Assinatura do pesquisador (a)

A rogo de _____, que é (não alfabetizado/juridicamente incapaz), eu _____ CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Novo status da esporotricose: da doença negligenciada à intervenção robusta no diagnóstico e inovação terapêutica”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Assinatura: _____

Local e data: _____

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

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura: