



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

**ESPOROTRICOSE EM PERNAMBUCO: DIAGNÓSTICO, DESCRIÇÃO
EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ANTIFÚNGICA DOS
ISOLADOS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii***

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

RECIFE

2021

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

**ESPOROTRICOSE EM PERNAMBUCO: DIAGNÓSTICO, DESCRIÇÃO
EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ANTIFÚNGICA DOS
ISOLADOS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii***

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

Área de Concentração: Micologia Médica

NOME: Carlos Alberto Tiburcio Valeriano

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

Coorientador(a): Dr. Esteban Espinosa Vidal

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

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso, CRB-4/1728

Valeriano, Carlos Alberto Tiburcio

Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica e antifúngica / Carlos Alberto Tiburcio Valeriano – 2021.

97 f.: il., fig., tab.

Orientador: Reginaldo Gonçalves Lima Neto

Coorientadores: Esteban Espinoza Vidal e Manoel Marques Evangelista de Oliveira

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexo.

1. Micoses fungóides 2. Antimicóticos 3. Epidemiologia I. Lima Neto, Reginaldo Gonçalves (orient.) II. Espinoza Vidal, Esteban (coorient.) III. Oliveira, Manoel Marques Evangelista de (coorient.) IV. Título

579.5

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2022-004

CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

**ESPOROTRICOSE EM PERNAMBUCO: DIAGNÓSTICO, DESCRIÇÃO
EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E ANTIFÚNGICA DOS
ISOLADOS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii***

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

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correias Magalhães (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Armando de Oliveira Schubach (Examinador Externo)
Fundação Oswaldo Cruz/RJ

Prof^o. Dr. Sandro Antonio Pereira (Examinador Externo)
Fundação Oswaldo Cruz/RJ

Prof^a. Dr^a. Luisa Helena Monteiro de Miranda (Examinadora externa)
University of Sydney/Austrália

Dedico esse trabalho a minha família e amigos, em especial a meu filho e esposa, e à memória e famílias das mais de 200.000 vítimas da pandemia de COVID-19 e de um governo negligente e genocida, no Brasil.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Ciência em Pernambuco (FACEPE) pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, em especial aos professores do Laboratório de Micologia Médica: Dr^a Oliane Magalhães, Dr^a Rejane Neves, e Dr. Armando Marsden.

Ao Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas por permitir a realização das coletas.

Ao Laboratório de Endemias de Pernambuco pelo fornecimento das amostras para análise.

Ao Orientador Professor Dr. Reginaldo Gonçalves, pelos ensinamentos e correções.

Ao Co-Orientador Dr. Manoel Oliveira, pelo suporte e colaboração nas análises realizadas.

À Dra. Cláudia Elise Ferraz pela colaboração no estudo dos casos de pacientes humanos.

À minha família, que sempre esteve presente nos momentos difíceis, em especial minha esposa Bárbara Valeriano, e meu filho Abner Valeriano, meus portos seguros; meus pais, José Valeriano e Isma Valeriano, e irmã, Iêda Valeriano, por todo apoio e incentivo, sem os quais eu jamais teria chegado até aqui. Amo vocês.

Aos amigos que acompanharam minha caminhada até aqui, ajudando nos momentos de medos e incertezas, e celebrando os momentos de conquistas, em especial a Alexandre Libanio do Reis, Bruna Rodrigues de Sousa, Jucieli Firmino de Freitas e Luiz Nascimento de Araújo Neto. Obrigado por tudo.

“Tenho sangrado demais
tenho chorado pra cachorro
Ano passado eu morri, mas esse ano eu não morro.” (BELCHIOR, 1976)

RESUMO

A esporotricose, é uma micose subcutânea causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii*, e apresenta distribuição mundial. *S. brasiliensis*, espécie endêmica do Brasil, é responsável pela epidemia no Rio de Janeiro, a qual apresenta como principal característica a transmissão zoonótica por acidente com gatos acometidos. Em Pernambuco, a esporotricose humana é doença de notificação compulsória. O presente trabalho teve o objetivo de *descrever* a epidemiologia da esporotricose em Pernambuco, bem como o perfil de sensibilidade antifúngica dos isolados obtidos e propor alternativas terapêuticas. Amostras clínicas de humanos foram obtidas por coleta micológica realizada em um hospital público, e isolados de *Sporothrix* sp. de felinos, através do Laboratório de Endemias de Pernambuco. O diagnóstico foi obtido por isolamento do patógeno e visualização de estruturas micomorfológicas. Isolados foram identificados genotipicamente por sequenciamento do gene CAL, e testes de sensibilidade antifúngica realizados pelo método de microdiluição em caldo. Extratos hidroalcoólicos de três espécies de plantas nativas do Nordeste foram testados contra os isolados clínicos. 59 casos de esporotricose humana e 51 de esporotricose felina foram descritos em Pernambuco, sendo *S. brasiliensis* a espécie prevalente, com apenas duas ocorrências de *S. schenckii* em humanos. A Região Metropolitana do Recife (RMR) apresentou maior ocorrência da esporotricose felina e humana com 99,99% e 91%, respectivamente, do total de casos. Recife e Olinda apresentaram o maior número de casos (26 em Recife e 49 em Olinda). A transmissão zoonótica ocorreu em 89,9% dos casos em humanos. As formas linfocutâneas e cutânea fixa foram as mais frequentes, e membros superiores os mais afetados (58,9%). O Gênero feminino foi o mais acometido (74,6% dos casos), sendo aposentadas e trabalhadoras do lar as mais afetadas. Gatos machos foram os mais acometidos (75%), ocorrendo lesões disseminadas em 29,7% dos casos. Isolados clínicos apresentaram sensibilidade a três antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose: itraconazol (1 µg/mL para ambas as espécies), anfotericina B (1,3 µg/mL para *S. brasiliensis* e 0,7 µg/mL para *S. schenckii*) e terbinafina (0,3 µg/mL para *S. brasiliensis* e 1,25 µg/mL para *S. schenckii*), com alguns casos de resistência de *S. brasiliensis* a itraconazol e terbinafina. Todos os extratos apresentaram atividade frente às duas espécies identificadas, com melhor atividade apresentada pelo extrato de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) com CIM média de 3 µg/mL para *S. brasiliensis* e 2 µg/mL para *S. schenckii*. A esporotricose em Pernambuco apresenta características epidemiológicas semelhantes às apresentadas em surtos descritos no Brasil, representando um problema de saúde pública. *S. brasiliensis* é a espécie prevalente associada à transmissão zoonótica, e apresenta emergência na resistência a antifúngicos. Extratos naturais se apresentam como potenciais propostas terapêuticas para tratamento da esporotricose no futuro.

PALAVRAS-CHAVE: Esporotricose; Epidemiologia; *Sporothrix*; Zoonose; Antifúngicos.

ABSTRACT

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis caused by fungi of *Sporothrix schenckii* complex, which show global distribution. *S. brasiliensis*, Brazil endemic specie, is the major pathogen in Rio de Janeiro epidemic, where the main transmission way is the zoonotic transmission, due bites, or scratches by sick cats. In Pernambuco, human sporotrichosis is a compulsory notification disease. The present study aimed to describe an epidemiology of sporotrichosis in Pernambuco, as well as the antifungal sensitivity profile of those granted and alternative therapeutic proportions. Clinical samples from humans were created by mycological collection carried out in a public hospital, and from *Sporothrix* sp. of felines, through the Pernambuco Endemic Laboratory. The diagnosis was established by isolating the pathogen and visualizing mycomorphological structures. Isolates were identified genotypically by sequencing the CAL gene, and antifungal sensitivity tests performed by the broth microdilution method. Hydroalcoholic extracts of three species of plants native to the Northeast were tested against those granted. 59 cases of human sporotrichosis and 51 of feline sporotrichosis were reported in Pernambuco, with *S. brasiliensis* being a prevalent species, with only two occurrences of *S. schenckii*. The Metropolitan Region of Recife (RMR) has a higher occurrence of feline and human sporotrichosis with 99.99% and 91%, respectively, in RMR. Recife and Olinda independent the highest number of cases (26 in Recife and 49 in Olinda). Zoonotic transmission occurred in 89.9% of cases in humans. Lymphocutaneous and fixed cutaneous forms were the most frequent, and upper limbs the most affected (58.9%). The female gender was the most affected (74.6% of the cases), with retired workers and house workers being the most affected. Male cats were the most affected (75%), with widespread lesions occurring in 29.7% of cases, mainly on the head (59.2%) and snout (45.8%). Clinical isolates to three antifungals used to treat sporotrichosis: itraconazole (1 µg/mL for both species), amphotericin B (1.3 µg/mL for *S. brasiliensis* and 0.7 µg/mL for *S. schenckii*) and terbinafine (0.3 µg/mL for *S. brasiliensis* and 1.25 µg/mL for *S. schenckii*), with some cases of *S. brasiliensis* resistance to itraconazole and terbinafine. All extracts loaded against the two identified species, with the best activity presented by the aroeira extract (*Schinus terebinthifolius*) with an average MIC of 3 µg/mL for *S. brasiliensis* and 2 µg/mL for *S. schenckii*. Sporotrichosis in Pernambuco has epidemiological characteristics to appearances in outbreaks in Brazil, representing a public health problem. *S. brasiliensis* is a prevalent type associated with zoonotic transmission and presents an emergency resistance to antifungals. Natural extracts are intended for therapeutic proposals for the treatment of sporotrichosis in the future.

KEYWORDS: Sporotrichosis; Epidemiology; *Sporothrix*; Zoonosis; Antifungals.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1- Diagnóstico laboratorial da esporotricose. A) Preparação em lactofenol azul de algodão evidenciando estruturas micomorfológicas da fase filamentosa de *Sporothrix* sp. Magnificação: 400x. B) Preparação panóptica evidenciando células leveduriformes de *Sporothrix* sp em exsudato nodular (setas). Magnificação: 1000x. C) Preparação em KOH 20% evidenciando células leveduriformes de *Sporothrix* sp. em fragmento de tecido da lesão. Magnificação 400x. Fonte: O autor..... 49
- FIGURA 2- Mapa de Pernambuco indicando as cidades com casos registrados de esporotricose humana entre 2017 e 2018. Os pontos de aquecimento mostram que a cidade de Recife apresentou uma frequência elevada da esporotricose. A cidade de Olinda apresentou uma frequência de moderada para alta. As cidades de Paulista e Camaragibe apresentam uma frequência de moderada para baixa. As cidades de Vitória de Santo Antão, Jaboatão, Macaparana, Água Preta e Nazaré da Mata apresentam uma frequência baixa..... 51
- FIGURA 3- Distribuição espacial de casos de esporotricose humana na Região Metropolitana do Recife. As áreas marcadas em cinza destacam a região afetada, e as marcações em verde representam cada caso de esporotricose nos bairros demarcados..... 52
- FIGURA 4-. Manifestações clínicas e reações de hipersensibilidade da esporotricose. A: quadro conhecido como linfangite nodular ascendente, típico da forma linfocutânea da esporotricose. B: Lesão única formada a partir do cancro de inoculação, típica da forma cutânea fixa da esporotricose. C: múltiplas lesões nodulares e ulcerativas, quadro típico da forma cutânea disseminada. D) reação inflamatória formando placas eritematosas (eritema nodoso). E) Lesões pseudovesiculares sobre placa eritematosa, quadro conhecido com síndrome de Sweet. Fonte: Ferraz, C.E..... 53
- FIGURA 5- Mapa de Pernambuco indicando as cidades com casos registrados de esporotricose felina entre 2017 e 2018. Os pontos de aquecimento mostram que a cidade de Olinda apresentou uma frequência elevada da esporotricose.

	As demais cidades (Camaragibe, Vitória de Santo Antão, Jaboatão, Recife e Abreu e Lima) apresentam uma frequência de moderada para baixa.....	55
FIGURA 6-	Distribuição espacial de casos de esporotricose felina na Região Metropolitana do Recife. As áreas marcadas em cinza destacam a região afetada, e as marcações em verde representam cada caso de esporotricose nos bairros demarcados.....	56
FIGURA 7-	Filograma da região do gene CAL de amostras de <i>Sporothrix</i> sp. obtidas de humanos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que 33 dessas amostras pertencem a espécie <i>S. brasiliensis</i> e duas a <i>S. schenckii</i> . A análise de <i>Bootstrap</i> , replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.....	58
FIGURA 8-	Filograma da região do gene CAL de amostras de <i>Sporothrix</i> sp. obtidas de felinos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que todas as 16 amostras pertencem a espécie <i>S. brasiliensis</i> . A análise de <i>Bootstrap</i> , replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.....	59
FIGURA 9-	Filograma da região do gene CAL de amostras de <i>Sporothrix</i> sp. obtidas de felinos e humanos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que os isolados de <i>S. brasiliensis</i> e <i>S. schenckii</i> de Pernambuco, apresentam pouca diversidade em relação a cepas dessas espécies originárias de outros estados do Brasil. A análise de <i>Bootstrap</i> , replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.....	60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Epidemiologia da esporotricose na Ásia.....	22
TABELA 2-	Epidemiologia da esporotricose na África e na Europa.....	24
TABELA 3-	Epidemiologia da esporotricose na América Latina e EUA.....	35
TABELA 4.-	Distribuição e incidência de casos de esporotricose humana em Pernambuco entre agosto de 2017 e agosto de 2018.....	58
TABELA 5-	Distribuição e incidência de casos de esporotricose felina em Pernambuco entre agosto de 2017 e agosto de 2018.....	63
TABELA 6-	Identificação genotípica de isolados clínicos de <i>Sporothrix</i> sp.....	65
TABELA 7-	Descrição das características prevalentes dos casos registrados de esporotricose humana e felina em Pernambuco entre 2017 e 2018.....	66
TABELA 8-	Valores de CIM de sete fármacos antifúngicos frente a 38 isolados clínicos de <i>S. brasiliensis</i> e duas de isolados clínicos de <i>S. schenckii</i>	67
TABELA 9-	Atividade anti- <i>Sporothrix</i> de três extratos hidroalcóolicos de plantas.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANFOB- Anfotericina B

AGITEC- Agência Embrapa de Informação Tecnológica

β -tub- Gene da β -tubulina

BDA- Batata Dextrose Ágar

BHI- *Brain Heart Infusion*

BLAST- *Basic Local Alignment search tool*

CAL- Gene da calmodulina

CETO- Cetoconazol

CIM- Concentração Inibitória Mínima

CLSI- *Clinical Laboratory of Standardization Institute*

DMSO - Dimetilsulfóxido

ECV- *Epidemiological Cutoff Value*

FLUCO- Fluconazol

FNEM- Fórum Nacional de Entidades Metropolitanas

GIS- *Geographic Information System*

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHC - Imuno-Histoquímica

IL1- β - Interleucina 1- β

INI/IPEC- Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas

ITC- Itraconazol

ITS- *Internal Transcribed Spacer*

KI- Iodeto de Potássio

KOH- Hidróxido de Potássio

LABEND/PE- Laboratório de Endemias de Pernambuco

LACEN/PE- Laboratório Central de Pernambuco

MEGA- *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*

MV- Máxima Verossimilhança

NCBI- *National Center of Biotechnology Information*

PAS- *Periodic Acid of Schiff*

PCR- *Polymerase Chain Reaction*/ Prefeitura da Cidade do Recife

PNS- Pesquisa Nacional em Saúde

RMR- Região Metropolitana do Recife

RPMI- *Roswell Park Memorial Institute*

SDA- Sabouraud Dextrose Ágar

SEVS- Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde

TBF- Terbinafina

TCLE- Termo de Consentimento Live e Esclarecido

TGF- β - *transforming growth factor- β*

UFC- Unidade Formadora de Colônia

URM- *University of Recife Mycology*

VORI- Voriconazol

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	
2.2 Objetivos específicos	
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
3.1 Esporotricose: Histórico, epidemiologia e incidência global	
3.1 Ásia.....	19
3.1.2.1 China	20
3.1.2.2 Japão	
3.1.1.3 Índia	21
3.1.1.4 Malásia	22
3.1.2 África	23
3.1.3 Europa	24
3.1.4 América latina e EUA.....	25
3.1.4.1 EUA	
3.1.4.2 América Latina	
3.2 Epidemiologia da esporotricose no Brasil	27
3.3 Ecologia, Taxonomia e fatores de virulência do complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	30
3.4 Manifestações clínicas	35
3.5 Diagnóstico: da clínica à biologia molecular	37
3.6 Tratamento: métodos convencionais e perspectivas terapêuticas	41
3.6.1 Antifungigrama e perfil de sensibilidade do Complexo <i>Sporothrix schenckii</i>	
3.6.2 Tratamentos convencionais.....	42
3.6.3 Novas alternativas terapêuticas.....	43
4 METODOLOGIA	44
4.1 Aspectos éticos	
4.2. Obtenção das amostras	
4.3. Processamento das amostras	45
4.4. Teste de sensibilidade antifúngica	
4.5. Análise genotípica	46
4.5.1. Extração e quantificação de DNA	
4.5.2. Sequenciamento parcial do gene CAL	
4.5.3 Análise filogenética.....	47

4.6 Análise de dados.....	48
5 RESULTADOS	
5.1 Diagnóstico	
5.2 Descrição epidemiológica.....	49
5.2.1 Esporotricose humana	
5.2.1.1 <i>Distribuição geográfica</i>	
5.2.1.2 <i>Manifestações clínicas, forma de contágio, sítio de lesão, gênero, idade e ocupação prevalentes.....</i>	52
5.2.2 Esporotricose felina.....	53
5.2.2.1 <i>Distribuição geográfica</i>	
5.2.2.2 <i>Manifestações clínicas, sítios de lesão, e perfil dos animais acometidos.....</i>	56
5.3 Caracterização genotípica	
5.4 Perfil de sensibilidade antifúngica.....	61
5.5 Atividade anti-<i>Sporothrix</i> de extratos de plantas.....	63
6 DISCUSSÃO	
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICES.....	90
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)	
APÊNDICE B- TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12).....	92
ANEXOS.....	95
ANEXO A- Parecer consubstanciado	

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea de distribuição global que afeta seres humanos e animais. Causada por fungos termodimórficos do Complexo *Sporothrix schenckii*, apresenta quatro formas clínicas: Cutâneo-linfática (mais comum); cutânea localizada; cutânea disseminada e extra-cutânea, que está mais associada à deficiência imunológica do indivíduo infectado (Ramos-e-Silva et al., 2007). Nas formas cutâneas da doença, o contágio se dá através da inoculação do propágulo fúngico via lesão perfurante, acometendo, geralmente, profissionais como jardineiros e paisagistas, além de outros que trabalham com materiais perfuro-cortantes, ou por via zoonótica, através de acidentes com animais infectados, especialmente arranhadura ou mordedura de gatos (Mahajan, 2014; Gremião et al. 2017).

A esporotricose foi atribuída à ação de um fungo por Schenk (1898), que sistematizou inicialmente o patógeno no gênero *Sporotricha*. Posteriormente, Hektoen e Perkins (1900) identificaram o agente da doença como *Sporothrix schenckii*.

Fungos do gênero *Sporothrix* vivem como sapróbio na natureza em sua forma filamentosa, apresentando-se leveduriforme a 37°C *in vitro* ou em tecidos vivos de mamíferos (Orofino-Costa et al. 2017).

Análises genômicas de isolados clínicos e ambientais de cepas do gênero *Sporothrix* evidenciam que este se divide em 51 táxons sistematizados em seis Complexos de espécies crípticas, dividido em dois grandes clados, sendo um clado clínico, formado pelo Complexo *Sporothrix schenckii*, o qual foi proposto inicialmente por Marimon et al. (2007, 2008), e um ambiental composto por cinco Complexos: *S. pallida*, *S. candida*, *S. inflata*, *S. gossypina* e *S. stenoceras* (Orofino-Costa et al. 2017). O Complexo *Sporothrix schenckii* é composto por quatro espécies de patogenicidade conhecida: *Sporothrix schenckii sensu stricto*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (Orofino-Costa et al. 2017).

Desde 1990, muitos casos de esporotricose têm ocorrido na Região Sudeste do Brasil, especialmente no Rio de Janeiro, devido à transmissão zoonótica através da inoculação do fungo em indivíduos humanos, por arranhaduras ou mordeduras de gatos acometidos, perfil epidemiológico da micose predominante no Brasil (Barros, Almeida-Paes e Schubach, 2011; Gremião et al., 2017). Em 2014, um surto de esporotricose felina foi descrito na região metropolitana de Recife, Pernambuco (Nogueira, 2014). Desde então, diversos casos da doença foram registrados em laboratórios de referência do Estado de Pernambuco como o Laboratório Central de Pernambuco (LACEN/PE), Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos (Departamento de Micologia/ UFPE), e no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco, o que fez a Secretaria do Estado de

Pernambuco emitir a Portaria SES/PE Nº390 de 14/09/2016, tornando a esporotricose uma doença de notificação obrigatória em humanos em Pernambuco,

Diante disso, o presente trabalho visa descrever o perfil epidemiológico da esporotricose no estado de Pernambuco, verificar o perfil de sensibilidade de isolados de humanos e animais do Complexo *Sporothrix schenckii* obtidos de casos de pacientes humanos e felinos no estado, bem como propor novas alternativas terapêuticas no tratamento da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o perfil epidemiológico da esporotricose em Pernambuco, bem como descrever o perfil de sensibilidade de isolados de *Sporothrix* sp. obtidos de humanos e felinos no Estado e propor novas alternativas terapêuticas.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os isolados de *Sporothrix* sp. obtidos de humanos, provenientes do Hospital das Clínicas de Pernambuco, e de gatos, oriundos do Laboratório de Endemias (LABEND), por análise polifásica;
- Descrever a frequência das espécies identificadas, considerando o município de origem da cepa e a manifestação clínica da doença;
- Correlacionar filogeneticamente as espécies do complexo *Sporothrix schenckii* isoladas de humanos e gatos de diferentes regiões do estado de Pernambuco;
- Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados de *Sporothrix* sp. frente a iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol, fluconazol, voriconazol, cetoconazol e terbinafina, bem como propor novas alternativas terapêuticas através de testes com extratos hidroalcoólicos de *Schinus terebinthifolius*, *Anadenanthera colubrina* e *Libidibia ferrea*;
- Implementar o acervo da Coleção de Culturas URM com isolados caracterizados do complexo *Sporothrix schenckii*.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Esporotricose: Histórico, epidemiologia e incidência global

Em 1896, Benjamin Robinson Schenck observou um paciente de 36 anos de idade que apresentava lesão na mão e braço direito e ulcerações no local, as quais ascenderam pelo seu braço após algum tempo. O agente etiológico da doença foi então isolado por Erwin Smith a partir de secreções drenadas dessas lesões, crescendo em meio de cultura, e sistematizado no gênero *Sporotrichum*. Inicialmente, Schenck sistematizou o agente (um fungo) no gênero *Sporotricha* (Schenck, 1898). Anteriormente, Linck em 1809 e Lutz em 1889, relataram casos que possivelmente seriam de esporotricose, porém não ocorreu o isolamento do fungo por estes pesquisadores para estes casos (Barros, Paes e Schubach, 2011). Em 1900, Hektoen e Perkins isolaram um agente semelhante ao do caso estudado por Schenck, a partir de lesões de um paciente que sofreu um acidente com um martelo, acertando seu dedo. Esse paciente desenvolveu uma ulceração no local do trauma, a qual apresentava uma depressão central e eritematosa, liberando uma secreção purulenta e refratária ao tratamento. O agente isolado foi incluído por estes cientistas no gênero *Sporothrix* e, em homenagem a Schenck, a espécie recebe o nome de *Sporothrix schenckii* (Hektoen e Perkins, 1900).

Segundo Chakrabarti et al. (2015), devido a mudanças emergentes em sua epidemiologia, distribuição, evolução taxonômica e múltiplos surtos, a esporotricose tem emergido como a maior infecção fúngica nas últimas duas décadas. É considerada uma micose de ampla distribuição mundial, com casos registrados desde 1898 em diversos países como, EUA, França, Rússia, México, Portugal, Japão, Índia, Peru e outros países da Europa e América do Sul, inclusive o Brasil (Sidrim e Rocha, 2004).

Esses múltiplos surtos vêm sendo relatados ao longo dos tempos, porém não apresentando grandes proporções, limitando-se a casos isolados e pequenos surtos em grupos específicos como: famílias, trabalhadores rurais, laboratoristas, profissionais de saúde (Oliveira et. al., 2011), expostos a fontes de infecção como matéria orgânica em decomposição, solo, materiais perfurocortantes contaminados e animais infectados (Hajjeh et. al., 1997; Kovarik e Neyra, 2007; Oliveira et. al., 2013a), caracterizando-se como uma doença associada a atividades laborais e às condições sociais e ambientais da região (Queiroz-Telles et al., 2011). Entretanto, essa característica de transmissão do patógeno tem se modificado, uma vez que a transmissão zoonótica, através de mordidas e arranhões de felinos com esporotricose tem se apresentado de forma mais frequente, especialmente no Brasil (Gremião et al., 2017).

3.1.1 Ásia

A região conhecida como Ásia-Pacífico, que compreende países como China, Austrália, Nepal, Japão, Índia, Malásia e outros, é apontada como endêmica de diversas infecções fúngicas importantes como histoplasmose, balstomicose e a esporotricose (Chakrabarti e Slavin, 2011).

Nor e Baseri (2015) apontam região sudeste da Ásia como endêmica não só da esporotricose, mas também de outras infecções como peniciliose, melioidose e infecção por *Mycobacterium marinum*. Um dos principais fatores para ocorrência dessas infecções nessa região está relacionado às características ecológicas como: clima tropical, ocorrência da temperatura variando entre 26 e 27°C e alta umidade (Chakrabarti e Slavin, 2011; Nor e Baseri, 2015).

Na Ásia, o primeiro relato de esporotricose em humano foi registrado por Liu (1956), na China, onde uma mulher de 36 anos apresentava lesão no antebraço esquerdo, ocorrendo envolvimento pulmonar.

Neste continente existe uma ocorrência de moderada para alta da esporotricose, especialmente entre indivíduos do sexo feminino, devido à relação desses com a atividade agrícola, com destaques para Japão, Índia e China (Tabela 1).

3.1.1.1 China

A região Nordeste da China é considerada uma região endêmica da esporotricose, com destaque para província de Jilin, a qual registrou entre 2007 e 2009 457 casos da micose (Song et al., 2011; Chakrabarti et al., 2015). Nesse mesmo período, Li et al. (2011) realizaram um levantamento onde foram observados 585 casos de esporotricose nessa mesma província registrados no departamento de dermatologia de um hospital. Esse dado apresenta-se bastante significativo no que diz respeito à incidência da esporotricose nessa região, uma vez que uma grande ocorrência de casos no país só foi observada entre os anos de 1972 e 2007 e ainda assim, em número menor que o da província: 447 (Zhang e Lin, 2008).

Outras províncias da região Nordeste chinesa que apresentam casos da micose, porém de forma esporádica, são Heilongjiang e Liaoning (Yu et al., 2013).

Liu, Zhang e Zhou (2013) realizaram estudo molecular de 64 cepas de *Sporothrix* sp. originárias da China as quais eram advindas, além da região de maior ocorrência (Jilin), de Chongqing (25) e de Beijing (13) das quais, todas foram identificadas como *S. globosa*.

3.1.1.2 Japão

O Japão apresenta uma ocorrência moderada da esporotricose, a qual se apresenta como a micose subcutânea de maior incidência no país (Chakrabarti et al., 2015). Segundo Fukushiro (1984), apenas 13 casos da doença haviam sido registrados antes do fim da segunda guerra mundial. Neste mesmo estudo, o autor realizou um levantamento de trabalhos relatando casos de esporotricose no Japão entre os anos de 1946 e 1983, e constatou a ocorrência de 2.500 casos da doença tendo

considerado que, o aumento exponencial da incidência da micose no país estaria relacionado ao fato de que os dermatologistas passaram a se interessar pelo estudo desta infecção fúngica (Fukushiro, 1984). Ainda sobre esse estudo, pode-se considerar que esse número pode ser ainda maior no contexto relatado visto que, foi feita uma revisão de apenas quatro artigos, sendo dois do próprio autor. Porém, Itoh, Okamoto e Kariya (1986) relatam a ocorrência de 200 casos de esporotricose na cidade de Chiba, entre os anos de 1965 e 1983. Já no estudo de Kusuhara, Hachisuka e Sasai (1988) foram relatados 150 casos da micose entre os anos de 1962 e 1986 na ilha de Kyushu. As cidades de Tokyo, Tsukuba e Saitama também apresentam registros de ocorrência da esporotricose (Hiruma et al., 1987; Takase e Uyeno et al., 1990; Noguchi, Hiruma E Kawada, 1999).

No Japão, assim como na China, *Sporothrix globosa* é a espécie mais frequente (Suzuki et al., 2016).

Chakrabarti et al. (2015) relatam que, nos últimos anos, o número de casos no Japão reduziu drasticamente possivelmente devido a mudanças nas práticas agrícolas, onde o indivíduo teria menos contato com o solo, e a mudanças demográficas na população japonesa, como a redução do número de crianças propensas a adquirir a doença. Segundo Sei et al. (2012), em 2006, de 8717 dermatomicoses registradas no Japão, apenas quatro foram casos de esporotricose.

3.1.1.3 Índia

Na Índia, o primeiro caso de esporotricose foi registrado por Panja, Dey e Ghosh (1947) em uma mulher em Calcutá. Nesse país, a micose apresenta endemicidade nas regiões Sub-Himalaia com destaque para o estado de Himachal Pradesh no Nordeste da Índia (Ghosh et al., 1999; Mahajan et al., 2005; Mehta et al., 2007). Verma et al. (2012) realizaram estudo retrospectivo de casos de esporotricose entre os anos de 1992 e 2010, advindos de Himachal Pradesh onde, 305 amostras foram consideradas de possíveis casos clínicos de esporotricose, dos quais, em 100, foi obtida a confirmação do agente em cultura, o qual foi identificado como *Sporothrix schenckii* com base nas características de crescimento, macro e micromorfologia e termodimorfismo.

Devi et al. (2006) relatam a ocorrência de 73 casos entre os anos de 1999 e 2005 em Manipur, e apontaram a região como nova área endêmica da esporotricose na Índia. A Índia registra um dos poucos casos de morte devido à esporotricose (Padhye et al., 1992). Nesse caso, o agente causador da doença foi identificado com *Sporothrix schenckii* var. *luriei*, tendo a paciente desenvolvido acometimento pulmonar grave.

Outros países asiáticos com casos de esporotricose relatados são Tailândia, onde o primeiro registro da doença data de 1990 (Kwangsukstith et al., 1990); e Malásia, onde existe uma grande ocorrência de registros de felinos acometidos (Kano et al., 2015; Siew, 2017).

3.1.1.4 Malásia

A forma felina da esporotricose tem gerado impacto no perfil epidemiológico da doença na Malásia, onde casos de transmissão zoonótica apresentam-se de forma bastante significativa, sendo reportados casos de forma felina desde 1990 (Zamri-Saad et al., 1990; Siew, 2017). Tang et al. (2012) relataram que, entre os anos de 2004 e 2010, 19 casos de esporotricose no país foram descritos, onde sete desses ocorreram devido a mordidas ou arranhões de gatos acometidos.

Rathiyamaler Zamri-Saad e Annas (2017), num levantamento de casos de mortes de cães e gatos na Malásia, identificaram que dentre 866 dessas mortes, 104 foram em decorrência de esporotricose.

O estudo de Siew (2017) aponta que o agente prevalente nos casos de esporotricose na Malásia trata-se de uma linhagem clonal única de *S. schenckii stricto sensu*, resultante de um processo seleção purificada.

Um resumo da epidemiologia da esporotricose na Ásia está descrito na tabela 1.

Tabela 1. Epidemiologia da esporotricose na Ásia

Autor	País	Casos registrados	Espécie prevalente	Forma de contágio	Forma clínica prevalente	Hospedeiro	Grupos prevalentes (humanos)		
							Gênero	Idade	Ocupação
Fukushiro, 1984; Carlos e Batista-Duarte, 2015;	Japão	3655	<i>Sporothrix globosa</i>	Contato com solo e plantas	Cutânea fixa	Humano	Mulheres	12-40 anos	Agricultura
Chakrabarti et al., 2015; Zhang et al., 2015; Suzuki et al., 2016. Zhang e Lin, 2008; Song et al., 2011; Liu, Zhang e Zhou, 2013; Zhang et al., 2015.	China	3299	<i>S. globosa</i>	Contato com solo/ casos esporádicos de transmissão zoonótica	Cutânea fixa	Humano e animal	Mulheres	Média de 41,2 anos	Agricultura
Padhye et al., 1992; Zhang et al., 2015.	Índia	622	<i>S. globosa</i> e <i>Sporothrix schenckii</i> var. <i>luriei</i>	Contato com solo, plantas e objetos contaminados	Linfocutânea	Humano	Mulheres	21-40 anos	Agricultura/ Profissionais de saúde/ jardineiros
Zamri-Saad et al., 1990; Tang et al., 2012; Rathiyamaler, Zamri-Saad e Annas, 2017; Siew, 2017.	Malásia	126	<i>Sporothrix schenckii</i>	Transmissão zoonótica	Cutânea fixa/ Linfocutânea	Humano e animal	Ambos	7-45 anos	

3.1.2 África

A África apresenta registros pontuais da esporotricose, porém, segundo Chakrabarti et al. (2015), isso provavelmente ocorre devido ao baixo número de micologistas no continente, havendo, portanto, uma subnotificação da doença e pouco conhecimento sobre sua distribuição neste continente.

Os primeiros relatos de casos de esporotricose no continente africano datam dos anos 10 e 20, havendo sido descrito um pequeno surto da doença em 14 trabalhadores da mina de Witerwatersand, estado de Transvaal, África do Sul (Pijper e Pullinger, 1927) e um grande surto em 100 trabalhadores da mesma mina em 1910 relatado por Beurmann e Gougerot (1912, *apud* Quintal, 2000). Essa mina registra o maior surto de esporotricose na África, com 3.000 casos da micose entre 1938-1947 (Chakrabarti et al., 2015; Govender et al., 2015) devido à ocorrência de *Sporothrix schenckii* na madeira da mina, onde o fungo encontra condições de temperatura e umidade adequadas ao seu crescimento (Quintal, 2000).

Vismer e Hull (1997) relatam a ocorrência de 154 casos de esporotricose em Petroria, África do Sul, na província de Gauteng entre pessoas de 1 a 90 anos de idade, maioria homens. A maior ocorrência no sexo masculino se dá devido a questões laborais, pois muitos desses indivíduos eram também trabalhadores de mina de ouro.

Surto recente em mina de ouro também é relatado por Govender et al. (2015), onde 17 trabalhadores foram diagnosticados com a micose. Esse caso também ocorreu na África do Sul.

Dados epidemiológicos da doença no continente africano estão resumidos na tabela 2.

3.1.3 Europa

O primeiro caso de esporotricose na Europa ocorreu na França em 1903, sendo 250 casos da doença registrados no país nove anos depois por Beurmann e Gougerot (1912, *apud* Carlos e Batista-Duarte, 2015). Apresenta baixa incidência nesse continente, onde a maioria dos casos são decorrentes da imigração ou de nativos que viajaram para outros países e contraíram a doença (Dias et al., 2011; Drogari-Apiranthitou et al. 2014; Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz, 2017) (Tabela 2). Entre 1976 e 1988, apenas 44 casos de esporotricose haviam sido registrados na Europa (Alberici et al., 1989), porém Pinkus e Grekin (1950) haviam relatado um caso de esporotricose no continente europeu antes do referido período.

França (Magand et al., 2009) (caso autóctone) e Portugal (Dias et al., 2011) (após viagem) registram casos de esporotricose, onde o agente causador foi identificado como sendo da espécie *Sporothrix mexicana*.

A Itália é o país europeu com maior número de casos da doença registrados (Alberici et al., 1989; Cafarchia et al., 2007; Criseo, Zungri e Romeo 2008). Segundo Carlos e Batista-Duarte (2015) a Europa, excetuando a Itália, não havia registrado mais que 55 casos até 2015, porém este país registrou 58 casos no mesmo período.

A baixa ocorrência da esporotricose na Europa fica evidenciada no estudo realizado por Romeo, Scordino e Criseo (2011), onde foram analisadas 26 amostras de *Sporothrix* sp., das quais duas amostras clínicas foram originalmente isoladas na Itália (Criseo e Romeo, 2010), e as demais amostras, ambientais e clínicas, eram de diferentes países de origem, inclusive do Brasil. O mesmo trabalho demonstra a ocorrência de *S. globosa* como espécie mais frequente, com casos na Espanha e no Reino Unido. Em 2014, Oliveira et al. relatam o primeiro caso de esporotricose autóctone em Portugal causado por *S. globosa*. Nesse trabalho, os autores descrevem a esporotricose como doença subnotificada no Sul da Europa, região indicada como área emergente dessa infecção fúngica.

Apesar da ocorrência mais frequente de *S. globosa* nos casos relatados, não se pode dizer que esta é uma espécie prevalente na Europa, pois além de o continente registrar poucos casos da doença, com ocorrência de *S. mexicana* e *S. schenckii*, a maioria desses ocorreu após viagem, podendo-se inferir que essas cepas não são necessariamente originárias desse continente (ZHANG et al., 2015). Além disso, em poucos desses casos foi feita identificação molecular dos isolados obtidos.

Tabela 2. Epidemiologia da esporotricose na África e na Europa.

Autor	Continente	Casos registrados	Espécie prevalente	Forma de contágio	Forma clínica prevalente	Hospedeiro	Grupos prevalentes (humanos)		
							Gênero	Idade	Ocupação
Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz, 2017.	África	3154	<i>Sporothrix schenckii</i>	Contato com Matéria orgânica	Linfocutânea e cutânea fixa	Humano	Homens	1-90 anos	Mineração
Pinkus e Grekin, 1950; Alberici et al., 1989; Cafarchia et al., 2007; Dias et al., 2011; Drogari-Apiranthitou et al. 2014; Magand et al., 2009; Romeo, Scordino e Criseo, 2011; Oliveira et al., 2014; Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz, 2017.	Europa	304	<i>S. globosa</i> , <i>S. schenckii</i> , <i>S. schenckii</i> var. <i>luriei</i> e <i>S. mexicana</i>	Contato com solo	Cutânea fixa e linfocutânea	Animal e humano	Homens	22-85 anos	

3.1.4 América latina e EUA

A América Latina é considerada uma área endêmica de esporotricose, com casos registrados em quase todos os países. Nas Américas do Norte e do Sul, a esporotricose apresentou um aumento significativo do número de casos nas últimas décadas, sendo a micose subcutânea mais comum nesse continente. (Pappas et. al., 1999; Carlos e Batista-Duarte, 2015).

3.1.4.1 EUA

Os EUA apresentam uma notável distribuição da esporotricose, com registros em estados como Illinois, Nova Iorque e Califórnia, onde, entre 1987 e 2007, ocorreram 23 casos de esporotricose felina (Singer e Muncie, 1952; McCain e Buell, 1968; Crothers et al., 2009).

A forma sapronótica de transmissão é a mais comum no país, como em um surto de esporotricose em pessoas que foram expostas a um tipo de musgo contaminado com *Sporothrix* sp., onde foi contabilizado um total de 84 casos distribuídos entre 15 estados, em 1988 (Dixon et. al., 1991; Coles et al., 1992) (Tabela 3). Entretanto, alguns relatos de transmissão zoonótica no país são registrados na literatura (Carvalho et al., 1991; Reed et al. 1993).

3.1.4.2 América Latina

A América Latina vem sendo descrita como área endêmica da esporotricose com maior ocorrência em El Salvador, Uruguai, Colômbia, Venezuela, México e Brasil (Díaz, 1989; Bustamante e Campos, 2001; Hay e Morris-Jones, 2008; Queiroz-Telles et al., 2011; Chakrabarti et al., 2015; Orofino-Costa et al., 2017) (Tabela 3).

Em estudo epidemiológico realizado no Peru, Pappas et al. (1999) relatam a ocorrência de 238 casos de esporotricose confirmados através de isolamento do agente em cultura. Os pesquisadores apontam a região dos montes Andinos (área rural) como hiperendêmica para essa micose.

Mata-Essayag et al. (2013) realizaram estudo retrospectivo de casos de esporotricose na Venezuela, de 1963 a 2009, onde constataram a ocorrência de 123 casos da doença. Já Camacho et al. (2015) realizaram uma análise genotípica de 30 isolados clínicos de *Sporothrix* spp. coletados de pacientes na Venezuela, que datavam de 1973 a 2013. Desses, dez foram identificados como pertencentes à espécie *S. globosa*, o que corresponde ao maior número de casos causados por essa espécie nas Américas.

Silva (1952) aponta a provável ocorrência de milhares de casos na Colômbia, e Rubio et al. (2010) realizaram estudo retrospectivo de casos confirmados de esporotricose entre os anos de 1993

e 2005, tendo verificado a ocorrência de 60 casos da micose, onde foi observada maior frequência desta entre indivíduos do sexo masculino. Agricultores foram considerados o grupo ocupacional mais recorrente. O estudo ainda observou maior endemicidade nas regiões de Cundinamarca e Boyacá, situadas em localizações andinas da Colômbia.

O Uruguai registra a ocorrência 181 casos de esporotricose entre os anos de 1963-79 (Conti-Diaz, 1980). O autor correlaciona a incidência da micose à prática de caça a tatus.

A ocorrência de esporotricose no Chile, Argentina, Equador e Panamá é considerada rara (Conti-Diaz, 1989). Na Argentina esse dado é confirmado em estudo realizado por Córdoba et al. (2018), onde foram analisadas 23 cepas de *Sporothrix* sp. depositadas em uma coleção de cultura, sendo de 19 de casos de esporotricose, apenas. Esse estudo descreve a ocorrência de *S. brasiliensis*, que é uma espécie endêmica do Brasil, na Argentina.

No Chile, *S. chilensis*, a espécie mais recente do gênero foi descrita no estudo de Rodrigues et al. (2016). Os pesquisadores isolaram o patógeno de uma paciente com onicomiose, e do solo do jardim de sua residência. Apesar de isolada de tecido humano, a espécie é ambiental, pertencente ao complexo *Sporothrix pallida*, que apresenta baixa patogenicidade. Em estudo recente foi verificada a ocorrência de *S. chilensis* fora do Chile, dentre cepas de origem clínica originárias de Pernambuco presentes na Coleção de Culturas Micoteca URM, através de análise genotípica (Valeriano et al., 2020).

No México, a esporotricose é considerada a segunda micose subcutânea mais frequente, atrás apenas do eumicetoma, tendo como áreas de maior incidência os estados de Michoacan, Jalisco, Veracruz, Guerrero, Puebla e Guanajuato, locais de clima tropical e úmido (Corzo-Léon, Armstrong-James e Denning, 2015).

Tabela 3. Epidemiologia da esporotricose na América Latina e EUA

Autor	País	Casos registrados	Espécie prevalente	Forma de contágio	Forma clínica prevalente	Grupos prevalentes		
						Gênero	Idade	Ocupação
Coles et al., 1992; Hajjeh et al., 1997.	EUA	287	<i>Sporothrix schenckii</i>	Contato com Matéria orgânica	Linfocutânea e cutânea fixa	Homens	16-77 anos	Trabalhadores florestais/jardineiros
Pappas et al., 1999; Queiroz-Telles et al., 2011; Carlos e Batista-Duarte, 2015; Soto, 2015b.	Peru	1.503	<i>S. schenckii</i>	Contato com solo/transmissão zoonótica	Linfocutânea	Homens	≤14 anos	Estudantes
Zhang Y. et al., 2015; Estrada-Castañon et	México	230	<i>S. schenckii</i> , <i>S. globosa</i> e <i>S. mexicana</i>	Contato com solo	Linfocutânea	Homens	1-73 anos	Trabalhadores rurais

al., 2018; Rojas et al., 2018.								
Mata-Essayag et al., 2013; Zhang Y. et al., 2015; Camacho et al., 2015.	Venezuela	133	<i>S. schenckii</i>	Contato com solo	Linfocutânea	Homens	<30 anos	Estudantes e trabalhadores rurais
Silva et al., 1952; Rubio et al., 2010; Queiroz- Telles et al., 2011; Alegría e Ángela, 2013.	Colômbia	150	<i>S. schenckii</i>	Contato com solo	Linfocutânea e cutânea fixa	Homens	Média de 41 anos	Trabalhadores rurais/ trabalhadores de construção
Conti-Diaz, 1980; Queiroz- Telles et al., 2011.	Uruguai	181	<i>S. schenckii</i> *	Contato com solo/ transmissão zoonótica	Linfocutânea	Homens	>20 anos	Caçadores de tatus
Queiroz- Telles et al., 2011; Carlos e Batista- Duharte, 2015; Chakrabarti et al., 2015; Zhang Y. et al., 2015; Gremião, et al., 2017.	Brasil	>6000 aproximadamente	<i>S. brasiliensis</i> , <i>S. schenckii</i>	Transmissão zoonótica	Linfocutânea	Mulheres	>40 anos	Donas de casa

*Identificação baseada em taxonomia clássica.

3.2 Epidemiologia da esporotricose no Brasil

A epidemiologia da esporotricose no Brasil é um caso à parte especialmente no que diz respeito à forma de transmissão predominante, através de acidentes com gatos acometidos da doença, com grande destaque para o Sudeste, especialmente no estado do Rio de Janeiro onde, desde 1998, uma epidemia se estabeleceu, ocorrendo muitos casos da doença nas últimas duas décadas (Barros et al., 2003; 2004).

O primeiro caso reportado de esporotricose em animal foi descrito no Brasil em 1907 por Lutz e Splendore, onde ratos apresentavam sintomas da doença. Desde então, a micose vem acometendo seres humanos, gatos e em menor escala cães (Cruz, 2013).

Diversos relatos na literatura descrevem centenas de casos de esporotricose felina em vários estados brasileiros, onde em sua grande maioria a espécie descrita tem sido *Sporothrix brasiliensis* (Montenegro et al., 2014; Sanchotene et al., 2015; Macêdo-Sales et al., 2018) espécie que apresenta alta endemicidade no país. A relação entre *S. brasiliensis* e os surtos de esporotricose felina foi

estabelecida por Rodrigues et al. (2013) quando verificaram uma prevalência de 96,9% de *S. brasiliensis*, em estudo filogenético de 32 cepas de *Sporothrix* sp. obtidas de lesões em felino, originárias de cinco estados do Brasil, onde apenas uma das amostras obtida de felino foi identificada como *S. schenckii*.

Chakrabarti et al. (2015) apontam a esporotricose como uma doença de alta incidência em todo território brasileiro, indicando a transmissão zoonótica por gatos acometidos como principal fator para ocorrência desse dado. Entretanto, Ramos et al. (2017) relatam uma ocorrência de transmissão zoonótica da esporotricose por um cão que apresentava lesões típicas da doença em Natal, Rio Grande do Norte. A dona do animal apresentava lesões gomosas e ulcerativas no antebraço, típicas da esporotricose, e relatava não usar nenhuma proteção quando manipulava o animal doente. Esse tipo de relato é extremamente raro e atípico, diferindo muito da principal característica de transmissão zoonótica no Brasil, que é predominantemente por felinos acometidos.

Gutierrez-Galhardo et al. (2015) afirmam que a região metropolitana do Rio de Janeiro se tornou um fenômeno de epidemia/endemia zoonótica urbana. O mesmo trabalho relata ainda que, desde 2013, a esporotricose passou a ser doença de notificação obrigatória no estado.

Desde o início do surto até 2007 haviam sido registrados 1.848 casos da doença no estado do Rio de Janeiro, sendo 1.289 registrados nos últimos quatro anos desse período, o que representou o dobro da frequência registrada nos sete anos anteriores (Silva et al., 2012).

Até 2015, mais de 5000 casos de esporotricose haviam sido registrados no Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas (INI), no Rio (Gutierrez-Galhardo, et al. 2015). Desses casos, 95% ocorreram devido à transmissão por arranhão ou mordida de gatos acometidos da doença (Gremião et al., 2017). No mesmo período, 118 casos de hospitalização foram relatados, dos quais 11 evoluíram para óbito, com maior ocorrência em pacientes HIV-positivo (9 óbitos) (Falcão et al., 2019a). Esse dado apresenta-se como alarmante uma vez que poucos casos de esporotricose evoluíram para óbito, de acordo com a literatura, sendo esta considerada uma doença de baixa letalidade (Pappas et al., 1999). No Brasil há registro de 782 hospitalizações e 65 óbitos em decorrência da esporotricose no período de 1992 a 2015, e o estado do Rio de Janeiro é o que apresenta maior ocorrência desses registros (36) (Falcão et al., 2019b).

Saiter et al. (2017) realizaram estudo em um hospital de São João do Meriti entre os anos de 2010 e 2015, onde foram registrados 13 casos de esporotricose. Nesse estudo foi indicada grande ocorrência na região da Baixada Fluminense, Zona Norte da Cidade do Rio de Janeiro.

São Paulo e Espírito Santo, estados vizinhos ao Rio de Janeiro, também têm registrado casos de esporotricose ao longo das últimas décadas, como descrito em estudo desenvolvido por Fleury et al. (2001) onde são relatados quatro casos de esporotricose por transmissão zoonótica. Um levantamento de casos em uma unidade de ensino de dermatologia de São Paulo revelou a ocorrência

de 25 casos de esporotricose entre os anos de 2003 e 2013 no interior do estado (Marques et al., 2015). Porém o estudo não aponta se o tipo de transmissão se deu por via zoonótica.

No Espírito Santo, foi realizado estudo epidemiológico retrospectivo de casos da doença num período de 30 anos onde, entre 1982 e 2012, foram registrados 171 casos de esporotricose em humanos, tendo sido observada prevalência entre homens trabalhadores do campo (Caus et al., 2018). Os autores não indicam ocorrência de transmissão por acidente com felino nesse estudo. A baixa ocorrência de transmissão zoonótica da esporotricose no estado é relatada em estudo realizado por De Araújo et al. (2015). Nesse trabalho foram realizadas coletas no período de 2005 a 2012, tendo havido a ocorrência de 17 casos de esporotricose em humano e 1 caso de esporotricose em felino. Dos 17 casos em humanos, apenas quatro ocorreram em decorrência de acidente com felino, sendo o agente etiológico *Sporothrix brasiliensis*. O estudo ainda identificou um isolado como *S. globosa*, espécie raramente encontrada no Brasil e prevalente na Ásia (Moussa et al., 2017). Outro caso de esporotricose no Brasil em que o agente identificado foi *S. globosa* é descrito por Oliveira et al. (2010) no Rio de Janeiro.

No estado do Rio do Grande do Sul, a incidência da esporotricose também se apresenta de forma frequente, sendo esse estado o segundo maior em relação ao número de casos da doença no Brasil, apresentando níveis quase epidêmicos (Poester et al., 2018a).

Até a década de 1980, 311 casos de esporotricose haviam sido relatados no Rio Grande do Sul (Londero e Ramos, 1989). Já do final dessa década até 1997, Lopes et al. (1999) constataram a ocorrência de 31 casos indicando um decréscimo na incidência da micose. Porém, no início da década de 2000, o quadro epidemiológico da esporotricose se modificou a partir dos primeiros registros de transmissão da doença a seres humanos por felinos acometidos (Xavier, et al., 2004; Madrid et al., 2010).

De 2016 a 2017 no Rio Grande do Sul, foram registrados 372 casos de esporotricose felina, 34 canina e 83 humana, sendo 83% dos casos dessa última devido à mordedura ou arranhadura de gato (Poester et al., 2018b). Esse dado alarmante levou o mesmo grupo de pesquisadores a realizar uma análise do solo de áreas de grande incidência no estado, na busca por esporos de *Sporothrix* sp, porém os pesquisadores não conseguiram isolar o fungo do solo dessas regiões (Poester et al., 2018c).

Apesar do grande avanço da micose no Rio Grande do Sul, ainda existe muito pouco conhecimento da população acerca do assunto, como demonstrado em estudo realizado por Poester et al. (2018a), onde 50 donos de gatos acometidos foram questionados sobre o tema e desses, 64% nunca haviam ouvido falar da esporotricose, e 71% não usavam equipamentos de proteção pessoal ao realizar o manejo dos animais doentes.

Um fator marcante da ocorrência massiva da esporotricose no Brasil é o perfil socioeconômico de pacientes, o qual é majoritariamente composto de indivíduos do gênero feminino, trabalhadoras

domésticas e em situação de vulnerabilidade social, características essas demonstradas no estudo de Silva et al (2012) e recentemente em um estudo realizado no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, onde esse perfil social se apresentou predominante dentre 827 casos de esporotricose humana registrados entre os anos de 2007 e 2016 (Alzuguir et al., 2020).

A literatura quase não dispõe de relatos de esporotricose nas regiões norte e nordeste do Brasil, apresentando apenas alguns casos pontuais e descrição de alguns surtos em animais e um caso de transmissão para humanos (Filgueira, 2009; Nunes et al., 2011; Araújo e Leal, 2016; Ramos et al., 2017). No entanto, é possível que esse dado esteja ligado à subnotificação da doença nos estados dessas regiões, uma vez que casos de esporotricose animal têm sido relatados com certa frequência. O fator baixa mortalidade também contribui para pouca preocupação dos profissionais em notificar a doença às secretarias estaduais de saúde.

Em Pernambuco, o trabalho de Silva et al. (2018) descreve um surto de esporotricose relativo ao período compreendido entre os anos de 2014 e 2016 na região metropolitana de Recife, capital do estado. No estudo, foram realizadas coletas em 115 animais provenientes de cinco cidades, incluindo a capital, com lesões suspeitas da doença. Dessas amostras, em 59 foi identificada a ocorrência de *Sporothrix* sp. em cultura.

Diante desse cenário, a Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco listou a doença como agravo de interesse estadual, cadastrando-a como Doença de Notificação Compulsória (DNC) estadual, de acordo com a portaria SES/PE N°390 de 14/09/2016.

Segundo boletim publicado pela Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde do estado de Pernambuco (SEVS) em março de 2018, a Região Metropolitana de Recife apresenta alto potencial para epidemização da esporotricose. De acordo com o mesmo boletim, entre os anos de 2016 e 2017, 145 casos suspeitos da doença foram notificados sendo a maioria dessas notificações provenientes do município de Olinda (34,72%) e o gênero feminino o mais acometido (70%).

3.3 Ecologia, taxonomia e fatores de virulência do complexo *Sporothrix schenckii*

O gênero *Sporothrix* possui 51 espécies relatadas, sendo a maioria delas de etiologia ambiental, as quais apresentam baixa virulência e patogenicidade, e espécies patogênicas, as quais compõem o complexo *Sporothrix schenckii* e são causadoras da esporotricose (Orofino-Costa et al., 2017). Apresentam grande distribuição mundial sendo *S. schenckii* e *S. globosa* consideradas espécies cosmopolitas (Rodrigues, de Hoog e Camargo, 2016).

Vivem como sapróbios na forma filamentosa à temperatura ambiente (25 °C), e como patógenos na fase leveduriforme à 37°C *in vitro* ou em tecidos vivos, tanto em seres humanos quanto

em animais, sendo por isso chamados fungos termodimórficos (Sidrim e Rocha, 2004; Barros, Paes e Schubach, 2011).

Segundo Rodrigues et al. (2014a), espécies do gênero *Sporothrix* apresentam uma ampla diversidade de nichos ecológicos e reservatórios ambientais, o que influencia na ecoepidemiologia, distribuição e incidência de espécies desse gênero. Dentre esses nichos, os que apresentam maior ocorrência de *Sporothrix* sp. são: vegetação em decomposição, solo de jardim, feno de pradaria e gramíneas (Carrada-Bravo e Olvera-Macías, 2013).

Ramírez-Soto et al. (2018) realizaram levantamento de diversos trabalhos que relatam a ocorrência de espécies clinicamente relevantes de *Sporothrix* sp. no solo e quais espécies de planta estariam relacionadas com essas cepas. Os autores verificaram que *S. schenckii* foi a espécie mais isolada do solo, enquanto a ocorrência das demais espécies do complexo é rara. Ainda constataram que estas crescem numa variação de temperatura entre 6.6 °C e 28.84 °C, e umidade relativa variando entre 37,5% e 99.06%, e a ocorrência do fungo em diversas estruturas vegetais como flores, folhas e troncos de diversos tipos de plantas.

Até a década de 70, nenhum estado teleomórfico era conhecido para *Sporothrix* sp. Entretanto, Mariat et al., (1971; 1975) sugeriram relação entre *S. schenckii* e *Ophiostoma stenoceras* considerando características morfológicas (esporos pigmentados e triangulares), fisiológicas (crescimento a 35°C) e patogênicas (doença semelhante à esporotricose em hamsters e camundongos) de *Ceratocystis stenoceras* (atualmente *O. stenoceras*), sendo estas consideradas indistinguíveis das características de *Sporothrix schenckii*.

Em 1992, Berbee e Taylor identificaram a ocorrência de alta semelhança entre *Sporothrix schenckii* e *Ophiostoma stenoceras* no gene da região 18S do RNA ribossomal de ambas as espécies, ocorrendo diferença em apenas três sítios, estabelecendo então uma relação filogenética entre esses organismos, e sugerindo *Ophiostoma stenoceras* como teleomorfo de *Sporothrix schenckii*.

O teleomorfismo de *Ophiostoma stenoceras* em relação a *Sporothrix schenckii* foi de fato definido por de Beer et al. (2002) onde, a partir do sequenciamento das regiões *Internal Transcribed Spacer* (ITS) do operon do RNA ribossomal de diferentes isolados de diferentes espécies de *Ophiostoma*, e de isolados ambientais e clínicos de *Sporothrix* sp., a proximidade filogenética entre as espécies foi, até então, confirmada. Porém, em 2016, de Beer et al. realizaram em um estudo a análise de duas regiões de RNA (18S e ITS) e duas regiões de DNA (CAL e β -*tub*) em 65 isolados e identificaram *Sporothrix* como um grupo monofilético bem estabelecido, separando filogeneticamente esse gênero de *Ophiostoma*.

A separação desses gêneros em diferentes clados foi sugerida anteriormente por Zhou et al. (2014), onde, analisando filogeneticamente 124 isolados clínicos e ambientais de *Sporothrix* e *Ophiostoma* de diferentes países, a partir da região ITS, observou acentuada separação entre espécies

de etiologia clínica e de origem ambiental, com amostras originárias de animais e humanos concentrando-se nas espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei*.

A única espécie descrita como causadora da esporotricose era *S. schenckii* porém, com o advento da biologia molecular na metade do século XX, alguns estudos sugeriam a possível ocorrência de mais de uma espécie de *Sporothrix* possivelmente causadoras da doença, como no trabalho de Beer et al. (2002). Baseados nesse dado, Marimon et al. (2006, 2007, 2008) confirmaram essa hipótese e descreveram o complexo *Sporothrix schenckii*.

No estudo realizado em 2006 foram analisadas 60 amostras, sendo 29 destas de Coleções de Cultura brasileiras, das quais 18 eram relacionadas a um surto de esporotricose transmitida por gatos (Schubach et al., 2005). Foram feitas análises de três diferentes loci codificadores das proteínas quitina sintetase, beta-tubulina e calmodulina, das quais o sequenciamento do gene CAL demonstrou melhores resultados em termos de identificação, sendo possível a amplificação de 776 pares de base desse gene. Ao final desse estudo, se constatou a presença de 29 diferentes genótipos, sendo mostrados na árvore formada por 14 nós, representando 6 espécies filogenéticas putativas.

Em 2007, Marimon e colaboradores analisaram 127 isolados identificados como *Sporothrix schenckii*, *S. schenckii* var. *luriei*, e espécies consideradas sinônimas de *S. schenckii* (*S. albicans*, *Sporotrichum tropicale* e *Dolichoascus schenckii*). Foram correlacionados os resultados das análises morfológicas e fisiológicas de *S. schenckii* aos resultados das análises moleculares baseados no sequenciamento do gene CAL, diferentemente do que foi feito no estudo de 2006, onde três genes foram sequenciados. Ao final do estudo foi possível a diferenciação de três novas espécies causadoras da esporotricose denominadas *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana*.

Além da identificação destas novas espécies, foi constatado que o gene CAL se apresenta como um bom marcador para o reconhecimento de espécies de *Sporothrix*, e que *S. albicans*, *S. inflata* e *S. schenckii* var. *luriei* são espécies diferentes de *S. schenckii* (Marimon et al., 2007). Neste trabalho foi proposta uma chave de identificação de espécies do complexo *Sporothrix* baseada nas características morfofisiológicas destas espécies.

Em 2008, Marimon e colaboradores utilizaram os mesmos primers utilizados no estudo de 2006 (quitina sintetase, beta-tubulina e calmodulina), além de realizarem testes fenotípicos de assimilação e crescimento em temperaturas variadas. Ao final do estudo, mostrou-se uma clara separação genética de *Sporothrix schenckii* var. *luriei* das outras espécies que compõem o complexo *Sporothrix schenckii*.

Análises genômicas de isolados clínicos e ambientais de cepas do gênero *Sporothrix* realizadas no estudo de Beer et al. (2016) evidenciam que os 51 táxons que compõem esse gênero se encontram sistematizados em seis complexos de espécies crípticas, divididos em dois grandes clados: clínico, formado pelo complexo *Sporothrix schenckii*, e um ambiental composto por cinco

Complexos: *S. pallida*, *S. candida*, *S. inflata*, *S. gossypina* e *S. stenoceras*. Hoje, o complexo *Sporothrix schenckii* é composto pelas espécies *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. luriei* (de Beer et al., 2016).

Em estudo populacional realizado com 304 sequências do gene CAL de *Sporothrix* sp. depositadas no *GenBank*, Rangel-Gamboa et al. (2015) verificaram grande diversidade genética entre as sequências de *S. schenckii* s. str., dividindo esse grupo em cinco *clusters* para realização de estudo populacional, e verificaram que em quatro desses ocorria diferenciação. De acordo com o estudo, três desses *clusters* são encontrados na Ásia, França, Sul da África, América do Norte, América Central, e América Latina, sendo o *cluster* menos diferenciado encontrado exclusivamente na região sul do Brasil. Já *Sporothrix brasiliensis* e *S. globosa* apresentam baixa diversidade genética o que poderia estar relacionado a um processo de seleção purificada em relação ao ancestral e polimórfico *S. schenckii* s. str. (Rangel-Gamboa et al. 2015).

Segundo Orofino-Costa et al. (2017), a capacidade desses organismos sofrerem essa transição de fase de vida, em decorrência do fator temperatura, constitui-se num importante fator de adaptação para infecção em mamíferos.

As principais barreiras a serem vencidas por um microorganismo são o endotélio e as membranas basais do hospedeiro (Lima et al., 1999). Nesse mesmo estudo se constatou que ambas as morfologias de *Sporothrix* sp. são capazes de aderir a proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina e colágeno tipo II, e das membranas basais, a laminina.

Figueiredo et al. (2004) afirmam que, para disseminar e infectar diferentes órgãos, microrganismos devem ser capazes de vencer a linha celular endotelial vascular, aderindo às células endoteliais, e migrando através do endotélio, penetrando na matriz subendotelial. O mesmo estudo verificou ainda que a interação entre células leveduriformes de *Sporothrix* sp. são mediadas por citocinas, que por sua vez, modulam a expressão de moléculas de adesão da superfície celular do endotélio. A partir dos resultados desse estudo, os autores concluíram que os receptores celulares modulados pelas citocinas interleucina 1- β (IL1- β) e *transforming growth factor*- β (TGF- β), podem contribuir na interação entre células leveduriformes de *Sporothrix* sp. e o endotélio. O mesmo estudo sugere que a interação de *Sporothrix* sp. e células endoteliais tem colaboração dos cátions Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, e que células leveduriformes do patógeno podem ser encontradas no interior de células endoteliais após um período de uma hora a partir da infecção.

Em estudo realizado por Figueiredo et al. (2007), foi investigado se a interação demonstrada em estudo anterior, entre leveduras de *Sporothrix* sp. e células do endotélio, apresentaria alguma influência no que diz respeito à disseminação do fungo no hospedeiro. Ao final do estudo, os autores constataram que, a citocina TGF- β 1 promove um aumento na migração do fungo através das camadas endoteliais, e que esta inibe a internalização do fungo. Esta migração, segundo os autores, se daria

por uma via paracelular, visto que maior parte das moléculas constituintes da superfície endotelial que são reconhecidas por *Sporothrix* sp. não é modulada por essa citocina, que promove uma exposição da matriz subendotelial, permitindo a adesão do fungo às camadas endoteliais. Os autores desse estudo ainda sugerem que, a capacidade de migração do fungo transpondo a barreira endotelial, deve-se ao fato de citoadesinas expressadas na parede celular deste se ligarem às proteínas produzidas na matriz extracelular, fibronectina e laminina.

Diversos estudos têm demonstrado que, alguns fatores de virulência e patogenicidade dos agentes etiológicos da esporotricose se encontram em proteínas e lipídios que compõem a parede celular do fungo, exercendo este último componente um papel importante na patogênese da micose, inibindo o processo fagocítico de macrófagos (Sgarbi, 1997; Carlos et al., 2002).

Um dos principais fatores de virulência presentes na parede celular de *Sporothrix* sp. é a adesina gp70. Curiosamente, o estudo realizado por Castro et al. (2013) demonstrou que isolados menos virulentos de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* apresentavam alta expressão de gp70. Os autores sugerem que isso ocorre pois essa adesina induz resposta imune do hospedeiro, o que ocorreria menos se o patógeno produz menos gp70.

Fernandes et al. (2013) relatam a ocorrência de dois antígenos presentes na parede celular de cepas virulentas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*: as moléculas 60-kDa e 110-kDa, as quais foram reconhecidas pelos anticorpos de ratos infectados. Nesse mesmo estudo, *S. globosa* também demonstrou a ocorrência da 60-kDa, porém apresentou-se menos virulenta em relação às outras duas espécies do complexo.

Lopes-Bezerra et al. (2018) realizaram estudo comparativo entre células leveduriformes de *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis* para verificar possíveis diferenças estruturais entre as paredes celulares dessas espécies. O trabalho demonstrou que ambas as células apresentam parede bilaminar, sendo a parede celular de *S. brasiliensis* mais resistente devido à maior presença de quitina e ramnose. O estudo ainda demonstrou que houve maior fagocitose por macrófagos em relação a células de *S. brasiliensis*.

Pequenas diferenças estruturais entre células de *Sporothrix schenckii* e *S. brasiliensis* já haviam sido relatadas por Martínez-Alvarez et al. (2017), especificamente em relação à quantidade de carboidrato presente na parede celular desses organismos, o que, segundo os autores, provoca diferença nas respostas imunológicas de hospedeiros, especialmente no que diz respeito à produção de citocinas pró-inflamatórias.

Alguns estudos têm sugerido *Sporothrix brasiliensis* como a espécie mais virulenta do complexo, a exemplo do trabalho descrito por Arrillaga-Moncrieff et al. (2009) em que foi realizada análise de virulência de *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* em modelo murino. O estudo demonstrou que inóculos de concentrações baixa ou alta de células de *S. brasiliensis* causaram a

morte dos camundongos, enquanto o inóculo de *S. schenckii* só causou morte em alta concentração e *S. globosa* não causou morte. O estudo relata que, ao realizar coleta dos órgãos dos animais mortos, observou-se que a disseminação, bem como a carga de células de *S. brasiliensis* em todos os órgãos coletados, era muito maior em relação às outras espécies testadas.

Provavelmente, a maior virulência dessa espécie esteja relacionada a diversos mecanismos de crescimento, adesão ao tecido do hospedeiro e fuga do sistema imune que esta apresenta, e que vêm sendo relatados em diversos trabalhos (Borba-Santos et al., 2016b; Della-Terra et al., 2017; Ikeda et al., 2018; Rossato et al., 2018).

Um maior conhecimento dos mecanismos de patogênese do complexo *Sporothrix schenckii* pode auxiliar no estudo de alternativas terapêuticas, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas a partir de sítios antigênicos da superfície celular desses fungos.

3.4 Manifestações Clínicas

A esporotricose é uma micose subcutânea que pode afetar tanto imunocompetentes quanto imunocomprometidos, podendo apresentar manifestações clínicas diferentes entre os indivíduos acometidos. Em imunocomprometidos, apresenta-se como micose oportunista podendo apresentar diversas manifestações clínicas como cutânea disseminada, fungemia e visceral disseminada (Kauffman, 2007).

A esporotricose apresenta quatro formas clínicas bastantes características: linfocutânea ou cutânea linfática, cutânea-localizada ou fixa, disseminada e extracutânea ou visceral (SIDRIM E ROCHA, 2004). Porém, Lopes-Bezerra, Schubach e Costa (2006) trazem uma classificação mais detalhada dessas manifestações clínicas da esporotricose, considerando não apenas a disposição das lesões causadas, mas também o local da lesão. Segundo esta classificação, as manifestações da esporotricose são: Cutânea, subdividida em linfocutânea, fixa e disseminada ou múltipla; mucosa, subdividida em ocular, nasal e outras; Extracutânea, subdividida em pulmonar, osteoarticular, meningeal e generalizada; residual, deixando sequelas; e formas especiais, que apresentam regressão e hipersensibilidade.

Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz (2017) apresentam a esporotricose pulmonar à parte da esporotricose extracutânea dividindo-a em duas formas: crônica, a qual se apresenta similar à tuberculose, sendo mais frequente e assintomática; e aguda e progressiva que afeta os gânglios linfáticos hilares e traqueobranquiais. O acometimento pulmonar da esporotricose é raro, e ocorre pela inalação de conídios de *Sporothrix* sp. (Mahajan, 2014), não sendo causada pela disseminação do fungo via hematogênica (Zancope-Oliveira et al., 2011).

A forma linfocutânea da doença é a mais comum, constituindo-se em cerca de 65% a 85% dos casos de esporotricose em humanos (Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz, 2017).

A maioria dos indivíduos afetados são imunocompetentes ligados a atividade de agricultura, paisagismo, jardinagem, caça, mineração e outras atividades ao ar livre, estando ligada também a transmissão zoonótica via arranhões de gatos, cães em menor escala, e de tatus infectados com o agente da doença (Queiroz-Telles et al., 2011). Caracteriza-se pela ascensão de lesões gomosas subcutâneas, seguindo trajeto linfático a partir do ponto de inoculação do fungo na pele, via lesão perfurante (o qual se apresenta como um nódulo), quadro denominado linfangite nodular ascendente.

A forma cutânea localizada ou fixa da esporotricose é menos frequente que a forma linfocutânea da doença, porém sua ocorrência não é incomum. Apresenta-se como a segunda manifestação clínica mais frequente da doença, abrangendo aproximadamente 20% dos casos, e acredita-se estar associada a uma sensibilização inicial do indivíduo ao fungo em áreas endêmicas (Zancope-Oliveira, 2015).

O diagnóstico diferencial dessa forma clínica inclui leishmaniose, algumas infecções bacterianas como tuberculose, hanseníase e micobacterioses, além de infecções fúngicas como paracoccidioidomicose e coccidioidomicose (Chang et al., 2019). Por isso, deve-se levar em consideração o histórico do paciente que apresente lesão característica como viagem e ocupação. Estes dados são extremamente relevantes, pois podem ajudar no diagnóstico diferencial desta forma clínica da esporotricose (Mahlberg et al., 2009; Chang et al., 2019).

A forma extracutânea e a cutânea disseminada estão geralmente associadas a algum tipo de imunossupressão do indivíduo, sendo consideradas um sinal clínico de pacientes que apresentam taxas muito baixas de linfócitos CD4, como os HIV-positivos (Chang, et al., 2013), como nos casos relatados por Gutierrez-Galhardo et al. (2008), em que dois pacientes HIV-positivos apresentaram esporotricose disseminada como resposta a um quadro que se manifesta após tratamento antirretroviral altamente ativo chamado síndrome da reconstituição inflamatória imune.

Apesar do caráter oportunista da forma disseminada da esporotricose, alguns casos de ocorrência de disseminação em pacientes imunocompetentes têm sido notificados, especialmente em áreas onde a ocorrência de transmissão zoonótica apresenta alta incidência, devido, provavelmente, à alta carga fúngica inoculada pela lesão traumática provocada por múltiplos arranhões ou mordidas de gatos acometidos, e à virulência de *Sporothrix brasiliensis*, espécie mais relacionada à essa via de infecção (Rodrigues et al., 2013; Freitas et al., 2015; Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017).

Outras condições que podem contribuir para ocorrência das formas disseminada e extracutânea da esporotricose devido a um quadro de imunocomprometimento, além da síndrome de imunodeficiência, são o diabetes, alcoolismo, uso de esteroides e terapias antineoplásicas (Romero-

Cabello et al., 2011). Em ambas as condições, a disseminação da doença se dá via hematogênica (Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017).

Na forma cutânea disseminada (ou multifocal) ocorre formação de lesões subcutâneas que, posteriormente, podem formar ulcerações fagedênicas, lesões acneiformes, placas enrijecidas ou crostas, no estágio final da AIDS (Ramos-e-Silva et al., 2007). Além do acometimento cutâneo, a forma disseminada da esporotricose pode levar a quadros como febre, dor, mal-estar e perda de peso (Romero-Cabello et al., 2011), ocorrendo em alguns casos envolvimento visceral, afetando estruturas mucosas como olhos e boca (Romero-Cabello et al., 2011; Silva-Vergara et al., 2012); meninges e pulmão podendo levar o indivíduo a óbito (Ramos-e-Silva et al., 2007; Kauffman, 2015); ossos e articulações (principalmente joelhos), e em casos raros, osteomielite (Lederer, Sullivan e Crum-Cianflone, 2016).

A forma extracutânea da esporotricose é uma manifestação oportunista, assim como a forma disseminada da doença, que pode acometer órgãos importantes como pulmões, ossos e articulações; olhos, meninges e outras estruturas do sistema nervoso central (López-Romero et al., 2011; Ramos-e-Silva et al., 2007).

A forma osteoarticular é a mais frequente da esporotricose extracutânea, podendo ocorrer artrite inflamatória, levando à destruição da articulação devido ao atraso no diagnóstico (Barros, Almeida-Paes e Schubach, 2011; Mahajan et al., 2014), e osteoporose de ossos adjacentes, afetando geralmente tíbia, ossículos do carpo, rádio, ulna, crânio e ossos da face, raramente apresentando lesões cutâneas (López-Romero et al., 2011; Mahajan, 2014; Rosely-Zancope et al., 2011). As articulações geralmente acometidas são: pulsos, cotovelos, joelhos e cintura pélvica (Gewehr et al., 2013; Kauffman, 2015), podendo levar a quadros de tenosinovite com ou sem síndrome do túnel carpal, associada à inoculação profunda (Ramos-e-Silva, 2007), osteomielite e bursite (Barros, Almeida-Paes e Schubach, 2011; Mahajan et al., 2014).

A manifestação ocular da esporotricose ocorre por infecção exógena, ou por disseminação do fungo pela via hematogênica, podendo se apresentar inicialmente como uma conjuntivite (Gutierrez-Galhardo, Freitas e do Valle, 2015), e pode afetar anexos do globo ocular como pálpebras, sombrancelhas, conjuntiva e glândulas lacrimais (Soto, 2015a), quadro conhecido como dacriocistite, inflamação que ocorre predominantemente em mulheres adultas e crianças (Freitas et al., 2013).

A forma mucosa da doença afeta estruturas como boca, faringe, laringe e nariz, causando lesões exantemáticas, supuração e ulceração dessas estruturas, podendo ser causada por infecção direta ou por disseminação pela via hematogênica.

O acometimento do sistema nervoso pode ocasionar desde meningite a alterações do estado mental do indivíduo afetado, porém é um quadro extremamente raro da manifestação extracutânea (Mahajan, 2014).

Freitas et al. (2014), relatam quatro casos de pacientes HIV-positivo que apresentavam comorbidade com esporotricose, onde um deles foi diagnosticado com meningite devido à infecção fúngica. Após submetidos à punção lombar, três deles tinham em seu fluido cérebro espinhal o agente da esporotricose, o qual foi identificado posteriormente através do marcador molecular T3B como *Sporothrix brasiliensis*.

3.5 Diagnóstico: da clínica à biologia molecular

A princípio a forma linfocutânea é a mais simples no que diz respeito ao diagnóstico puramente clínico. As formas fixas e disseminadas podem apresentar semelhança significativa a lesões típicas de outras doenças que apresentam manifestação cutânea, como infecções ou doenças autoimunes (Chang et al., 2019). Já a forma extracutânea da doença apresenta formas semelhantes à tuberculose, quando da manifestação pulmonar; a uma simples artrite, quando da manifestação ósteo-articular, ou quando da ocorrência de sua forma meningeal, apresenta as mesmas manifestações das meningites convencionais: bacteriana e viral. Em geral, é pouco provável que o médico considere *Sporothrix* sp. como agente causador da meningite, a princípio. A forma extracutânea apresenta difícil diagnóstico devido à ausência ou escassez de lesões na pele do indivíduo afetado (López-Romero et al., 2011).

Diante das dificuldades do diagnóstico clínico, diversos métodos de diagnóstico têm sido desenvolvidos com o objetivo de se obter maior acurácia, reprodutibilidade, rapidez e baixo custo.

A manifestação das diferentes formas clínicas da esporotricose estão relacionadas principalmente às condições imunológicas do indivíduo, bem como à sensibilização deste ao agente etiológico em áreas endêmicas, como no caso da forma cutânea fixa (Zancopé-Oliveira, 2015). Portanto, é importante que o profissional de saúde obtenha o histórico clínico do indivíduo que apresente lesões típicas da esporotricose.

Diversas ferramentas têm sido empregadas no diagnóstico da esporotricose, sendo manuais ou automatizadas, todas fornecendo dados importantes no que diz respeito não só ao tratamento em si, mas também ao fornecimento de dados epidemiológicos da doença.

A forma mais confiável para o diagnóstico definitivo da esporotricose, considerada o padrão ouro, é a observação das estruturas macro e micromorfológicas de *Sporothrix* spp., o que é possível mediante isolamento do fungo nos meios de cultivo Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) ou Ágar Batata Dextrose (BDA) a 25°C, em um período de incubação de 3 a 7 dias (Ramos-e-Silva et al., 2007).

O isolamento do agente pode ser feito a partir de fluidos corporais como punção ganglionar no caso da forma linfocutânea, da forma disseminada, ou da forma localizada; e pus, escarro, líquido sinovial, no caso da forma visceral, dependendo do órgão afetado; ou ainda a partir de fragmento de

tecido. Inicialmente, a colônia filamentosa apresenta-se hialina, desenvolvendo com o tempo rugas e dobras, podendo ocorrer produção de melanina, o que torna a cor inicialmente creme da cultura em uma cor marrom escura (Mahajan, 2014).

Para observação das estruturas micromorfológicas de *Sporothrix* sp., é retirado um fragmento da colônia e este é colocado sobre a lâmina de vidro, sendo corado preferencialmente em lactofenol azul de algodão. Ao aumento de 400x no microscópio óptico, é possível observar as estruturas micromorfológicas típicas de *Sporothrix* sp.: filamentos micelianos hialinos, septados, bastante ramificados e medindo cerca 1,5 a 2 μm de espessura, podendo apresentar ao longo destes conídios simpodiais demáceos ou hialinos, terminais, 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 (Sidrim e Rocha, 2004).

Para obtenção da fase leveduriforme de *Sporothrix* sp., se faz necessária a incubação do fungo a uma temperatura de 35 a 37°C em meio enriquecido, tais como: Infusão de Cérebro e Coração (BHI), Ágar Chocolate ou Ágar Sangue, por um período de 5 a 7 dias, sendo por vezes necessário, dependendo do isolado, realizar diversos subcultivos e aumentar o período de incubação para constatar a termoconversão (Barros, Paes e Schubach, 2011).

É difícil encontrar o fungo pela observação do material coletado de paciente com suspeita de esporotricose ao exame direto, visto que a fase leveduriforme de *Sporothrix* sp. apresenta formas variáveis, além da escassez dessas células nas lesões em humanos (Arenas et al., 2018).

Este procedimento se dá a partir da clarificação do material coletado, pelo hidróxido de potássio em concentração de 10% a 40%, porém não apresenta a confiabilidade diagnóstica presente no cultivo do fungo em meio de cultura e posterior observação de suas estruturas macro e micromorfológicas, devido à escassez de células leveduriformes presentes no material biológico, o que só ocorre em 1 a 2% dos casos (Mahajan, 2014; Arenas et al., 2018).

Bonifaz et al. (2018) desenvolveram uma técnica de diagnóstico a partir do uso da esporotriquina intradérmica (complexo antigênico formado por peptídeo-ramnomanana). Nesse trabalho eles observaram que o método apresentou uma sensibilidade de 94,5%, contudo não conseguiu detectar casos de esporotricose disseminada.

Exames histopatológicos também são ferramentas importantes na obtenção do diagnóstico da esporotricose, a partir de esfregaços corados pelas técnicas de Ácido Periódico de Schiff (PAS), Hematoxilina e Eosina ou Metenamina Prata (Cruz, 2013).

A partir de preparações coradas pelo PAS podem ser evidenciadas células globosas atípicas, devido a uma cápsula que reage positivamente ao ácido, lembrando células de *Cryptococcus neoformans* (Barros, Paes e Schubach, 2011). Nesta preparação, uma estrutura radiada formada de material eosinofílico cercado a célula fúngica, denominada corpo asteroide, pode ser encontrada.

Esta estrutura, raramente encontrada nesse exame, é formada devido à deposição de proteínas, e é responsável pela reação antígeno e anticorpo (Ramos-e-Silva, 2007), e na esporotricose se encontra fora da célula, o que caracteriza a doença, pois corpos asteroides em outras infecções se apresentam no interior de células gigantes (Sidrim e Rocha, 2004).

Ao método de coloração de Gram, as células leveduriformes de *Sporothrix* sp. apresentam-se positivas, e alguns autores têm descrito a utilização dessa técnica onde o corante é diluído de 10 a 15 vezes em solução salina, porém essa metodologia tem apresentado baixa sensibilidade (Arenas et al., 2018).

Arenas et al. (2018) ainda relatam a utilização de uma metodologia para observação de corpos asteroides que tem apresentado bastante reprodutibilidade, conhecida como fenômeno Splendore-Hoepli, onde o exsudato é colocado em uma lâmina com solução salina acrescentando-se uma gota de formaldeído a 10%.

O exame histopatológico não é específico pois mimetiza outras inflamações granulomatosas, como a que ocorre na esporotricose (Mahajan, 2014).

Silva et al. (2018) realizaram estudo comparativo entre três métodos sensíveis no diagnóstico em humanos para verificar a sensibilidade desses em relação ao diagnóstico de esporotricose em felinos: método panóptico rápido (citopatológico), coloração prata de Grocott (histopatológico) e anti imuno-histoquímica de *Sporothrix* (IHC). Todos os métodos apresentaram boa sensibilidade, sendo o teste de coloração prata de Grocott o mais sensível (91,3%).

Métodos sorológicos também têm sido uma opção prática e rápida no diagnóstico da esporotricose. Almeida-Paes et al. (2007), com o objetivo de estabelecer um protocolo para realização de detecção de anticorpos de *Sporothrix* sp. em soro de pacientes, usou soro de 90 pacientes com diferentes formas clínicas da esporotricose contra exoantígenos de *Sporothrix* sp. da fase filamentosa do fungo. O trabalho apontou a ocorrência de 97% de sensibilidade do teste e uma especificidade de 89%.

Considerando a possibilidade de ocorrência de reação cruzada na detecção de antígeno, Coelho et al. (2018) desenvolveram um protocolo de ensaio imunológico onde o tratamento de soro do paciente com ureia 6M (incubação por 5 minutos), combinado à diluição do soro na proporção de 1/600, aumentava a performance do ensaio com exoantígenos de células leveduriformes de *Sporothrix* sp.

Rodrigues et al. (2015) propuseram que o antígeno 3-carboximuconato ciclase, devido sua abundância no soro de gatos infectados, apresenta potencial para diagnóstico sorológico.

Reiss et al. (2000) afirmam que testes não-cultura são necessários para realizar um diagnóstico oportuno de infecções fúngicas invasivas e para selecionar terapia apropriada. Assim, a ferramenta molecular se torna importante no diagnóstico rápido da esporotricose e em casos de não isolamento

em cultura devido à baixa carga fúngica ou devido a infecções secundárias (Barros, Paes e Schubach, 2011).

Após os estudos de Marimon et al. (2006, 2007, 2008), a partir dos quais novas espécies patogênicas do gênero *Sporothrix* foram estabelecidas, diversos estudos objetivando a identificação molecular do agente da esporotricose se basearam no sequenciamento do gene CAL (Camacho, 2015; Dias et al., 2011; Oliveira et al., 2010, 2013b, 2014, 2015).

Um dos estudos pioneiros no desenvolvimento do diagnóstico molecular de infecções fúngicas foi realizado em 1995 por Sandhu e colaboradores, no qual foram desenvolvidas 21 sondas de ácido nucleico específicas, as quais tinham como alvo a maior subunidade de genes rRNA de diversos fungos patógenos.

Hu et al. (2003) desenvolveram um protocolo de uma Nested PCR para detecção de *Sporothrix schenckii* usando a sequência do gene 18S do rRNA como alvo. Os resultados mostraram que a PCR pôde detectar o total de DNA de uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) de *S. schenckii* em amostras de tecidos. O estudo demonstrou altas sensibilidade e especificidade, comprovando a eficácia desse método no diagnóstico da esporotricose.

Rodrigues, de Hoog e Camargo (2015) sugerem uma técnica de PCR em DNA fúngico extraído diretamente do fragmento de tecido de órgãos lesionados e até mesmo de fezes, utilizando marcadores baseados no gene CAL, específicos para *Sporothrix brasiliensis* e *S. schenckii*.

Zhang et al. (2019a; 2019b) desenvolveram técnicas de PCR em tempo real para identificação de *S. brasiliensis*, *S. globosa*, e *S. schenckii*, a partir da amostra clínica.

3.6 Tratamento: métodos convencionais e perspectivas terapêuticas

3.6.1 Antifungigrama e perfil de sensibilidade do Complexo *Sporothrix schenckii*

Apesar de sua grande distribuição global e de suas diferentes manifestações clínicas, a esporotricose não apresenta grande complexidade em seu tratamento, porém este pode apresentar um período prolongado, o que o torna dispendioso (Mahajan et al., 2014). Além disso, estudos recentes têm sugerido que a sensibilidade antifúngica e a virulência, bem como os mecanismos de lesão, podem diferir entre as espécies do complexo *S. schenckii* (Oliveira et al., 2014; Rodrigues et al., 2014). Essa hipótese foi testada em trabalho realizado por Marimon et al. (2008a), onde foi verificado o perfil de susceptibilidade antifúngica de diferentes espécies do Complexo *S. schenckii*, sendo testados 12 antifúngicos frente a diferentes cepas de cinco espécies do complexo. Nesse teste, apenas as CIMs obtidas para fluconazol e micafungina foram iguais (128 e 256 µg/mL, respectivamente). As demais CIMs obtidas para cada droga frente às diferentes espécies do complexo, apresentaram

variação, sendo *S. mexicana* a espécie que apresentou maior resistência aos fármacos testados, exceto à terbinafina, antifúngico que apresentou o menor CIM no teste.

Outro trabalho com o mesmo viés foi desenvolvido por Oliveira, D., et al. (2011), onde foram testadas cepas de *S. schenckii*, *S. albicans*, *S. brasiliensis* e *S. luriei*, frente a oito antifúngicos entre compostos azólicos, equinocandinas e anfotericina B. Foi constatada resistência dos isolados de *S. luriei* e *S. albicans* aos compostos azólicos e à caspofungina, porém estes isolados foram sensíveis à anfotericina B e à terbinafina. *S. schenckii*, isolados apenas de humanos foram resistentes a fluconazol e caspofungina. *S. brasiliensis* também foi resistente ao fluconazol, e caspofungina. Já no estudo de Suzuki et al. (2016) foi verificada sensibilidade de *S. globosa* e *S. schenckii* a itraconazol e resistência à anfotericina B.

Em 2017, Espinel-Ingroff e colaboradores realizaram um estudo multicêntrico com o intuito de estabelecer um valor de *cutoff* epidemiológico (ECV) de diversos fármacos para espécies do complexo *Sporothrix schenckii*. Foram obtidas cepas de diversas partes do mundo: 301 de *Sporothrix schenckii*, 486 de *S. brasiliensis*, 75 de *S. globosa* e 13 de *S. mexicana*. O estudo estabeleceu que para *S. brasiliensis* os ECVs em µg/ml foram de: 4 para anfotericina B, 2 para itraconazol e posaconazol, 32 para voriconazol, 2 para cetoconazol e 0,12 para terbinafina. Para *Sporothrix schenckii*: os mesmos valores de *S. brasiliensis* exceto para cetoconazol e terbinafina. Os pesquisadores não conseguiram obter ECVs para *S. globosa* e *S. mexicana*.

3.6.2 Tratamentos convencionais

Itraconazol é considerada a droga de escolha no tratamento da esporotricose, especialmente em sua forma linfocutânea (Kauffman, Bustamante e Chapman, 2007), porém o iodeto de potássio (KI) continua sendo uma opção viável no tratamento desta manifestação clínica, devido sua alta eficiência, baixo custo, fácil administração e poucos efeitos colaterais (Bonifaz e Vázquez-González, 2013).

KI apresenta atividade imunomodulatória em neutrófilos e fagócitos, não atuando diretamente sobre o patógeno (Orofino-Costa et al., 2013).

Itraconazol é um triazólico, classe de moléculas que apresentam maior penetração tecidual e tempo de meia-vida, o que aumenta sua eficácia em relação aos imidazólicos e, assim como outros derivados azólicos, atua na via metabólica de síntese de ergosterol da membrana plasmática, apresentando atividade fungistática (Grant e Clissold, 1989; Cleary, Taylor e Chapman, 1992). A dosagem recomendada para esse fármaco é de 200 a 400 mg/dia, tanto em casos de esporotricose cutânea quanto extracutânea, e sua taxa de sucesso em torno de 90 a 100% (60 a 80% para casos de acometimento ósseo) (Mahajan, 2014).

O uso de itraconazol para tratamento da esporotricose foi descrito pela primeira vez por Restrepo et al. (1986) onde 17 pacientes foram tratados com o fármaco obtendo cura. Desde então, diversos trabalhos relatam o uso do azólico no tratamento da micose, apontando sucesso terapêutico (Lavalle, et al., 1987; Conti-Diaz, et al. 1992; Sharkey-Mathis et al., 1993).

Outras drogas também utilizadas no tratamento da esporotricose são o fluconazol e a terbinafina, porém em casos de menor complexidade da doença (Mahajan et al., 2014).

A terbinafina encontra-se no grupo das alilaminas, apresenta longa meia-vida e é altamente lipofílica, também atuando na síntese de ergosterol da membrana plasmática do fungo, porém apresenta ação fungicida (Hull e Vismer, 1992; Mahajan et al., 2014).

Apesar de ser uma opção no tratamento da esporotricose, não existem dosagens padrão no tratamento da doença, apesar de alguns estudos descreverem altas taxas de cura com tratamento de 250 mg/dia da droga (Hull e Vismer, 1992; Francesconi et al. 2009). Coskun et al (2004) relatam o uso de terbinafina (250 mg/dia) combinada a iodeto de potássio no tratamento de uma mulher de 40 anos com esporotricose cutânea, a qual obteve cura.

Fluconazol é um triazólico bastante utilizado no tratamento de leveduroses em pacientes imunocomprometidos, como candidíase e criptococose, porém apresenta baixa atividade contra *Sporothrix* sp. (Goa e Barradell, 1995; Shahram et al., 2016; Espinel-Ingroff et al., 2017). No entanto, Borba-Santos et al. (2017) evidenciaram que o fluconazol, *in vivo*, se torna efetivo contra *Sporothrix* sp. em associação com tacrolimus, um inibidor de calcineurina.

Outro azólico que surge como uma opção no tratamento da esporotricose é o posaconazol, que tem apresentado boa atividade contra o complexo de espécies (Fernández-Silva et al., 2012; Mahajan, 2014).

3.6.3 Novas alternativas terapêuticas

Estudos da ação de diferentes compostos que apresentam potencial antifúngico têm sido desenvolvidos, tendo obtido resultados interessantes frente a isolados de *Sporothrix* sp.

Em 2014, Brilhante e colaboradores testaram um composto fosfolipídico conhecido por Miltefosina, utilizado na quimioterapia anti-protozoária da leishmaniose, frente a isolados de *Sporothrix* sp. e *Histoplasma capsulatum*. Os resultados mostraram que a variação da CIM para Miltefosina frente aos isolados de *Sporothrix* foi de 0,25-2 µg/mL, mais especificamente de 0,5-0.125 µg/mL para *S. brasiliensis*, de 0,5-1 µg/mL para *S. schenckii*, de 0,5-2 µg/mL para *S. mexicana* e 1-2 µg/mL para *S. globosa*. Os resultados deste estudo demonstram que a Miltefosina apresenta uma ação antifúngica relevante, pois apresentou eficácia contra diferentes espécies do complexo, apresentando pouca variação nas CIMs de uma espécie para outra.

O mesmo grupo de estudo avaliou a ação de derivados terpênicos contra isolados de *Sporothrix* sp. Nesse trabalho, foram testados os compostos terpinen-4-ol e farnesol, apresentando este último uma CIM variando de 0,003 a 0,222 µg/mL, sendo considerado o composto mais ativo neste teste (Brilhante et al., 2014b).

Borba-Santos et al. (2016a) verificaram, a ação de três compostos análogos à miltefosina: TCAN26, TC19, e TC70. Os autores concluíram que TCAN26 foi o composto com atividade antifúngica mais acentuada contra *Sporothrix* sp., apresentando uma ação mais eficaz que a miltefosina. Nesse estudo foi verificado que este composto provoca alterações nos envoltórios celulares do patógeno, e que as concentrações necessárias para eliminar as células deste são menores que as que provocam citotoxicidade em mamíferos, sendo assim esse composto mais seletivo que a miltefosina.

Brilhante et al. (2018) verificaram em um ensaio *in vitro* que miltefosina associada a iodeto de potássio é capaz de inibir biofilme de espécies do complexo *Sporothrix schenckii*, tanto na fase filamentosa quanto na leveduriforme, entretanto, quando testada *in vivo*, no tratamento de gatos com esporotricose, não apresentou atividade (Silva et al., 2018).

Os trabalhos de Waller et al. (2015; 2016a; 2016b; 2016c), demonstraram a ação de diversos óleos naturais extraídos de diferentes espécies de plantas, os quais apresentaram resultados significativos frente a cepas de *S. brasiliensis*. Couto et al. (2015) demonstraram a ação do óleo essencial de *Origanum vulgare*, planta da família Lamiaceae (Waller et al., 2015), frente a cepas de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, demonstrando o potencial antifúngico de compostos deste óleo, especialmente do composto γ -Terpineno.

4. METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde CCS/UFPE (CEP- CS/UFPE), havendo sido aprovada em reunião e emitido parecer substanciado, registrado sob o código CAAE 70369117.5.0000.5208. As coletas de amostras clínicas em pacientes humanos só foram iniciadas após a aprovação e emissão de parecer pelo CEP. Os sujeitos envolvidos na pesquisa assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2. Obtenção das amostras

As amostras clínicas foram obtidas de pacientes atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE, no período compreendido entre agosto de 2017 e agosto de 2018. Indivíduos humanos que apresentavam lesões sugestivas de esporotricose, após avaliação da equipe médica, foram encaminhados para coleta micológica. Em pacientes que fizeram uso prévio de algum medicamento antifúngico, de uso tópico ou oral, a coleta não foi realizada, sendo estes excluídos da pesquisa.

Foram realizadas coletas de exsudato de lesões típicas de manifestação linfocutânea, cutânea fixa ou cutânea disseminada da doença, a partir da utilização de swab. Fragmentos de tecido, obtidos a partir de biópsia da região afetada, realizada pela equipe médica, foram obtidos.

Adicionalmente, através da anuência fornecida pelo Laboratório Central de Pernambuco (LACEN-PE), amostras de *Sporothrix* sp., obtidas de animais, foram referenciadas pelo Laboratório de Endemias do Estado (LABEND) para o Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos onde foram feitas as análises de micromorfologia e sensibilidade antifúngica, sendo estas amostras de conveniência uma vez que, apenas amostras que apresentavam viabilidade foram utilizadas no estudo, não representando todos os casos de esporotricose felina confirmados em Pernambuco no período descrito.

Os dados epidemiológicos dos animais foram obtidos através de fichas fornecidas pelo LABEND, sendo estes: cidade, bairro, idade, gênero, sítio de lesão, tempo de lesão, acesso à rua ou jardim, contato com outros gatos, castração, sangramento e prurido das lesões.

4.3. Processamento das amostras

Todo material coletado em humano foi processado no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos (Departamento de Micologia- UFPE), sendo clarificado em hidróxido de potássio (KOH) a 20%, e corado em coloração panóptica, para verificação da fase leveduriforme do patógeno. Além disso, o material foi semeado em meio Ágar Sabouraud adicionado de Cloranfenicol e mantido a 35°C por 7 dias, para verificação da fase filamentosa, a qual caracteriza o diagnóstico da esporotricose (SIDRIM E ROCHA, 2004). Foi confirmado diagnóstico da esporotricose apenas das amostras que apresentaram crescimento em cultura. A coleta de amostra clínicas em animais foram realizadas em centros de atendimento veterinário e enviadas ao LABEND/PE, e os dados sobre diagnóstico em felino foram obtidos através das fichas de amostras clínicas obtidas de animais, fornecidas pelo LABEND/PE.

4.4. Teste de sensibilidade antifúngica

Foram realizados no Laboratório de Micologia Médica Sylvio Campos, Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, com os antifúngicos utilizados atualmente no tratamento de esporotricose, além de novas substâncias bioativas, frente a 40 isolados clínicos de *Sporothrix* sp., oriundos de pacientes humanos e felinos.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008). O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, EUA) esterilizado em membranas de 0,22 μm (Millipore, Darmstadt, Alemanha), com L-glutamina, sem bicarbonato de sódio e pH $7,0 \pm 0,1$ tamponado com ácido morfolino propano sulfônico (MOPS; $0,165 \text{ mol.L}^{-1}$; Sigma-Aldrich).

Os antifúngicos avaliados foram anfotericina B (Bristol-Myers Squibb), itraconazol, voriconazol e cetoconazol em concentrações variando de 0,015 a $16 \mu\text{g.mL}^{-1}$; e fluconazol, terbinafina e iodeto de potássio a uma variação de 0,125 a $64 \mu\text{g/mL}^{-1}$. Também foram testados extratos hidroalcoólicos de plantas com potencial antifúngico: extrato de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-vermelha), *Anadenanthera colubrina* (angico-branco) e *Libidibia ferrea* (pau ferro) a uma variação de 0,125 a $64 \mu\text{g/mL}^{-1}$.

O material vegetal usado para obtenção dos extratos é formado de folhas e cascas secas. O material vegetal seco e moído foi levado à liquidificador industrial por 20 minutos, com intervalos de 5 minutos a cada ciclo extrativo de 5 minutos. Para cada 50 g de droga vegetal, seca e moída, foram empregados 500 mL de água ou acetona:água (7:3; v/v) como líquidos extratores, na proporção inicial de planta/solvente de 10% (p/v). Após filtração de cada extrato e posterior evaporação do solvente orgânico em evaporador rotatório sob pressão reduzida (40 C), os extratos foram congelados (em nitrogênio líquido ou freezer -80°C) e liofilizados, obtendo-se assim os extratos brutos (EB) (FB5, 2010).

Tanto os antifúngicos quanto os extratos hidroalcoólicos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Oito cepas de *Sporothrix brasiliensis* e duas de *S. schenckii* obtidas nesse estudo foram utilizadas para verificação da atividade anti-*Sporothrix* desses extratos.

Os isolados de *Sporothrix* sp. foram mantidos em meio ágar batata dextrose (BDA) e incubadas a 35°C durante 7 dias. A cepa de referência utilizada para validação do teste foi a ATCC 22019 de *Candida parapsolosis*. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina (0,85 g/L), e sua densidade foi ajustada de acordo com a escala 0.5 de MacFarland em 80% a 82% da transmitância utilizando um espectrofotômetro a 530 nm. O volume do inóculo foi posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3 \text{ céls. mL}^{-1}$.

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

e aos extratos. A leitura do teste feito com os fármacos foi feita a de acordo com o pré-estabelecido pelo documento M38-A2 (CLSI, 2008), enquanto a leitura do teste feito com os compostos foi feita a 100% da inibição.

4.5. Análise genotípica

4.5.1. Extração e quantificação de DNA

O DNA genômico do fungo foi obtido a partir de sua fase filamentosa. O processo de extração, se baseou em Woods et al. (1993), onde um fragmento da colônia foi congelado em nitrogênio líquido, sofrendo posterior lise mecânica com o auxílio de um “pilão”. Após a lise celular, o DNA passou por um processo de lavagem em tampão TES e em clorofórmio álcool isoamílico, sofrendo sucessivas centrifugações e vortexizações, e posteriormente suspenso em acetato de sódio 3M e em etanol 100%, novamente lavado em álcool 70%, e finalmente resuspenso em 50 µL de água destilada ultrapura, sendo então armazenado a 4°C overnight.

4.5.2. Sequenciamento parcial do gene CAL

Para realização do sequenciamento, as seguintes sequências iniciadoras (“primers”) foram utilizadas: primers CL1 (5-GA (GA) T (AT) CAAGGAGGCCTTCTC-3) and CL2A (5-TTTTTGCAT CATGAGTTGGAC-3) (Marimon et al., 2007).

As condições de PCR utilizadas foram iguais as previamente descritas para amplificação dos genes CAL (Marimon et al. 2006; Oliveira et al., 2010), 95°C por 10 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, 56 °C de anelamento por 1 min e extensão final de 72°C por 10 minutos. O sequenciamento foi realizado nas direções 5´ e 3´ em um volume de reação de 10 µl contendo 4 µl de “premix terminator”, 100 ng de DNA, 3,2 pMoles de “primer”. O mix da PCR constitui de Buffer 10x PCR/KCl, 2,0 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0,04 mM do mix de dNTPs (Invitrogen), 1U de Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen), 10 µM dos Primers CL1 e CL2A.

As sequências foram editadas pelo programa Sequencher 4.9 Genes Code Corporation. O sequenciamento foi realizado na Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CB (UFPE). As sequências obtidas foram depositadas na biblioteca *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e as amostras identificadas foram depositadas na coleção de culturas Micoteca URM, da Universidade Federal de Pernambuco.

4.5.3 Análise filogenética

Uma vez obtidas, as sequências foram editadas no software *BioEdit* versão 7.2.6.1. e então foi feita uma busca por sequências semelhantes ($\geq 99\%$ de similaridade) na biblioteca do *GenBank* através da ferramenta *Basic Local Alignment search tool* (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do NCBI.

Foi realizado alinhamento filogenético no software *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 7.0 (Mega7), onde também a árvore filogenética foi construída pelo método estatístico de Máxima Verossimilhança (MV), e assim as cepas foram identificadas em nível de espécie.

As sequências de *Sporothrix* sp. obtidas nesse estudo foram analisadas filogeneticamente em comparação a sequências de *Sporothrix* sp. depositadas no *GenBank*. Apenas sequências de isolados clínicos de *Sporothrix* sp., relativos a casos de esporotricose humana e felina, foram utilizadas nessa análise. Para verificação de possíveis semelhanças genéticas entre os isolados desse estudo e cepas de diferentes origens geográficas, foram selecionadas sequências de diversos estados do Brasil. Nessa análise, *Grosmannia sersens*, pertencente à família Ophiostomataceae, foi a espécie escolhida como *Outgroup*. A distância entre as sequências foi calculada usando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1980). Foi realizada análise de *bootstrap* com 1.000 repetições.

4.6 Análise de dados

Para realização de estatística descritiva do perfil epidemiológico da esporotricose em Pernambuco, tanto de felinos quanto de humanos, foi utilizado o software *Statistical Package for the Social Sciences* 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Foram consideradas as seguintes variáveis: idade, gênero, município/bairro, sítio das lesões, forma de contágio e manifestação clínica, e analisadas a partir de determinação de frequências simples. Para humanos ainda foi verificada a ocorrência ou não de hipersensibilidade (síndrome de Sweet, eritema nodoso ou multiforme). Para realização de uma análise espacial de casos de esporotricose em Pernambuco, foi utilizado o software ArcGis, a partir dos dados de georreferenciamento inseridos sobre o mapa do estado, gerando um sistema de informação geográfica (GIS) local. Um mapa de calor foi gerado para indicar a incidência de casos por cidade.

A eficácia dos antifúngicos foi verificada através da média geométrica das CIMs obtidas dos fármacos testados, e a diferença entre os valores das CIMs para cada fármaco foi determinada por teste não paramétrico de amostras relacionadas de Wilcoxon, onde o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo (Mahmoudi et al., 2016).

5. RESULTADOS

5.1 Diagnóstico

Um total de 115 pacientes humanos com suspeita de esporotricose foram atendidos no ambulatório de esporotricose do Hospital das clínicas de Pernambuco. Em 59 destes pacientes foi confirmado o diagnóstico da esporotricose em cultura, a partir da observação de micromorfologia típica de *Sporothrix* sp.: hifas hialinas e septadas apresentando conídios terminais em disposição floral (figura 1A).

Apenas nove (15,7%) das 59 amostras foram isoladas a partir de exsudato ulcerativo, tendo o fragmento de tecido obtido a partir de biópsia das lesões apresentado maior eficiência no isolamento do patógeno. O método de coloração panóptica destas amostras de exsudato evidenciaram a presença de células leveduriformes globosas (figura 1B) em apenas três casos. Células leveduriformes globosas e hialinas (figura 1C) foram observadas em exame direto pelo método de clarificação em KOH 20% em 22 (38,5%) das amostras clínicas analisadas (fragmento de tecido).

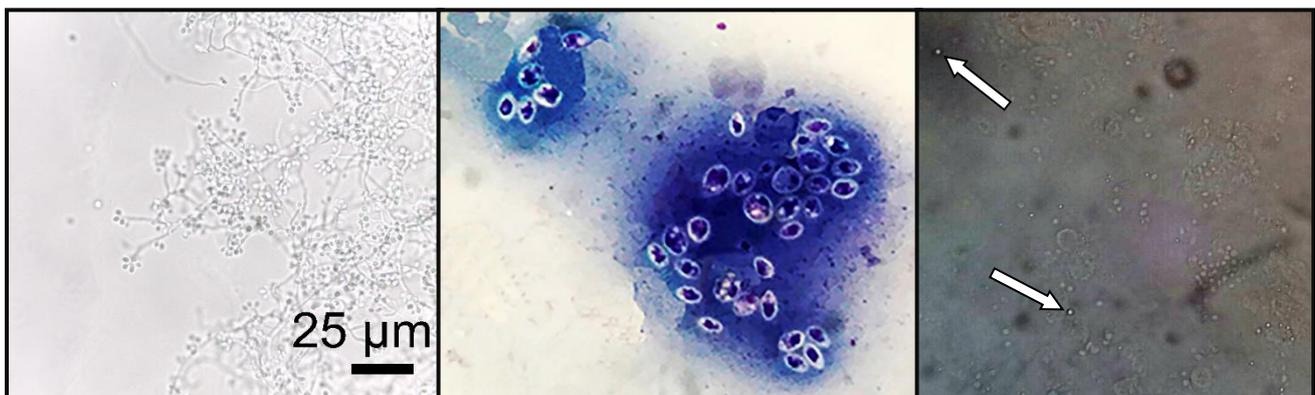


Figura 1. Diagnóstico laboratorial da esporotricose. A) Preparação em lactofenol azul de algodão evidenciando estruturas micromorfológicas da fase filamentosa de *Sporothrix* sp. Magnificação: 400x. B) Preparação panóptica evidenciando células leveduriformes de *Sporothrix* sp em exsudato nodular (setas). Magnificação: 1000x. C) Preparação em KOH 20% evidenciando células leveduriformes de *Sporothrix* sp. em fragmento de tecido da lesão. Magnificação 400x. Fonte: O autor.

5.2 Descrição epidemiológica

5.2.1 Esporotricose humana

5.2.1.1 Distribuição geográfica

Os casos confirmados de esporotricose em humanos apresentaram uma maior incidência em cidades da região metropolitana do Recife (RMR) (91%; n=52), sendo esta a cidade com a maior prevalência (36,8%; n=21), seguida de Olinda (24,6%; n=14), Camaragibe (12,3%; n=7) e Paulista (12,3%; n=7). Jaboatão dos Guararapes foi a cidade da RMR com menor incidência (5,1%; n=3). Fora da RMR, quatro cidades apresentaram casos confirmados: Água Preta, Macaparana e Nazaré da Mata, cada uma com um caso (1,8%), e Vitória de Santo Antão com dois casos (3,5%). O número de ocorrências por cidade foi considerado para 57 casos, uma vez que em dois casos não foi possível verificar o endereço desses pacientes.

A tabela 4 mostra a distribuição geográfica dos casos confirmados de esporotricose humana em Pernambuco entre 2017 e 2018. A figura 2 indica no mapa de Pernambuco a incidência nas cidades com casos registrados de esporotricose humana através de pontos de aquecimento.

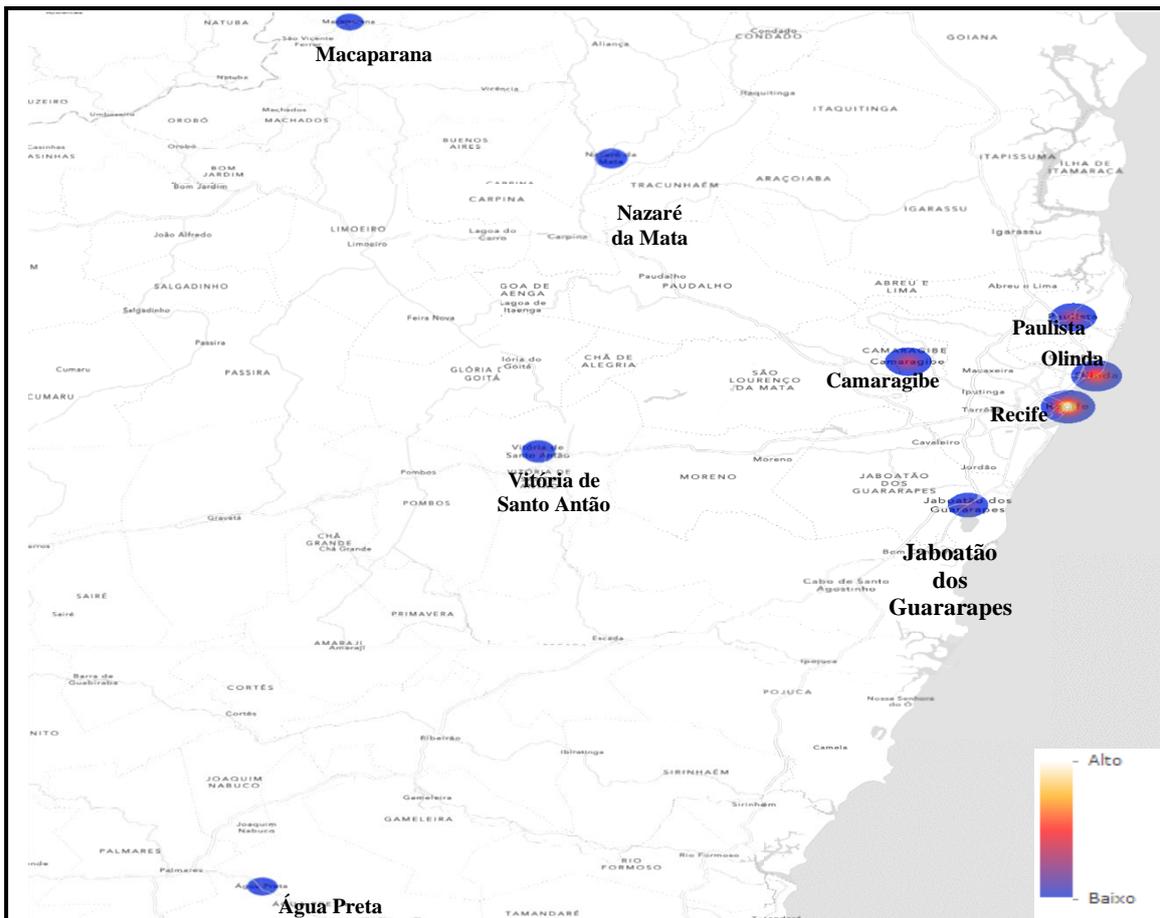


Figura 2. Mapa de Pernambuco indicando as cidades com casos registrados de esporotricose humana entre 2017 e 2018. Os pontos de aquecimento mostram que a cidade de Recife apresentou uma frequência elevada da esporotricose. A cidade de Olinda apresentou uma frequência de moderada para alta. As cidades de Paulista e Camaragibe apresentam uma frequência de moderada para baixa. As cidades de Vitória de Santo Antão, Jaboatão, Macaparana, Água Preta e Nazaré da Mata apresentam uma frequência baixa.

Considerando a distribuição da esporotricose por bairros da RMR, a zona Oeste foi a que apresentou a maior incidência da esporotricose na cidade do Recife, sendo o bairro dos Torrões o que

apresentou maior número de casos (seis), seguido de Engenho do meio (três) e Madalena (um). A segunda maior incidência foi observada nas zonas Sudoeste e Noroeste, cada uma registrando quatro casos de esporotricose, sendo dois casos no bairro da Mangueira, um caso no bairro da Estância e um caso no Bairro de Jardim São Paulo (zona Sudoeste), e um caso no Córrego do Jenipapo, dois em Dois Irmãos e um na Guabiraba, na região Noroeste. Já a região Norte apresentou a menor ocorrência da doença, registrando dois casos no bairro do Arruda e um caso no bairro do Porto da Madeira.

Em Olinda, segunda cidade mais afetada, a região central apresentou o maior número de casos, sendo cinco no bairro de Ouro Preto. A segunda maior incidência se deu nas zonas norte, com três casos no bairro de Rio Doce e um caso em Casa Caiada, e zona sudeste, com dois casos no Bairro Novo e um caso em Amaro Branco.

Em Camaragibe, Tabatinga foi o bairro com o maior número de casos (cinco), seguido de Timbi e Aldeia com um caso cada. Já em Paulista, Janga e Nobre foram os bairros com maior número de casos: dois cada. Os demais bairros de Paulista que registraram casos de esporotricose foram Vila Torres Galvão, Paratibe e Fragoso, cada um com um caso. Em Jaboatão dos Guararapes três bairros registraram um caso cada: Prazeres (regional 5), Santo Aleixo (regional 1) e Cajueiro Seco (regional 5). O mapa da figura 4 mostra a distribuição espacial dos casos de esporotricose humana em bairros da RMR.

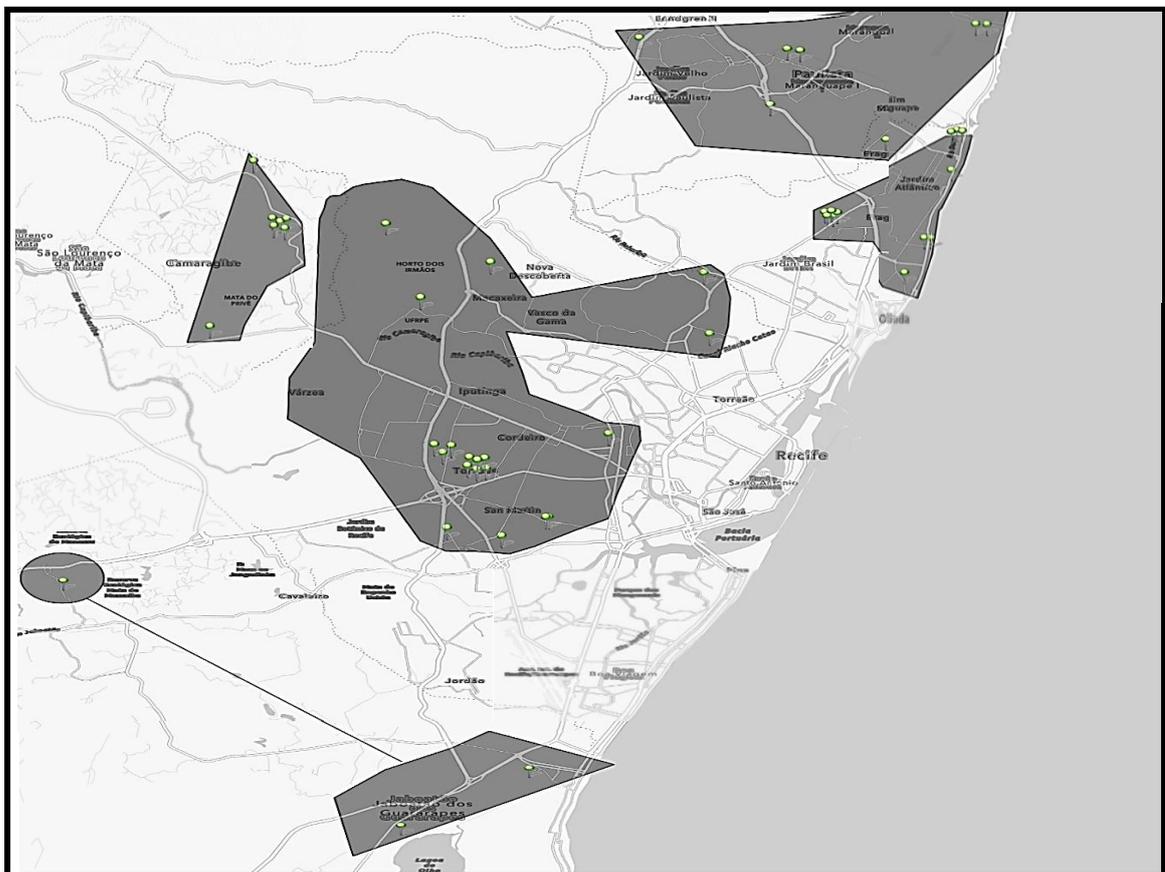


Figura 3. Distribuição espacial de casos de esporotricose humana na Região Metropolitana do Recife. As áreas marcadas em cinza destacam a região afetada, e as marcações em verde representam cada caso de esporotricose nos bairros demarcados.

Tabela 4. Distribuição e incidência de casos de esporotricose humana em Pernambuco entre 2017 e 2018.

Município	Número de casos	Incidência em %
Água Preta	1	1,8
Camaragibe	7	12,3
Jaboatão	3	5,3
Macaparana	1	1,8
Nazaré da Mata	1	1,8
Olinda	14	24,6
Paulista	7	12,3
Recife	21	36,8
Vitória de Sto. Antão	2	3,5

5.2.1.2 Manifestações clínicas, forma de contágio, sítio de lesão, gênero, idade e ocupação prevalentes

Dentre os pacientes do ambulatório de esporotricose avaliados, nenhum deles apresentou manifestação sistêmica da esporotricose, como as formas disseminada (de qualquer natureza) e extracutânea, decorrente de um quadro imunológico deficitário.

Observou-se uma ligeira prevalência da forma mais comum da esporotricose, a forma linfocutânea (45,7%; n=27) (figura 4A). No entanto, a forma cutânea fixa (figura 4B) apresentou-se de forma equivalente à linfocutânea, com uma diferença de apenas dois casos (42,4%; n=25). Apesar da não ocorrência de forma disseminada visceral, a forma cutânea disseminada (figura 4C) se manifestou em sete casos avaliados nesse trabalho (11,9%; n=7). Em 22% dos casos (n=13) os pacientes apresentaram reação de hipersensibilidade, dos quais 11 (18,6%) apresentaram eritema nodoso (figura 4D), e 2 (3,4%) apresentaram síndrome de Sweet (figura 4E)



Figura 4. Manifestações clínicas e reações de hipersensibilidade da esporotricose. A: quadro conhecido como linfangite nodular ascendente, típico da forma linfocutânea da esporotricose. B: Lesão única formada a partir do cancro de inoculação, típica da forma cutânea fixa da esporotricose. C: múltiplas lesões nodulares e ulcerativas, quadro típico da forma cutânea disseminada. D) reação inflamatória formando placas eritematosas (eritema nodoso). E) Lesões pseudovesiculares sobre placa eritematosa, quadro conhecido com síndrome de Sweet. Fonte: Ferraz, C.E.

58,9% das lesões se apresentaram em membros superiores dos pacientes, sendo a mão o órgão mais acometido (30,6%; n=18), seguido de antebraço esquerdo (8,3%; n=5) e antebraço direito (5%; n=3). Nove pacientes apresentaram lesões na região dorsal, sendo esta uma das regiões mais acometidas (13,5%). Os demais sítios de lesão observados foram colo, coxa esquerda, pescoço, face, abdômen, dorso nasal e olho, sendo um acometimento para de cada um desses sítios (1,7%).

Acidentes com felinos estiveram massivamente relacionados com os casos de esporotricose humana em Pernambuco, sendo 89,9% dos casos devido a algum contato com animal doente. Desses contatos, 86,5% foram por arranhadura (n=51), um por mordedura (1,7%) e um contato sem ataque do animal (1,7%). Apenas dois casos não tiveram como causa acidente com felino, sendo um por acidente em superfície contaminada com esporos de *Sporothrix* sp. (1,7%) e um por contato com vegetal (1,7%).

A terapêutica adotada pela equipe médica consistiu em prescrição de 100 mg/dia de itraconazol via oral, esquema terapêutico que apresentou sucesso mesmo em manifestação cutânea disseminada. Em um dos pacientes com essa manifestação foi associada à termoterapia.

Em outro paciente com essa manifestação, porém de forma mais severa, foi aumentada a dose de itraconazol para 200 mg/dia, o qual não apresentou melhora clínica, sendo administrada anfotericina B deoxicolato em dose cumulativa de 1,4 g.

Pacientes de diversas faixas de idade (entre 10 e 77 anos) foram acometidos, não havendo sido observada nenhuma predileção do patógeno por alguma faixa de idade específica. A média de idade dos pacientes foi de 46 anos.

Diferentemente, em relação ao gênero, mulheres foram as mais acometidas, sendo 74,6% dos casos (n=44). Em homens foram 15 casos (25,4%).

Profissionais de diversas áreas foram acometidos, não tendo sido observada prevalência em nenhuma atividade laboral. No entanto, indivíduos que permanecem mais tempo em casa, como aposentados e donas de casa sem atividade laboral externa, foram mais afetados, sendo oito casos em indivíduos aposentados (13,4%) e oito em donas de casa (13,4%). Ainda dentre esses indivíduos aposentados, as mulheres também foram as mais acometidas, com sete casos de oito registrados, representando 87,5% de casos dentre aposentados.

5.2.2 Esporotricose felina

5.2.2.1 Distribuição geográfica

Cinquenta e dois casos de esporotricose felina foram confirmados no mesmo período pelo Laboratório de Endemias de Pernambuco (LABEND/PE), estando estes concentrados na RMR, assim como os casos de esporotricose humana. Olinda foi a cidade com a maior incidência observada (65,4%; n=34) seguida de Recife e Jaboatão dos Guararapes com cinco casos cada (9,6%). Camaragibe vem em seguida com quatro casos (7,7%), seguida por Abreu e Lima (5,8%; n=3). Fora da RMR, a única cidade que apresentou caso confirmado de esporotricose foi Vitória de Santo Antão, com um caso (1,9%).

A tabela 5 e a figura 6, abaixo, mostram a distribuição geográfica dos casos confirmados de esporotricose felina em Pernambuco entre 2016 e 2018. A figura 7 indica no mapa de Pernambuco incidência nas cidades com casos registrados da esporotricose felina.

Tabela 5. Distribuição e incidência de casos de esporotricose felina em Pernambuco entre 2016 e 2018.

Município	Número de casos	Incidência em %
Abreu e Lima	3	5,8
Camaragibe	4	7,7
Jaboatão	5	9,6
Olinda	34	65,4
Recife	5	9,6
Vitória de Sto. Antão	1	1,9

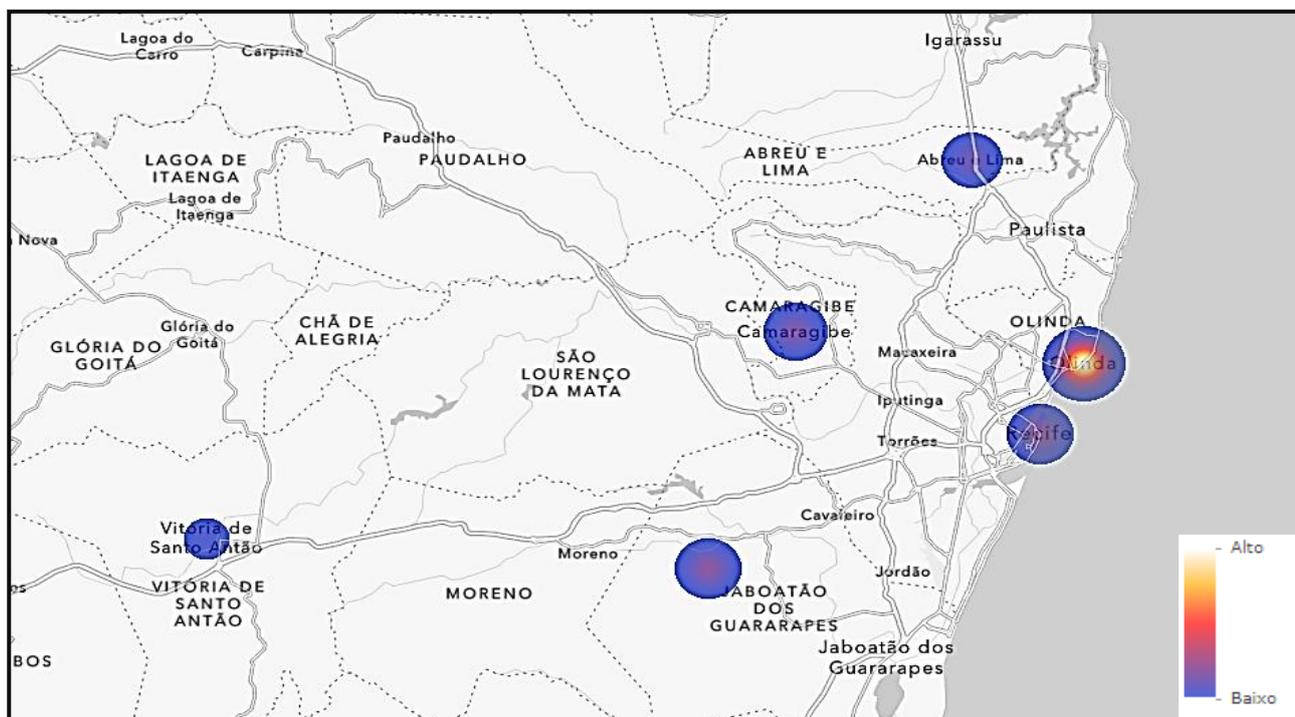


Figura 5. Mapa de Pernambuco indicando as cidades com casos registrados de esporotricose felina entre 2017 e 2018. Os pontos de aquecimento mostram que a cidade de Olinda apresentou uma frequência elevada da esporotricose. As demais cidades (Camaragibe, Vitória de Santo Antão, Jaboatão, Recife e Abreu e Lima) apresentam uma frequência de moderada para baixa.

Em Recife, três bairros da zona Norte apresentaram casos: Casa amarela (dois), Tamarineira (um) e Campo Grande (um). Um caso no bairro do Pina (zona Sul) também foi registrado. Em Olinda, cidade mais afetada, 13 bairros tiveram casos registrados: na região Central, Jardim Fragoso (oito casos) e Ouro Preto (três casos); na região Sudoeste, os bairros de São Benedito e Sapucaia (um caso cada), Jardim Brasil II (seis casos) e Peixinhos (três casos); na região Norte, Rio Doce (cinco casos), Jardim Atlântico e Casa Caiada (um caso cada); Águas Compridas, na região Oeste, e Tabajara, na região Noroeste, apresentaram um caso cada. Em Camaragibe, apenas o bairro de Tabatinga registrou casos (três). Jaboatão dos Guararapes, apresentou ocorrência em Santo Aleixo (regional 1), Curado II (dois casos) e Curado III (um caso) (regional 3) e Barra de Jangada (regional 6) com um caso. A figura 8 abaixo mostra a distribuição espacial de casos de esporotricose felina na RMR.

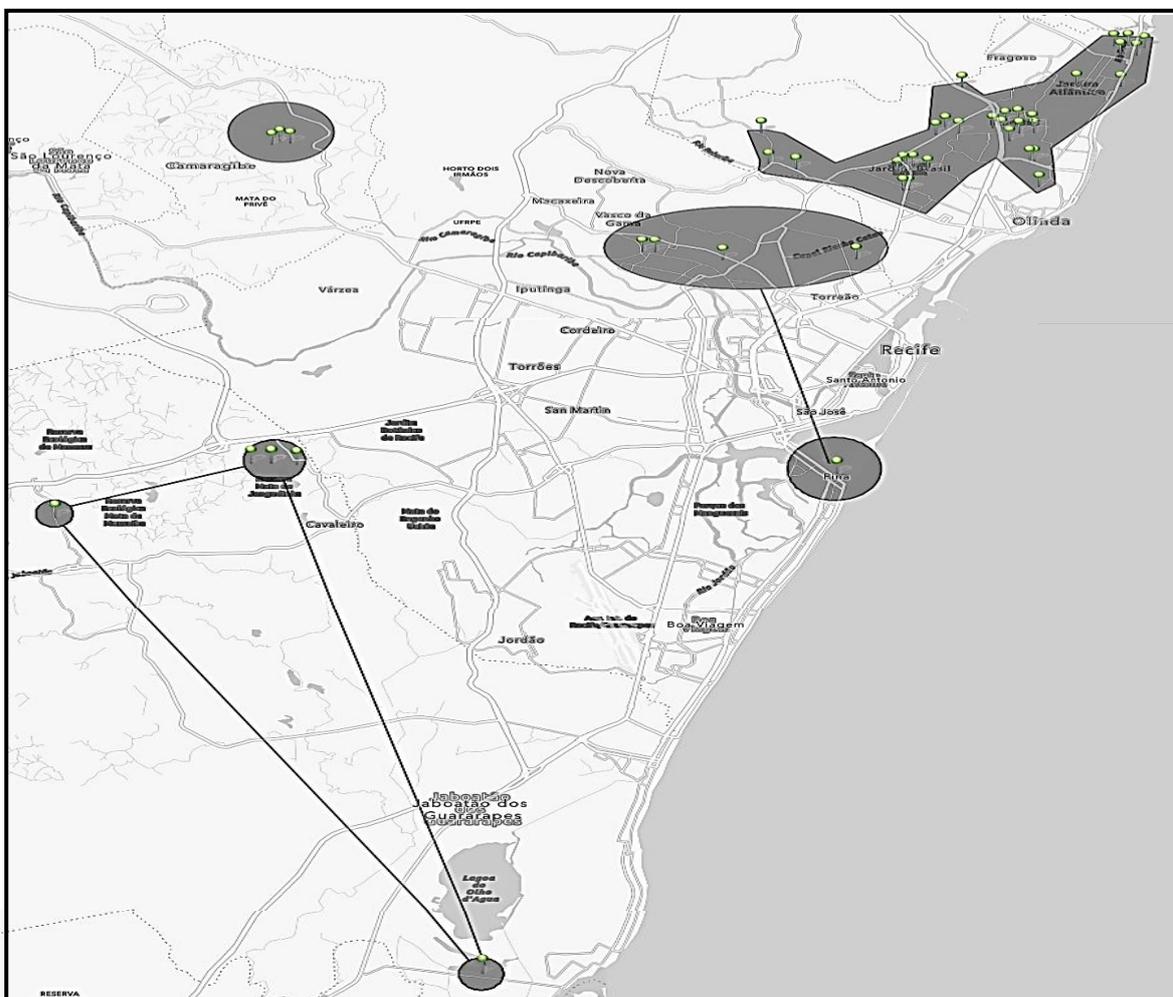


Figura 6. Distribuição espacial de casos de esporotricose felina na Região Metropolitana do Recife. As áreas marcadas em cinza destacam a região afetada, e as marcações em verde representam cada caso de esporotricose nos bairros demarcados.

5.2.2.2 Manifestações clínicas, sítios de lesão, e perfil dos animais acometidos

Foi verificada a ocorrência de lesões cutâneo disseminadas em 70,3% dos casos (n=37), e lesões localizadas em 29,7% dos casos (n=15) entre os felinos acometidos, as quais se apresentaram nos seguintes sítios anatômicos: cabeça (59,2%; n=31), focinho (45,8%; n=24), membros anteriores (39,9%; n=21), membros posteriores (32,3%; n=17), tronco (20,9%; n=11), pescoço (15,2%; n=8) e calda (5,7%; n=3). Em 82,7% dos casos (n=43), foi observado sangramento nas lesões, e em 69,2% (n=36) os animais apresentaram lesões com prurido.

Em relação ao perfil dos animais acometidos, observou-se prevalência no gênero masculino, com 75% (n=39) de ocorrências entre gatos machos. Desses animais, apenas 13,5% (n=7) eram castrados. Em 40% dos casos (n=21) os proprietários dos animais relatam ter havido algum tipo de agressão por parte de outros gatos. Em 46,2% (n=24) não houve agressão de outros gatos, segundo relato dos proprietários, e 13,5% (n=7) não souberam informar, porém os mesmos relatam que esses animais tinham contato com terra ou jardim. O tempo médio de duração das lesões até o período da coleta foi 52,4 dias, abrangendo uma faixa entre 1 e 180 dias de lesão. Considerando os dados não omissos, a média de idade dos animais foi de 2,56, sendo a faixa de idade entre 0 e 12 anos.

5.3 Caracterização genotípica

Das amostras de pacientes humanos isoladas em cultura, foram obtidos DNA genômico e obtida a identificação genotípica de 35 isolados de *Sporothrix* sp. Das amostras de felinos foi obtida identificação genotípica em 16 isolados.

Na busca por sequências similares no *GenBank*, as sequências do gene CAL obtidas de isolados clínicos no presente trabalho apresentaram semelhança de 100% às sequências de gene CAL de *Sporothrix* sp. depositadas na biblioteca, tendo 33 (94,2%) das amostras isoladas de pacientes humanos apresentado similaridade a sequências de *S. brasiliensis*, enquanto apenas duas sequências (4,8%) apresentaram similaridade a sequências de *S. schenckii*. No caso das sequências do gene CAL obtidas de felinos, todas apresentaram similaridade a *S. brasiliensis*.

A análise filogenética pelo método de Máxima Verossimilhança confirmou a identificação desses isolados, como mostra a figura 7 abaixo, onde o filograma de sequências do gene CAL obtidas de *Sporothrix* sp., oriundos de pacientes humanos, mostra valores de *bootstrap* fornecendo um suporte estatístico de 97% no alinhamento de 33 dessas sequências com a sequência de *Sporothrix brasiliensis* do *GenBank* HQ426959.1/IPEC34007, e de 99% no alinhamento de duas dessas sequências com a sequência de *Sporothrix schenckii* do *GenBank* JQ041905.1/Ss141.

A mesma análise confirmou a identificação dos isolados obtidos de felinos como *S. brasiliensis*, com valor de *bootstrap* fornecendo suporte estatístico de 100% no alinhamento dessas 16 sequências com a sequência de *Sporothrix brasiliensis* do *GenBank* KC693878.1/CBS_133005, como demonstrado na figura 8.

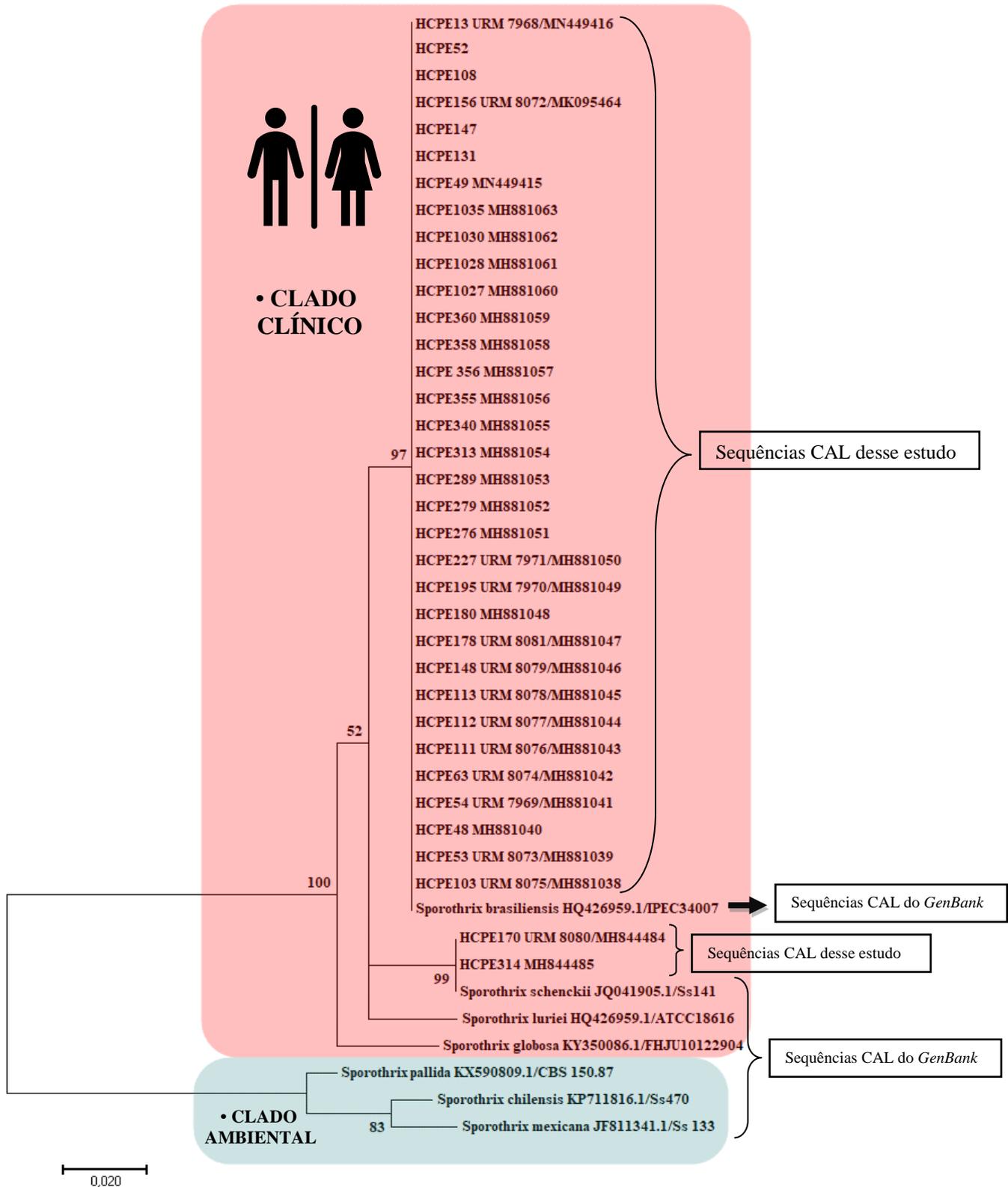


Figura 7. Filograma da região do gene CAL de amostras de *Sporothrix* sp. obtidas de humanos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que 33 dessas amostras pertencem a espécie *S. brasiliensis* e duas a *S. schenckii*. A

análise de *Bootstrap*, replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.

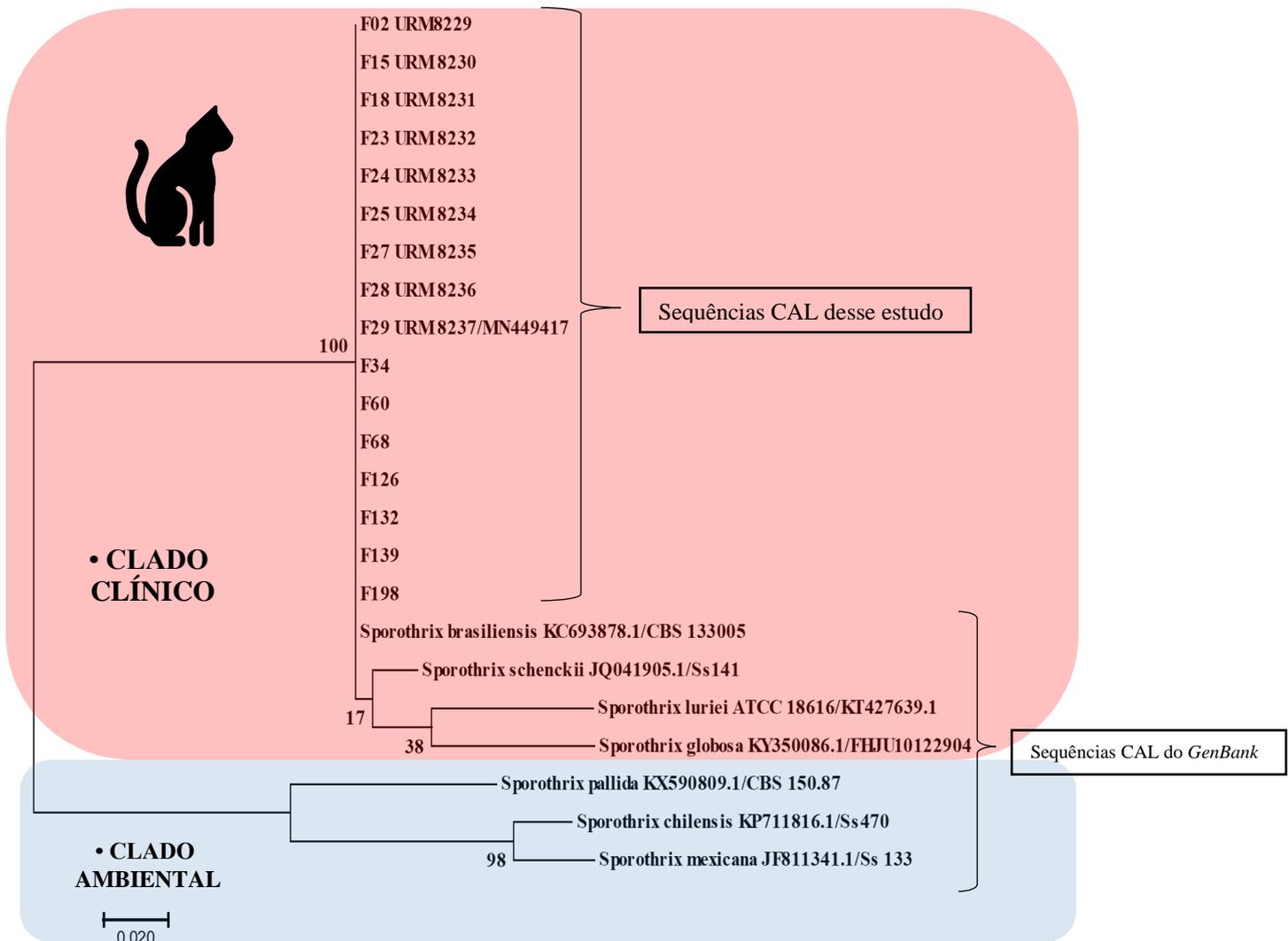


Figura 8. Filograma da região do gene CAL de amostras de *Sporothrix* sp. obtidas de felinos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que todas as 16 amostras pertencem a espécie *S. brasiliensis*. A análise de *Bootstrap*, replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.

Correlacionando filogeneticamente os isolados de *S. brasiliensis* obtidos de humanos e felinos, observa-se na figura 9 abaixo não haver diferenciação dessas cepas em linhagens ou clados diferentes em função da origem geográfica destas, ou do hospedeiro, estando todos os isolados dessa espécie, obtidos nesse estudo, alinhados filogeneticamente a isolados de *S. brasiliensis* provenientes de diferentes estados, de diferentes regiões do Brasil. A mesma falta de diversidade também é observada entre os isolados clínicos de *S. schencki strictu sensu* de Pernambuco e de outros estados do Brasil.

Considerando a identificação genotípica dos isolados, a tabela 6 abaixo apresenta a identificação de cada amostra, correlacionando-as com o local de origem desta, bem como com a forma clínica apresentada pelo hospedeiro humano ou felino.



Figura 9. Filograma da região do gene CAL de amostras de *Sporothrix* sp. obtidas de felinos e humanos. O método estatístico de Máxima Verossimilhança indica que os isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* de Pernambuco, apresentam pouca diversidade em relação a cepas dessas espécies originárias de outros estados do Brasil. A análise de *Bootstrap*, replicada 1000x, apresenta altos valores por ramo, dando suporte ao alinhamento entre as sequências.

Tabela 6. Identificação genotípica de isolados clínicos de *Sporothrix* sp.

Código do laboratório	Código da coleção	Espécie	Município/Bairro	Forma de contágio	Forma clínica	Hospedeiro	Nº. do GenBank
F02	URM 8229	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Jd. Atlântico	-	Localizada	Felino	-
HCPE 13	URM 7968	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Torrões	Arranhadura de felino	Cutânea fixa	Humano	MN449416
F15	URM 8230	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Bultrins	Contato com solo	Cutânea Disseminada	Felino	-
F18	URM 8231	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	-	Localizada	Felino	-
F23	URM 8232	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Jd. Fragoso	-	Cutânea Disseminada	Felino	-
F24	URM 8233	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Jd. Fragoso	Agressão de outro(s) gato(s)	Cutânea Disseminada	Felino	-
F25	URM 8234	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Jd. Fragoso	Agressão de outro(s) gato(s)	Cutânea Disseminada	Felino	-
F27	URM 8235	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/Tabatinga	-	Cutânea Disseminada	Felino	-
F28	URM 8236	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Jd. Brasil II	Contato com solo	Localizada	Felino	-
F29	URM 8237	<i>S. brasiliensis</i>	Paulista/Pau Amarelo	-	Cutânea Disseminada	Felino	MN449417
F34	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Rio Doce	Arranhadura de felino	Cutânea Disseminada	Felino	-
HCPE 48	-	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/Timbi	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881040
HCPE 49	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Mangueira	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MN449415
HCPE 52	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Torrões	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	-
HCPE 53	URM 8073	<i>S. brasiliensis</i>	Paulista/Vila Torres Galvão	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881039
HCPE 54	URM 7969	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Madalena	Contato com vegetal contaminado	Linfocutânea	Humano	MH881041
F60	-	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/-	Contato com solo	Linfocutânea	Felino	-
HCPE 63	URM 8074	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Torrões	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881042
F68	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Pina	Agressão de outro(s) gato(s)	Localizada	Felino	-
HCPE 103	URM 8075	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/Aldeia	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881038
HCPE 108	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Eng. Do Meio	Arranhadura de felino	Cutânea Disseminada	Humano	-
HCPE 111	URM 8076	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Jd. São Paulo	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881043
HCPE 112	URM 8077	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Bairro Novo	Arranhadura de felino	Cutânea Disseminada	Humano	MH881044
HCPE 113	URM 8078	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Cór. do Jenipapo	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881045
F126	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda São Benedito	Agressão de outro(s) gato(s)	Cutânea Disseminada	Felino	-
HCPE131	-	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/Tabatinga	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	-
F132	-	<i>S. brasiliensis</i>	Abreu e Lima/Matinha	Agressão de outro(s) gato(s)	Localizada	Felino	-
F139	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Casa Amarela	Agressão de outro(s) gato(s)	Cutânea Disseminada	Felino	-
HCPE 147	-	<i>S. brasiliensis</i>	Camaragibe/Tabatinga	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	-
HCPE 148	URM 8079	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	Arranhadura de felino	Cutânea Disseminada	Humano	MH881046
HCPE 156	URM 8072	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Águas Compridas	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MK095464
HCPE 170	URM 8080	<i>S. schenckii</i>	Vitória de Santo Antão/-	Acidente em superfície	Linfocutânea	Humano	MH844484

HCPE 178	URM 8081	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881047
HCPE 180	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Porto da Madeira	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881048
HCPE 195	URM 7970	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	Contato com felino s/ acidente	Cutânea Fixa	Humano	MH881049
F198	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Peixinhos	Agressão de outro(s) gato(s)	Cutânea Disseminada	Felino	-
HCPE 227	URM 7971	<i>S. brasiliensis</i>	Jaboão/Prazeres	Mordedura de felino	Cutânea Disseminada	Humano	MH881050
HCPE 276	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881051
HCPE 279	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Arruda	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881052
HCPE 289	-	<i>S. brasiliensis</i>	Jaboão/Cajueiro	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881053
HCPE 313	-	<i>S. brasiliensis</i>	Paulista/Fragoso	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881054
HCPE 314	-	<i>S. schenckii</i>	Água Preta	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH844485
HCPE 340	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Amaro Branco	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881055
HCPE 355	-	<i>S. brasiliensis</i>	Paulista/Paratibe	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881056
HCPE 356	-	<i>S. brasiliensis</i>	Paulista/Nobre	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881057
HCPE 358	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Rio Doce	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881058
HCPE 360	-	<i>S. brasiliensis</i>	Recife/Estância	-	Cutânea Fixal	Humano	MH881059
HCPE 1027	-	<i>S. brasiliensis</i>	Macaparana	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881060
HCPE 1028	-	<i>S. brasiliensis</i>	Olinda/Ouro Preto	Arranhadura de felino	Linfocutânea	Humano	MH881061
HCPE 1030	-	<i>S. brasiliensis</i>	Nazaré da Mata	Arranhadura de felino	Cutânea Disseminada	Humano	MH881062
HCPE 1035	-	<i>S. brasiliensis</i>	Dois irmãos	Arranhadura de felino	Cutânea Fixa	Humano	MH881063

A tabela 7 abaixo correlaciona, de forma sucinta, dados epidemiológicos da esporotricose em Pernambuco à caracterização genotípica dos isolados clínicos de *Sporothrix* sp., descrevendo grupos de prevalência em hospedeiros humanos e animais.

Tabela 7. Descrição das características prevalentes dos casos registrados de esporotricose humana e felina em Pernambuco.

Hospedeiro	Casos registrados	Espécie prevalente	Forma de contágio prevalente	Forma clínica prevalente	Grupos prevalentes (humanos)		
					Gênero	Idade	Ocupação
Humano	59	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	Arranhadura de felino	Linfocutânea e cutânea fixa	Feminino	10-77 anos	Doméstica
Animal	51	<i>Sporothrix brasiliensis</i>	contato com outro(s) gato(s)	Cutânea disseminada	Masculino	0-12 Anos	-

5.4 Perfil de sensibilidade antifúngica

Dentre os sete fármacos testados frente 38 amostras testadas de *Sporothrix brasiliensis*, isoladas de humanos e felinos, a média geométrica (MG) das CIMs obtidas demonstrou que a

terbinafina foi o antifúngico que apresentou melhor atividade frente a esses isolados, com CIM de 0,3 µg/mL (variação de CIM= 0,125-8 µg/mL), sendo seguida por cetoconazol (CIM= 0,6 µg/mL; variação de CIM= 0,03-16 µg/mL), itraconazol (CIM= 1 µg/mL; variação de CIM= 0,03-16 µg/mL), anfotericina B (CIM= 1,3; variação de CIM= 0,25-8 µg/mL) e voriconazol (CIM= 6 µg/mL; variação de CIM= 0,5-16 µg/mL). Fluconazol e iodeto de potássio apresentaram elevados valores de CIM frente a *Sporothrix* sp., com CIM de 27 µg/mL (variação de CIM= 0,125-64 µg/mL) para fluconazol e de 46 µg/mL (variação de CIM= 2-64 µg/mL) para o iodeto.

Para as duas amostras de *S. schenckii*, itraconazol foi o que apresentou melhor atividade antifúngica (CIM= 0,04; variação de CIM= 0,03-0,06 µg/mL), seguido por terbinafina (CIM= 0,125; variação de CIM= 0,125 µg/mL), cetoconazol (CIM= 0,2; variação de CIM= 0,06-1 µg/mL), anfotericina B (CIM=0,7 µg/mL; variação de CIM= 0,25-2 µg/mL) e voriconazol (CIM=3 µg/mL; variação de CIM= 0,5-16 µg/mL). Fluconazol e iodeto de potássio apresentaram altos valores de CIM, sendo 8 µg/mL (variação de CIM= 1-64 µg/mL) para fluconazol e 45,2 µg/mL (variação de CIM= 32-64µg/mL) para o iodeto de potássio.

Dentre os fármacos que apresentaram maior eficácia frente a *Sporothrix brasiliensis*, foram observadas diferenças estaticamente significativas (valor de $p < 0,05$) entre as CIMs obtidas de itraconazol e terbinafina ($p < 0,001$); anfotericina e cetoconazol ($p < 0,006$). Em relação às CIMs obtidas frente aos isolados de *S. schenckii*, não foi verificada nenhuma diferença significativa entre os fármacos testados.

A tabela 8 abaixo apresenta a variação de CIM e os valores de CIM média dos sete fármacos testados frente as cepas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, bem como as CIMs para a ATCC 22019 *Candida parapsilosis*.

Tabela 8. Valores de CIM em µg/mL de sete fármacos antifúngicos frente a 38 isolados clínicos de *S. brasiliensis* e duas de isolados clínicos de *S. schenckii*.

Espécie (n)		Drogas antifúngicas						
		ANFOB CIM	CETO CIM	FLC CIM	ITC CIM	KI CIM	TBF CIM	VRC CIM
<i>S. brasiliensis</i> (38)	Variação	0,125-16	0,03-64	1-64	0,03-16	2-64	0,125-8	0,5-16
	MG	1,3	0,6	31	1	47	0,3	6,3
<i>S. schenckii</i> (2)	Variação	0,25-2	0,06-1	1-64	0,03-0,06	32-64	0,125-0,125	0,5-16
	MG	0,7	0,24	8	0,04	45,2	0,125	3
ATCC 22019	CIM	2	0,03	0,5	1	64	0,125	0,5

ANFOB: Anfotericina B; CETO: Cetoconazol; FLC: Fluconazol; ITC: Itraconazol; KI: Iodeto de potássio; TBF: Terbinafina; VRC: Voriconazol; CIM: Concentração inibitória mínima.

5.5 Atividade anti-*Sporothrix* de extratos de plantas

O extrato de aroeira, *Schinus terebinthifolius*, foi o que apresentou melhor atividade frente aos isolados de *Sporothrix brasiliensis*, apresentando CIM média de 3 µg/mL (variação de CIM= 1-8 µg/mL), seguido pelo extrato de angico-branco, *Anadenanthera colubrina* (CIM= 5,3 µg/mL; variação de CIM= 2-32 µg/mL). O extrato de pau-ferro (*Libidibia ferrea*) apresentou atividade frente a esses isolados, porém em concentrações mais elevadas em relação aos demais extratos testados, apresentando CIM média de 8 µg/mL numa variação de CIM entre 2-64 µg/mL.

Estatisticamente, foi verificada diferença significativa entre o extrato de aroeira-vermelha e os demais extratos, onde o valor de $p < 0,005$ foi observado correlacionando-se esse extrato com o de angico-branco ($p < 0,042$) e o de pau-ferro ($p < 0,028$). No entanto, entre os extratos de angico-branco e o de pau-ferro não foi observada diferença estatisticamente significativa.

Em relação a atividade desses extratos frente a *Sporothrix schenckii*, não foi observada diferença estatística, havendo todos os extratos apresentado atividade contra isolados dessa espécie em baixas concentrações. A tabela 9 apresenta os valores de CIM média e a variação de CIM dos extratos testados frente a isolados de *Sporothrix* sp. obtidos nesse estudo.

Tabela 9. Atividade anti-*Sporothrix* de três extratos hidroalcoólicos de três plantas

Espécie (n)		Extratos hidroalcoólicos		
		<i>Schinus terebinthifolius</i>	<i>Anadenanthera colubrina</i>	<i>Libidibia ferrea</i>
		CIM	CIM	CIM
<i>S. brasiliensis</i> (8)	Varição	1-8	2-32	2-64
	MG	3	5,3	8
<i>S. schenckii</i> (2)	Varição	2	2	4
	MG	2	2	4

6. DISCUSSÃO

No Brasil, desde 1998, um surto de esporotricose se estabeleceu no estado do Rio de Janeiro, na região Sudeste (Barros et al., 2003; 2004), em decorrência da transmissão zoonótica promovida por gatos infectados, via de transmissão apresentada em 4.750 dos 5000 casos de esporotricose humana entre 1998 e 2015 (Gremião et al., 2017).

Além do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Rio Grande do Sul e São Paulo têm registro de surtos da esporotricose (Fleury et al., 2001; Poester et al., 2018b), estados esses que apresentam condições climáticas diversas, variando entre climas tropicais e subtropicais, úmidos, quentes ou secos

(CEPERJ; Caus et al., 2018; Brandolt et al., 2018). Exceto no Espírito Santo, onde a ocorrência de surtos de esporotricose não teve como principal fator a transmissão zoonótica (De Araújo et al. 2015; Caus et al., 2018), os demais estados apresentaram essa forma de transmissão (Rodrigues et al., 2015; Gremião et al., 2017; Poester et al., 2018b).

O Estado de Pernambuco é caracterizado por seu clima tropical e quente, que varia entre úmido e seco entre os municípios (AGEITEC, 2011). Apresenta um território que cobre uma área de 98.068,21 km² e uma população estimada de 8.796.448 habitantes (IBGE, 2017).

A capital do estado, Recife, está situada na latitude 8° 04 '03' 's e longitude 34° 55' 00 " w no centro da costa do nordeste brasileiro, banhada a leste pelo oceano Atlântico e situada a 4 m de altitude acima do nível do mar (PCR, 2013). Esta cidade está inserida na área central da região metropolitana do Recife (mesorregião), que apresenta um território de 3.992 Km² composto por 15 municípios, dos quais, além de Recife, Jaboatão dos Guararapes e Olinda são as cidades mais populosas (PCR, 2013; IBGE, 2017; FNEM, 2018).

No presente estudo foi-se demonstrado que 91% dos casos de esporotricose humana registrados em Pernambuco apresentaram-se na RMR, em cidades caracterizadas pelo clima quente e úmido. Apenas quatro casos foram registrados em cidades interioranas, sendo um caso em Vitória de Santo Antão (a 48 Km de Recife), um em Água preta (Mata Meridional Pernambucana, a 102 Km de Recife), um em Macaparana (Mata Setentrional Pernambucana, a 125 Km de Recife) e um em Nazaré da Mata (Mata Setentrional Pernambucana a 63 Km de Recife). Em relação à esporotricose felina, apenas uma cidade do interior registrou um caso, em Vitória de Santo Antão, tendo os demais casos ocorridos na RMR.

A ocorrência da esporotricose, no contexto geoclimático do estado de Pernambuco, apresenta características semelhantes às apresentadas não só em outros estados brasileiros, mas também em relação ao apresentado na América Latina como um todo, uma vez que esta é considerada uma área de alta incidência da esporotricose, com ocorrência em quase todos os países da América Central e América do Sul, e que apresenta condições climáticas variando entre clima subtropical, tropical, quente, úmido e seco em alguns países desses continentes, fator que pode favorecer a prevalência de fungos patogênicos como *Sporothrix* sp. (Díaz, 1989; Bustamante e Campos, 2001; Hay e Morris-Jones, 2008; Queiroz-Telles et al., 2011; Chakrabarti et al., 2015; Orofino-Costa et al., 2017).

Os casos em Pernambuco ocorreram majoritariamente em decorrência de acidentes com gatos acometidos (89,9% dos casos), sendo Recife, com 21 casos, e Olinda, com 14, as cidades com maior prevalência de esporotricose humana, seguidas por Camaragibe e Paulista que apresentaram o mesmo número de casos registrados, sete. Dos dois casos em que ocorreu transmissão por via sapronótica, um ocorreu em Recife, no Bairro da Madalena (zona Oeste de Recife) e outro em Vitória de Santo Antão, respectivamente por acidente em espinho de flor e por acidente em superfície de uma parede.

Apesar de ser uma das cidades mais populosas da RMR, Jaboatão dos Guararapes apresentou baixa incidência de esporotricose em humanos, com o registro de apenas três casos. No entanto, é importante ressaltar que os casos ocorridos nessa cidade se apresentaram em função de transmissão zoonótica e que, dentre os casos de esporotricose felina, cinco foram registrados nessa cidade, fatores que indicam um potencial epidêmico no município, bem como uma possível subnotificação de casos. Possível subnotificação de casos de esporotricose felina também se observa em Recife, com registro de apenas cinco casos, uma vez que 20 dos 21 casos de esporotricose humana registrados na cidade tiveram como forma de transmissão acidente com felinos acometidos.

No estudo de Silva et al. (2018), Recife apresentou-se como a cidade com a segunda maior ocorrência de esporotricose felina, com 15 casos registrados em dois anos. No entanto, os autores do estudo apontam que 12 dos 15 casos registrados tratava-se de animais abandonados no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco, onde existe um centro de atendimento veterinário, não se sabendo a origem desses animais. O mesmo estudo traz ainda as cidades de Abreu e Lima e Olinda, cidades aqui descritas, com uma ocorrência de 18 e três casos, respectivamente.

No presente trabalho, todos os animais analisados tinham um proprietário responsável, sendo possível detectar com precisão a origem desses felinos. A redução do número de casos em Abreu e Lima, de 18 casos para três, em Recife, de 15 para cinco, não aponta para um controle da doença nessas cidades, mas pode indicar, na verdade, uma subnotificação e/ou ainda abandono de animais doentes, fenômeno muito comum, uma vez que o tratamento da doença em animais é difícil e dispendioso (Gremião et al., 2015). Uma vez abandonados e sem um controle de zoonoses efetivo pelo poder público, não se tem um mapeamento adequado e nem uma noção exata da dimensão da ocorrência dessa doença nos municípios apontados.

Em relação ao município com o maior número de casos, Olinda, observou-se um aumento de mais de 11 vezes em relação ao que a cidade apresentou no estudo de Silva et al. (2018), de 3 para 34 casos. Uma vez que todos os casos aqui tratados são de animais domésticos, não é possível precisar o fator de aumento no número de casos, porém pode-se inferir que, possivelmente, com o aumento da informação e campanhas de conscientização sobre a doença no município, alguns proprietários de animais tenham buscado tratamento para seus animais ao invés de abandoná-los. Além disso, segundo Brizeno, Silva e Bassoli (2020), Olinda tem sido modelo no que diz respeito a ações educativas sobre a esporotricose, inclusive promovendo capacitações a profissionais da Secretaria de Saúde e estudos de caso da doença, diferentemente do que ocorre em outras cidades pernambucanas.

Olinda e Recife são cidades que apresentam características urbanas semelhantes, com grande concentração de prédios e casas, áreas desmatadas e carências estruturais no que diz respeito ao saneamento básico e controle de zoonoses, fatores que, somados às características ambientais podem promover a ocorrência massiva de doenças como a esporotricose em seus territórios.

A ocorrência massiva de casos de esporotricose humana e felina na RMR, bem como ocorrências pontuais em cidades do interior de Pernambuco, somados à forma majoritária de transmissão por via zoonótica, corroboram os trabalhos de Rodrigues et al. (2013), Gutierrez-Galhardo et al. (2015), Gremião et al. (2017) Brandolt et al. (2018) e Poester (2018b), que demonstram alta incidência da esporotricose em todo território nacional em decorrência da transmissão zoonótica. Esses fatores também demonstram um potencial para que o estado apresente futuramente o cenário que Gutierrez-Galhardo et al. (2015) classificam como fenômeno de epidemia/endemia zoonótica urbana.

A ocupação prevalente (trabalhadoras do lar) dentre os casos ocorridos demonstra que o perfil socioeconômico de pacientes acometidos de esporotricose em Pernambuco é predominante dentre grupos de baixa renda, assim como descrito no estudo realizado por Silva et al. (2012), em que é descrita a predominância dessa micose em regiões mais pobres do Rio de Janeiro. A distribuição espacial dos casos de esporotricose humana na RMR, apresenta a mesma característica sociodemográfica da epidemia de esporotricose no Rio de Janeiro, onde a região de maior ocorrência é composta por bairros de classe média baixa (Silva et al., 2012; Alzuguir et al., 2020).

Outro fator de equivalência, nesse sentido, entre o surto apresentado em Pernambuco ao do Rio de Janeiro é a prevalência em indivíduos do gênero feminino, o qual foi o mais acometido pela esporotricose no estado nordestino, correspondendo a 74,6% dos casos, assim como observado em estudo de casos de esporotricose no município de Duque de Caxias, Rio de Janeiro, que descreveu uma prevalência de 65,4% do gênero feminino entre os casos (Alzuguir et al., 2020).

Essa mesma característica se apresenta em um estudo retrospectivo de casos de esporotricose no Estado do Rio Grande do Sul, onde num universo de 100 casos descritos, 63 desses ocorreram em mulheres (Brandolt et al., 2018). Diferentemente do ocorrido em Pernambuco e nos demais estados citados, o Espírito Santo apresenta trabalhadores rurais pertencentes ao gênero masculino como grupo social mais acometido pela esporotricose naquele estado, bem como a via sapronótica como prevalente na transmissão do patógeno (Caus et al., 2018).

A prevalência do gênero feminino em casos de esporotricose em Pernambuco pode estar ligada ao fato de que a maioria dos cuidadores de animais são mulheres que passam a maior parte do tempo em casa, por estarem desempregadas ou aposentadas, uma vez que os casos de acidentes com felinos ocorrem em função do cuidado dos proprietários desses animais direcionados a estes (Barros et al., 2004; Silva et al., 2012).

Evidencia-se que a transmissão da doença se deu em decorrência de cuidados dispendidos a animais doentes, uma vez que a maioria das lesões se deu em membros anteriores, com uma frequência de 58,9% dos casos, especialmente nas mãos (30,6% das ocorrências).

Segundo a Pesquisa Nacional em Saúde do Brasil feita em 2013, 23,6% dos domicílios do Nordeste brasileiro possuem gatos (PNS, 2013). Em números reais, considerando-se os gatos domésticos e de rua, a região apresentou 7,3 milhões desses animais, dos quais 971.127 estão em Pernambuco. O último levantamento, entretanto, mostra que o Nordeste hoje detém 24,1% do número de felinos (PNS, 2019), provavelmente tendo havido um crescimento nessa população no estado de Pernambuco.

Esse dado indica que, se medidas de controle mais efetivas como a de notificação compulsória para casos de esporotricose felina, mapeamento de casos, e campanhas de conscientização mais efetivas em relação à doença no estado não forem tomadas, o quadro da esporotricose apresentado no estado do Rio de Janeiro pode se apresentar em Pernambuco. No entanto, como relatado em Silva et al. (2012), que por se tratar de uma doença que gera problemas de saúde em algumas áreas geográficas e em desenvolvimento, o cenário que se apresenta para o futuro é preocupante.

Pacientes humanos acometidos de esporotricose em Pernambuco apresentaram de forma equivalente as manifestações clínicas linfocutânea (45,7%) e cutânea fixa (42,4%).

Lopes-Bezerra, Mora-Montes e Bonifaz (2017) apontam que a forma linfocutânea é a que se manifesta com maior frequência, com aproximadamente 65% dos casos apresentando essa manifestação clínica. Zancopé-Oliveira (2015) afirma que a forma cutânea fixa representa 20% dos casos de esporotricose. A mesma autora ainda ressalta que a ocorrência dessa forma clínica estaria ligada a uma sensibilização primária do indivíduo à esporotriquina, toxina produzida por espécies patogênicas de *Sporothrix* sp. Dessa forma, a alta ocorrência da forma cutânea fixa entre pacientes do presente estudo pode indicar uma grande exposição da população pernambucana à esporotriquina, no entanto, nenhum teste foi realizado nesse sentido, sendo um ponto a ser verificado em estudos posteriores.

Em sete dos casos relatados no presente trabalho, a manifestação clínica apresentada em casos de esporotricose humana foi a cutânea disseminada, menos frequente das manifestações cutâneas relatadas, com cerca de 8% de frequência dentre os casos relatados na literatura (Barros, Paes e Schubach, 2011; Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017). Nos casos aqui descritos, apenas um dos pacientes apresentava quadro de imunossupressão, devido à ocorrência de diabetes mellitus, o qual apresentou quadro mais severo de lesões, chegando a apresentar febre, sendo internado para tratamento com anfotericina B.

Quatro dos casos de manifestação cutânea disseminada em humanos aqui descritos se deram em decorrência de múltiplas lesões provocadas por felinos. Ainda que um dos fatores predisponentes para ocorrência de esporotricose disseminada ou cutânea disseminada seja a ocorrência de um quadro de imunossupressão devido à alguma condição de base, nos casos descritos nesse estudo a grande maioria se apresentou em pacientes sem nenhuma condição preexistente, o que corrobora os estudos

de Rodrigues et al. (2013), Almeida-Paes et al. (2014) e Bonifaz e Tirado-Sánchez (2017), os quais afirmam que a ocorrência de formas atípicas da esporotricose têm se tornado mais frequentes em decorrência da transmissão zoonótica, uma vez que múltiplas lesões provocadas por esses animais podem transmitir uma maior carga fúngica para o hospedeiro.

Esses autores também afirmam que quadros de lesões atípicas podem se apresentar de forma mais recorrente no Brasil devido ao patógeno endêmico no país, presente na grande maioria dos casos descritos: *Sporothrix brasiliensis*, espécie considerada a mais patogênica do Complexo *Sporothrix schenckii* (Arrilaga-Moncrief et al., 2009; Borba-Santos et al., 2016b; Della-Terra et al., 2017; Ikeda et al., 2018; Rossato et al., 2018).

No presente trabalho, *S. brasiliensis* foi a espécie descrita dentre todos os isolados obtidos de lesões oriundas de manifestação cutânea disseminada identificados genotipicamente, corroborando Rodrigues et al. (2013), Almeida-Paes et al. (2014) e Bonifaz e Tirado-Sánchez (2017). Da mesma forma, em todos os casos em que ocorreu manifestação de hipersensibilidade (síndrome de Sweet e eritema nodoso) *S. brasiliensis* foi o patógeno isolado, corroborando Almeida-Paes et al. (2014) onde afirma haver relação entre esse tipo de reação e a ação dessa espécie, e a transmissão zoonótica.

Freitas et al. (2012) descreve como perfil prevalente para manifestação da síndrome de Sweet mulheres de meia idade, apresentando três casos de mulheres entre 47 e 78 anos de idade acometidas dessa manifestação. Aqui o padrão apresentado para essa síndrome se apresentou em uma paciente de 51 anos, no entanto, difere em relação à segunda paciente, a qual tinha 24 anos de idade. Esse dado indica que de fato a manifestação de reações de hipersensibilidade associadas à esporotricose têm relação com a forma de transmissão zoonótica, bem como ao patógeno associado, *S. brasiliensis*.

O perfil epidemiológico dos animais acometidos no presente estudo, com prevalência de gatos machos, lesões disseminadas e concentradas majoritariamente na cabeça e focinho, corrobora os estudos de Gremião et al. (2015), Silva et al. (2018) e Poester (2018b), demonstrando que a transmissão do patógeno entre essa população se dá em função do caráter territorialista desses animais, bem como relação ao comportamento reprodutivo dos mesmos, uma vez que o sítio dessa lesões indiquem luta entre esses animais. Na maioria dos casos os donos informaram que esses animais não tiveram contato com outros gatos, no entanto muitos desses animais apresentaram lesões disseminadas e concentradas na cabeça e focinho, o que indica que provavelmente o relato dos donos é impreciso, podendo estes animais terem tido contato com outros felinos doentes.

Os donos de alguns desses animais relataram que esses não tinham contato com outros felinos seja de qualquer gênero, e que eles tinham contato com terra de jardim. Poester et al. (2018c) realizou estudo de avaliação de solo em áreas de ocorrência de esporotricose no Rio Grande do Sul, no intuito de verificar a ocorrência de *S. brasiliensis* no solo desses locais, o que não foi detectado. No entanto, em Rodrigues et al. (2014a; 2016a) patógenos de *Sporothrix* sp. foram isolados do solo. Nesse

sentido, um estudo do solo dessas localidades onde ocorreram casos de esporotricose felina sem ter havido transmissão animal-animal se faz necessário, uma vez que em estudo realizado por Rodrigues et al. (2015b) foi-se verificado a ocorrência de *S. brasiliensis* em planta e uma possível transmissão do vegetal para animal no Rio Grande do Sul. No entanto, o trabalho não demonstra que houve transmissão via clássica, provavelmente se mantendo a forma de transmissão via zoonótica.

Apenas sete dos animais analisados nesse trabalho eram castrados, e desses apenas três tiveram algum tipo de contato com outros gatos, o que demonstra que o controle reprodutivo desses animais se apresenta como um grande aliado no controle dessa zoonose.

No estudo de Poester et al. (2018b) os autores descrevem que em 58% dos casos de esporotricose felina analisados na cidade de Rio Grande (RS), os animais eram castrados, e em Pelotas apenas 29% desses animais eram castrados, o que os autores relacionaram a questão socioeconômica, uma vez que o procedimento é caro, indicando que em Rio Grande os proprietários desses animais teriam melhor condição financeira. No estudo realizado por Silva et al. (2018) apenas um animal era castrado.

No presente trabalho, todos os animais castrados são originários da cidade de Olinda, em bairros compostos por majoritariamente por famílias de baixa renda. Como já citado, apenas sete casos ocorreram em animais castrados, e nos bairros em que eles residem outros casos também se apresentaram, porém os animais não apresentavam castração. Nos demais casos descritos em Olinda e nas outras cidades a grande maioria dos animais não apresentava castração.

Não foi possível verificar a evolução dos casos de felinos, uma vez que o trabalho aqui descrito se trata de um estudo retrospectivo de casos de esporotricose felina, baseado em fichas de atendimento com os dados de cada caso obtidos pelos centros de vigilância sanitária dos municípios e fornecidos ao LABEND/PE, que disponibilizou as fichas com os dados bem como os isolados para realização de análise genotípica.

A baixa sensibilidade na detecção de estruturas fúngicas a partir do exsudato corrobora a afirmação de Arenas et al. (2018), de que é difícil observar o parasito diretamente do material biológico de humanos, uma vez que a carga fúngica em indivíduos humanos é baixa se comparada à encontrada em felinos, onde o patógeno apresenta uma ação mais agressiva (Gremião et al., 2015). No entanto, é interessante notar que o método de clarificação por KOH 20% de fragmento de tecido lesionado, apresentou maior eficiência na detecção de células leveduriformes de *Sporothrix* sp.

O método de isolamento em meio de cultura ainda permanece como o mais confiável para um diagnóstico preciso da esporotricose, dentre os métodos de diagnóstico laboratorial desta micose, corroborando estudos prévios (Sidrim, 2004; Ramos-e-Silva, 2007; Mahajan, 2014; Arenas et al., 2018).

Apesar da confiabilidade apresentada no diagnóstico a partir do crescimento em cultura, algumas limitações como tempo (cinco a sete dias) e risco de contaminação são dificuldades enfrentadas na rotina laboratorial, o que impede a obtenção de um diagnóstico que apresente rapidez e acurácia. Nesse sentido, diversos testes rápidos a partir da amostra clínica obtida de lesão sugestiva de esporotricose, sorológicos ou a partir da derme do paciente se apresentam como soluções efetivas no sentido de se obter esse diagnóstico de forma rápida (Almeida-Paes et al., 2007; Rodrigues, de Hoog e Camargo 2015; Bonifaz et al., 2018; Zhang et al., 2019a; 2019b).

No trabalho aqui descrito, apesar das limitações descritas, o método de isolamento em cultura para observação de estrutura micromorfológicas, especialmente a partir de fragmento de tecido, apresentou considerável eficácia, uma vez que 110 casos de esporotricose (felina e animal) foram diagnosticados a partir dessa metodologia.

Alguns dos métodos de diagnóstico rápido da esporotricose disponíveis são baseados em técnicas de identificação genotípica, a partir de tipos especiais de PCR do DNA de *Sporothrix* sp. extraído de amostra clínica, que já identificam o patógeno em nível de espécie a partir do padrão de banda apresentado no gel de eletroforese tomando como referência marcadores específicos para cada espécie do complexo *Sporothrix schenckii* (Rodrigues, de Hoog e Camargo 2015; Zhang et al., 2019a; 2019b).

Os isolados identificados genotipicamente no presente estudo tiveram sequências de DNA obtidas a partir de PCR convencional do gene CAL, as quais foram submetidas ao método proposto por Marimon et al. (2007; 2008) para identificação de espécimes clínicos de *Sporothrix* sp., onde o sequenciamento parcial desse gene é realizado, e aqui as espécies identificadas foram *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, ratificando essa região gênica como altamente descritiva para espécies do Complexo *Sporothrix schenckii*.

A capacidade descritiva dessa região gênica é observada a partir dos filogramas apresentados nesse trabalho, onde observamos clara separação entre sequências de espécimes de espécies do complexo, as quais apresentaram alto suporte estatístico representada nos valores de *bootstrap* apresentado em cada nó do dendrograma construído através da análise de Máxima Verossimilhança.

Em Rangel-Gamboa et al. (2015) a análise de sequências CAL de *S. schenckii*, a qual foi realizada a partir da separação dessas em *clusters*, verificou grande diversidade dentre quatro dos cinco *clusters* presentes em diferentes regiões do mundo onde a espécie ocorre, sendo um dos cinco presente no Rio Grande do Sul, o qual apresentou baixa diversidade genética. No mesmo estudo foi verificada baixa diversidade das sequências CAL de *S. globosa*, de grande ocorrência na Ásia, e *S. brasiliensis*, endêmica do Brasil.

Na análise de reconstrução filogenética realizada no presente estudo, observa-se que tanto as sequências CAL de isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* obtidas de Pernambuco apresentaram

alinhamento altamente suportado com sequências dessa espécie obtidas de isolados de outros estados, confirmando a baixa diversidade dentre isolados dessas espécies no Brasil, demonstrada no estudo de Rangel-Gamboa et al. (2015).

Rodrigues et al. (2013) apontam que isolados de *S. brasiliensis* em áreas de ocorrência de surtos de esporotricose humana e animal têm apresentado o mesmo genótipo, confirmando assim a prevalência da espécie em casos de transmissão zoonótica, e em Rodrigues et al. (2015b) os autores afirmam que os genótipos presentes em surtos de esporotricose felina são prevalentemente clonais.

Considerando que ambos os estudos foram realizados com sequências de diferentes estados do Brasil, pode-se constatar que os resultados da análise do perfil genotípico de isolados de espécies de *S. brasiliensis* de Pernambuco aqui obtidos apresentam as características descritas nesse trabalho, onde isolados dessa espécie são clonais em relação a isolados dessa espécie de outros estados brasileiros, e confirmando a estreita ligação entre a ocorrência de perfis clonais de *S. brasiliensis* e o surto epizootico de esporotricose em Pernambuco, indicando um genótipo bem sucedido no estado como descrito em Rodrigues et al. (2015b).

Considerando ainda o estudo de Rodrigues et al. (2015b) em que sugere que *S. brasiliensis*, no Rio Grande do Sul, pode estar sendo transmitido para o animal através de vegetal, aqui nós descrevemos um caso de transmissão sapronótica por acidente com espinho de flor em que o agente isolado da lesão da paciente foi *S. brasiliensis*, o que, segundo o estudo de Rodrigues et al. (2015b) pode indicar que essa espécie pode estar desenvolvendo novas estratégias de transmissão também em Pernambuco, uma vez que esta não se trata de uma espécie ambiental.

O estudo de Silva et al. (2018) descreveu pela primeira vez um surto de esporotricose em Pernambuco, no entanto, o presente trabalho é o primeiro a descrever um estudo de epidemiologia molecular de esporotricose felina no estado, apontando *S. brasiliensis* como prevalente em casos de esporotricose felina, e confirmando estudos prévios que correlacionam essa espécie à ocorrência de transmissão zoonótica e consequente expansão geográfica da esporotricose no território brasileiro (Rodrigues et al., 2013; Chakrabarti et al., 2015; Carlos e Batista-Duarte, 2015; Gremião et al., 2017).

Kauffman et al. (2007) preconiza a administração de 200 mg/dia para casos de esporotricose cutânea, e o dobro da dose quando houver refratariedade ao tratamento, terapêutica adotada para o paciente que apresentou o quadro mais grave de esporotricose cutânea disseminada no presente trabalho. No entanto, para os demais, 100 mg diários de itraconazol apresentou-se como esquema terapêutico adequado para quadros cutâneos de menor de complexidade, como proposto por Orofino-Costa et al. (2017).

Também em um dos casos de esporotricose cutânea disseminada houve associação de termoterapia ao uso de itraconazol, esquema que apresentou sucesso terapêutico, e que apresentou

eficácia em casos de cromomicose (Bonifaz e Vásquez-González, 2011; Orofino-Costa et al., 2017). Segundo Mahajan (2014), a termoterapia potencializa a atividade dos neutrófilos, e a associação desta terapêutica com baixas doses de itraconazol pode ter permitido maior eficácia dessas células.

Os testes de sensibilidade aqui realizados demonstraram que terbinafina, cetoconazol, anfotericina B e itraconazol apresentaram melhor atividade *in vitro* frente a *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, enquanto fluconazol, voriconazol e iodeto de potássio não apresentaram, ou apresentaram baixa atividade frente a essas cepas. O documento M38-A2 (CLSI, 2008) preconiza que cepas de *Sporothrix* sp. que apresentam crescimento em concentrações de itraconazol maiores que 8 µg/ml indicam resistência a esse fármaco. No estudo de Espinel-Ingroff et al. (2017), que determina valores de *cutoff* epidemiológicos para espécies patogênicas de *Sporothrix* sp. frente a fármacos antifúngicos, o ECV estabelecido para itraconazol é de 2 µg/ml para *S. brasiliensis* e *S. schenckii*

Aqui, a média geométrica das CIMs obtidas foi de 1 µg/ml, o que indica sensibilidade ao itraconazol, segundo o documento M38-A2 (CLSI, 2008). Em relação a *S. schenckii*, as duas cepas testadas apresentaram CIM abaixo de 8 µg/ml (0,03 e 0,06 µg/ml). Considerando Espinel-Ingroff et al. (2017), observa-se que isolados de *S. brasiliensis*, originários de Pernambuco, apresentam sensibilidade ao fármaco, uma vez que o valor médio de CIMs obtidas frente a essas cepas apresentaram valor médio abaixo do ECV estabelecido. *S. schenckii* apresentou sensibilidade ao itraconazol, com valores de CIM inferiores ao estabelecido por Espinel-Ingroff et al. (2017) e pelo documento M38A-2 (CLSI, 2008).

O estudo de Waller et al. (2020) faz um apanhado geral das CIMs obtidas para diversos fármacos antifúngicos frente às espécies de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* apresentadas em diversos estudos, e aponta que, para terbinafina, itraconazol e voriconazol observou-se a ocorrência de diversos isolados não-selvagens de *S. brasiliensis*, ou seja, isolados que apresentam resistência devido a alguma mutação ou algum fator de resistência adquirido (Espinel-Ingroff et al., 2017). Para *S. schenckii*, ocorrem isolados não-selvagens para itraconazol e anfotericina B.

Esse padrão se observa em relação a 10 das cepas de *S. brasiliensis* testadas no presente trabalho, que apresentaram CIMs entre 8 e 16 µg/ml, sendo essas cepas obtidas de humanos. No entanto, é importante considerar que, mesmo com ocorrência de resistência de *S. brasiliensis* ao itraconazol *in vitro*, os pacientes tratados com essa droga apresentaram boa resposta clínica, em consonância com estudos prévios (Rodrigues et al., 2014b; Orofino-Costa et al., 2017).

Para *S. schenckii* não se observou o padrão apontado em Waller et al. (2020) em relação a itraconazol e anfotericina B, sendo esses isolados sensíveis a ambos os fármacos. Para Anfotericina B, o *guideline* sugere que CIMs acima de 4 µg/ml indicam resistência de *Sporothrix* sp. ao fármaco (CLSI, 2008), o que ocorreu em apenas quatro isolados de *S. brasiliensis* do presente estudo, sendo este fármaco efetivo frente a ambas as espécies analisadas.

Tratando-se de cepas de *S. schenckii* originárias de Pernambuco, os isolados dessa espécie aqui obtidos apresentaram resposta *in vitro* consoantes à apresentada por sete cepas dessa espécie, pertencentes à coleção de culturas Micoteca URM, originárias da mesma região, no estudo de Valeriano et al. (2020), onde todas foram sensíveis tanto à anfotericina B e itraconazol, quanto à terbinafina.

Apenas dois dos isolados de *S. brasiliensis* que apresentaram resistência *in vitro* frente a itraconazol estiveram relacionados a casos de esporotricose cutânea disseminada, forma mais complexa de manifestação cutânea associada à essa espécie e à transmissão zoonótica (Rodrigues et al., 2013), o que indica que apesar dessa associação dessa espécie a formas clínicas atípicas (Almeida-Paes et al., 2014; Bonifaz e Tirado-Sánchez, 2017) não necessariamente apresentam resistência antifúngica ao itraconazol.

Apesar da terbinafina ter apresentado CIM média de 0,3 µg/ml, acima do ECV estabelecido por Espinel-Ingroff et al. (2017) (0,12 µg/ml), e considerando o padrão estabelecido em Waller et al. (2020) para esse fármaco frente a cepas de *S. brasiliensis* em outros estudos, considera-se a atividade desse antifúngico nesse estudo como uma boa atividade, uma vez que a CIM modal, ou seja, que se apresenta com maior frequência (Espinel-Ingroff et al., 2017), foi a mesma do ECV estabelecido. Considera-se ainda que um menor número de cepas de *S. brasiliensis* apresentou resistência à terbinafina (oito), que ao itraconazol, com 10 ocorrências.

Almeida-Paes et al. (2016) realizaram estudo onde verificaram a produção de melanina na presença de diversos fármacos, e constataram que a melanina confere resistência a alguns isolados de *S. brasiliensis* e *S. schenckii* contra terbinafina. No presente trabalho essa característica não foi verificada em relação a essas cepas, o que sugere a realização de estudos posteriores em relação a isolados dessas espécies em Pernambuco que apresentem resistência a esse fármaco.

O estudo de Espinel-Ingroff et al. (2017) não conseguiu obter valores de ECV para cetoconazol, bem como o documento M38-A2 (CLSI, 2008) não estabelece nenhum valor de referência para esse fármaco frente a espécies de *Sporothrix* sp. No presente estudo, cetoconazol foi o fármaco com melhor atividade dentre todos, com a maior CIM apresentada sendo de apenas 4 µg/ml, sendo esta apenas uma ocorrência. Kauffman et al. (2000) não recomenda o uso de cetoconazol para o tratamento de nenhuma manifestação clínica de esporotricose. No entanto, Pereira et al. (2010) avaliou a eficácia desse antifúngico no tratamento de esporotricose felina, a qual promoveu cura clínica em 171 animais avaliados, porém com apresentação de alguns efeitos adversos.

Apesar de não apresentar atividade *in vitro*, o iodeto de potássio ainda é uma boa opção no tratamento da esporotricose cutânea, especialmente quando associado a outro antifúngico em casos refratários, como aqui apresentado em um dos casos de esporotricose cutânea disseminada. Iodeto de

potássio tem um mecanismo imunomodulador em neutrófilos e fagócitos (Orofino-Costa et al., 2013) e em associação com o itraconazol pode apresentar bons resultados clínicos.

Kauffman et al. (2000) recomenda que o fluconazol só seja indicado em casos em que o paciente apresente intolerância ao itraconazol, numa dosagem de 400 mg/dia, por apresentar menor efetividade. Aqui, o fluconazol apresentou CIMs elevadas tanto para *S. brasiliensis* quanto para *S. schenckii*, condizente com o visto em Espinel-Ingroff et al. (2017), bem como o voriconazol, que em estudo *in vivo* realizado por Fernández-Silva et al. (2013) não apresentou atividade contra *S. brasiliensis* e atividade moderada contra *S. schenckii*. No entanto, no presente estudo, demonstrou melhor atividade *in vitro* em relação ao fluconazol e ao iodeto de potássio.

Uma cepa apresentou CIMs elevadas para três dos fármacos com melhor atividade apresentada nesse estudo: anfotericina B, itraconazol e terbinafina, indicando assim se tratar de um isolado multirresistente de *S. brasiliensis*.

O resultado apresentado pelos extratos aqui testados, *Schinus terebinthifolius*, *Anadenanthera colubrina* e *Libidibia ferrea* indicam potencial desses em relação ao tratamento da esporotricose, tanto para felinos quanto para humanos, uma vez que todos apresentaram atividade em baixas concentrações, especialmente o extrato de *Schinus terebinthifolius*, que apresentou atividade em concentrações mais baixas que os demais extratos naturais testados.

Waller et al. (2016c) fizeram um levantamento de estudos que descrevem a atividade antifúngica frente *Sporothrix* sp. de diversos extratos naturais de plantas de 39 famílias, apresentando 100 espécies que apresentaram potencial anti-*Sporothrix*. Dentre elas está *Schinus terebinthifolius* (aroeira), espécie originária do Brasil pertencente à família Anacardiaceae, e que apresenta valor acessível a pessoas de baixa renda, estando disponível em feiras populares e comumente é utilizada no tratamento de algumas enfermidades.

Em um dos casos de esporotricose felina do presente estudo, um dos proprietários tratava as feridas do animal com sabonete de aroeira. No entanto, não houve resposta positiva das lesões, uma vez que esse indivíduo levou seu animal a uma clínica veterinária.

Terapias convencionais, apesar de eficazes, têm sido associadas a diversos efeitos adversos para o paciente, seja ele humano ou animal, além de serem tratamentos caros (Barros et al., 2011; Gremião et al., 2015). Considerando a problemática da esporotricose felina e do animal como vetor principal da doença no Brasil, estando relacionado à grande epidemia de esporotricose no Brasil, a disponibilização de um tratamento de fácil acesso e com menos efeitos adversos pode ser fator atenuante na questão do abandono do animal doente, uma vez que o custo dos cuidados despendidos ao animal acometido são altos, e sendo a esporotricose uma doença que atinge massivamente populações menos favorecidas, muitas pessoas podem abandonar esses animais por não terem condições de manter o tratamento.

Nesse sentido, o resultado apresentado pelos extratos de plantas típicas do nordeste brasileiro abre uma excelente perspectiva no que diz respeito à contenção da expansão da esporotricose no estado de Pernambuco e no Brasil, uma vez que oferece uma opção de tratamento financeiramente acessível. No entanto, estudos futuros no sentido de se detectar os componentes desses extratos, bem como a citotoxicidade e estudos em modelo murino para verificar a atividade *in vivo* devem ser realizados para que essas venham a ser opções viáveis no tratamento da esporotricose.

7. CONCLUSÕES

A esporotricose em Pernambuco apresenta as mesmas características descritas nos surtos dos estados de Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo, tanto no que diz respeito ao perfil clínico quanto sociodemográfico (regiões carentes) e socioeconômico (pessoas de baixa renda, especialmente mulheres trabalhadoras do lar) dos pacientes acometidos, sendo essa também uma doença negligenciada, indicando potencial epidêmico no estado nordestino, com massiva ocorrência na RMR, especialmente nas cidades de Recife e Olinda. No entanto, como aqui demonstrado, cidades do interior do estado também têm apresentado ocorrência de casos, indicando alta dispersão.

Assim como em outros surtos descritos no Brasil, a transmissão zoonótica é o principal fator de propagação da doença no estado Pernambuco, sendo o gato o principal vetor do patógeno prevalente nos casos de esporotricose, estando ligada ao cuidado dispendido a animais doentes.

O padrão ouro no diagnóstico da esporotricose ainda se apresenta como ferramenta confiável, sendo o fragmento de tecido de lesão sugestiva o material clínico com melhor possibilidade de isolamento de espécies patogênicas de *Sporothrix* sp.

A dosagem de 100 mg/dia de itraconazol oral apresenta-se de forma eficiente no tratamento da esporotricose humana, podendo ser dobrada a dose em casos de refratariedade ou adotada associação de termoterapia.

S. brasiliensis é a espécie prevalente nos casos de esporotricose felina e humana no estado de Pernambuco, confirmando estudos anteriores que apontam alta prevalência dessa espécie em surtos de esporotricose devido à transmissão zoonótica, fatores que estão vinculados a manifestações atípicas da micose como a forma cutânea disseminada da doença. Isolados de *S. brasiliensis* originários de Pernambuco apresentam genótipo clonal em relação a isolados dessa espécie originários de outros estados brasileiros.

A alta ocorrência de manifestação cutânea fixa da esporotricose em humanos pode indicar alta exposição de indivíduos residentes na RMR à esporotriquina, toxina produzida por espécies patogênicas de *Sporothrix* sp., sugerindo a realização de estudos posteriores nesse sentido. A ocorrência de transmissão de *S. brasiliensis* por via sapronótica em quatro casos de esporotricose

felina e um caso em humano, sugere mudanças na estratégia de infecção dessa espécie em Pernambuco. No entanto, estudos posteriores se fazem necessário no sentido de se confirmar essa possibilidade.

Cetoconazol, anfotericina B, itraconazol e terbinafina apresentaram melhor atividade antifúngica *in vitro* frente às cepas de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, no entanto, a ocorrência de cepas resistentes de *S. brasiliensis* ao itraconazol vem se apresentando frequentemente comum, o que sugere a realização de estudos posteriores no sentido de propor novas alternativas terapêuticas.

Verificou-se nesse sentido que, extratos hidroalcoólicos de *Anadenanthera columbrina*, *Libidibia ferrea* e *Schinus terebinthifolius* apresentam bom potencial anti-*Sporothrix*, podendo no futuro, após estudos de citotoxicidade e em modelos murinos, se apresentarem como opção viável no tratamento de esporotricose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Embrapa de Informação Tecnológica (AGITEC) (2011). Clima. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/territorio_mata_sul_pernambucan/a/arvore/CONT000fbz2ztdp02wx5eo0sawqe3h6815n4.html>. Acesso em 20 de novembro de 2020.
- Alberici, F., Paties C.T., Lombardi, G., Ajello, L. Kauffman, L, Chandler, F. 1989. *Sporothrix schenckii* var *lurei* as the cause of sporotrichosis in Italy. *European Journal of Epidemiology* 5: 173–177.
- Alegría, C., Ángela, L. 2013. Esporotricosis cutánea: experiencia de un hospital de tercer nivel en Cali, Colombia. *Iatreia*. 26: 153-159.
- Almeida-Paes, R., de Oliveira, M.M.E., Freitas, D.F.S., do Valle, A.C.F., Zancopé-Oliveira, R.M., Gutierrez-Galhardo, M.C., 2014. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8:1-8.
- Almeida-Paes, R., Figueiredo-Carvalho, M. H. G., Brito-Santos, F., Almeida-Silva, F., Oliveira, M. M. E., Zancopé-Oliveira, R. M. 2016. Melanins protect *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* from the antifungal effects of terbinafine. *PLoS One*, 11(3), e0152796.
- Almeida-Paes, R., Pimenta, M.A., Pizzini, C.V., Monteiro, P.C.F., Peralta, J.M., Nosanchuk, J.D., Zancopé-Oliveira, R.M. 2007. Use of Mycelial-Phase *Sporothrix schenckii* Exoantigens in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Sporotrichosis by Antibody Detection. *American Society for Microbiology*. 14: 244-249.
- Araujo, A. K. L., & de Santana Leal, C. A. 2016. Esporotricose felina no município de Bezerros, Agreste Pernambucano: Relato de caso. *Pubvet*. 10: 795-872.
- Arenas, R. Sánchez-Cardenas, C.D., Ramirez-Hobak, L., Arriaga, L.F.R., Memije, M.E.V. 2018. Sporotrichosis: From KOH to molecular biology. *Journal of Fungi*. 4: 1-10.
- Arrillaga-Moncrief, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Marinè, M., Gené, J. Cano, J., Guarro, J. 2009. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*. 15: 651-655.
- Barros, M.B.L., Paes, R.A., Schubach, A.O. 2011. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 24: 633-654.
- Barros, M.B.L., Schubach, A.O., Gutierrez-Galhardo, M.C., Schubach, T.M.P., Reis, R.S., Conceição, M.J., Valle, A.C.F. 2003. Sporotrichosis with widespread cutaneous lesions: report of 24 cases related to transmission by domestic cats in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Dermatology*. 42: 677-681.
- Barros, M. B. L., Schubach, A. O., Oliveira, R.V.C., Martins, E. B., Teixeira, J. L., Wanke, B. 2011. Treatment of Cutaneous Sporotrichosis With Itraconazole—Study of 645 Patients, *Clinical Infectious Diseases*. 52:e200–e206.
- Barros, M.B.L., Schubach, A.O., Valle, A.C.F., Gutierrez-Galhardo, M.C., Conceição-Silva, F., Schubach, T.M.P., Reis, R.S., Wanke, B., Marzochi, K.B.F., Conceição, M.J. 2004. Cat-Transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases*. 38: 529-535.
- Bonifaz, A., Toriello, C., Araiza, J., Ramírez-Soto, M.C. 2018. Sporotrichin skin test for the diagnosis of sporotrichosis. *Journal of Fungi*. 4: 2-7.
- Bonifaz, A., Tirado-Sánchez, A. 2017. Cutaneous disseminated and extracutaneous sporotrichosis: current status of a complex disease. *Journal of Fungi*. 3: 1-13.
- Bonifaz, A., Vázquez-González, D. 2013. Diagnosis and treatment of lymphocutaneous sporotrichosis: what are the options? *Current Fungal Infections Report*. 07: 252-259.
- Borba-Santos, L. P., Ishida, K., Calogeropoulou, T., Souza, W. D., Rozental, S. 2016a. Adamantylidene-substituted alkylphosphocholine TCAN26 is more active against *Sporothrix schenckii* than miltefosine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 111: 523-527.
- Borba-Santos, L. P., Visbal, G., Gagini, T., Rodrigues, A. M., de Camargo, Z. P., Lopes-Bezerra, L. M., Ishida, K., Souza, W., Rozental, S. 2016b. $\Delta 24$ -Sterol Methyltransferase plays an important

- role in the growth and development of *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Frontiers in microbiology*. 7: 311.
- Borba-Santos L.P., Reis e Sá L.F., Ramos Juliene A., Rodrigues A.M., de Camargo Z.P., Rozental S., Ferreira-Pereira A. 2017. Tacrolimus Increases the Effectiveness of Itraconazole and Fluconazole against *Sporothrix* spp. *Frontiers in microbiology*. 8.
- Brandolt, T. M., Madrid, I. M., Poester, V.R., Sanchotene, K.O., Basso, R.P., Klafke G.B., Rodrigues, M. L., Xavier, M. O. Human sporotrichosis: A zoonotic outbreak in southern Brazil, 2012–2017. 2019. *Medical Mycology*. 57: 527–533.
- BRASIL. Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco. Acrescenta doenças, agravos e eventos estaduais à Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e dá outras providências. Portaria n. 279, de 23 de julho de 2015.
- Brilhante, R. S. N., Malaquias, Â. D. M., Caetano, É. P., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., Lima, R. A. C. D., Marques, F. J. D. F., Silva, N.F., Alencar, L.P., Monteiro, A.J., Camargo, Z. P., Bandeira, T. D. J. P. G., Rodrigues, A.M., Cordeiro, R.A., Moreira, J.L.B., Sidrim, J.J.C., Rocha, M.F.G. 2014a. *In vitro* inhibitory effect of miltefosine against strains of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* and *Sporothrix* spp. *Medical mycology*. 52: 320-325.
- Brilhante, R. S. N., Silva, N. F., Marques, F. J. D. F., Castelo-Branco, D. D. S. C. M., Lima, R. A. C. D., Malaquias, A. D. M., Caetano, É. P., Barbosa, G.R., Camargo, Z. P., Rodrigues, A.M., Monteiro, A. J., Bandeira, T. D. J. P. G., Cordeiro, R.A., Sidrim, J.J.C., Moreira, J.L.B., Rocha, M.F.G. 2014. *In vitro* inhibitory activity of terpenic derivatives against clinical and environmental strains of the *Sporothrix schenckii* complex. *Sabouraudia*. 53: 93-98.
- Brilhante, R. S. N., Silva, M. L. Q. D., Pereira, V. S., de Oliveira, J. S., Maciel, J. M., Silva, I. N. G. D., Garcia, L.G.S., Guedes, G.M.M. Cordeiro, R.A., Pereira-Neto, W.A., de Camargo, Z. P., Rodrigues, A.M., Sidrim, J.J.C. 2018. Potassium iodide and miltefosine inhibit biofilms of *Sporothrix schenckii* species complex in yeast and filamentous forms. *Medical mycology*.
- Brizeno, M.C, Silva, E.C., Bassoli A.C.D.G. 2020. O problema de saúde pública da esporotricose felina no estado de Pernambuco, Brasil: uma revisão narrativa. *Brazilian Journal of Development*. 6:93845-93855.
- Bustamante, B., Campos, P. 2001. Sporotrichosis treatment: overview and update. *Current Infection Reports*. 05: 42-48.
- Cafarchia, C., Sasanelli, M., Lia, R., Caprariis, D., Guillot, J., Otranto, D. 2007. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: case report. *Mycopathologia*. 163: 75-79.
- Camacho, E., León- Navarro, I. Rodríguez-Brito, S., Mendoza, M., Niño- Vega, Gustavo A. 2015. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC Infectious Diseases*. 15: 01-10.
- Carrada-Bravo, T., Olvera- Macías, M.I. 2013. New observations on the ecology and epidemiology of *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. 1: 5-24.
- Carvalho, J., Caldwell, J.B., Radford, B.L., Feldman, A.R. 1991. Feline-transmitted sporotrichosis in the southwestern United States. *Western Journal of Medicine*. 154: 462-465.
- Carlos, I.Z., Batista-Duarte, A. 2015. Sporotrichosis: An Emergent Disease. In: Carlos, I.Z. (1° ed) *Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects*. São Paulo: Springer International Publishing, pp. 133-145.
- Carlos, I.Z., Sgarbi, D.B.G., Santos, G.C., Placeres, M.C.P. 2002. *Sporothrix schenckii* lipid inhibits macrophages phagocytosis: involvement of nitric oxide and tumor necrosis factor- α . *Scandinavian Journal of immunology*. 57: 214-220.
- Castro, R.A., Kubitschek-Barreira, P.H., Teixeira, P.A.C., Sanches, G.F., Teixeira, M.M., Quintella, L.P., Almeida, S. R., Orofino-Costa, R., Camargo, Z.P., Felipe, M.S.S., Souza, W., Lopes-Bezerra, L.M. 2013. Differences in Cell Morphometry, Cell Wall Topography and Gp70 Expression Correlate with the Virulence of *Sporothrix brasiliensis* Clinical Isolates. *PLoS ONE*. 8: 1-15.
- Caus, A.L.O. Zanotti, R.L., Faccini-Martínez, A.A., Paterlini, G.V., Falqueto, A. 2018. Epidemiological and Clinical Aspects of Sporotrichosis in Espírito Santo State, Southeast

- Brazil: A Study of Three Decades (1982–2012). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 0: 1-18.
- Centro Estadual de Estatísticas, Pesquisas e Formação de Servidores Públicos do Rio de Janeiro (CEPERJ). O Estado do Rio de Janeiro e seu Ambiente. Disponível em: <<http://www.ceperj.rj.gov.br/Conteudo.asp?ident=85>>. Acesso em 28 de dezembro de 2020
- Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C.; Mochizuki, T.; Li, S. 2015. Global epidemiology of sporotrichosis. *Medical Mycology*. 53: 3-14.
- Chakrabarti, A, Slavin M.A. 2011. Endemic fungal infections in the Asia-Pacific region. *Medical Mycology*. 49: 337-344.
- Chang, P., Acajabón, M.V.V., Logemann, H., Pacheco, G. C. 2019. Fixed cutaneous sporotrichosis. *Our Dermatology Online*. 10: 44-47.
- Cleary, J. D., Taylor, J. W., Chapman, S. W. 1992. Itraconazole in antifungal therapy. *Annals of Pharmacotherapy*. 26: 502–509.
- Coelho, L.M.L., Grisolia, J.C., Lúcia, M., Boczar, M., Ferreira, E.B., Nogueira, D.A., Chavasco, J.K., Camargo, Z.P., Lopes-Bezerra, L.M., Coelho, L.F.L., Malaquias, L.C.C. 2018. Effects of metaperiodate and urea solutions on the serological diagnosis of human sporotrichosis using an indirect ELISA test. *Brazilian Journal of Microbiology*. 50: 139-145.
- Coles, F.B., Schuchat, A., Hibbs, J.R., Kondracki, S.F., Salkin, I.F., Dixon, D.M., Chang, H.G., Duncan, R.A., Hurd, N.J., Morse, D.L. Morse. A multistate outbreak of sporotrichosis associated with sphagnum moss. 1992. *American Journal of Epidemiology*. 136: 475–487,
- Conti-Diaz, I.A. 1980. Sporotrichosis in Uruguay: epidemiologic and clinical aspects. *Proceedings of the fifth International Conference on the Mycoses. Superficial, cutaneous and subcutaneous infections*, 27-30. Caracas.
- Conti-Diaz, I.A. 1989. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. *Mycopathologia*: 108: 113-116.
- Conti-Diaz, I.A., Civila, E., Gezuele, E., Lowinger, M., Calegari, L., Sanabria, D., Fuentes, L., da Rosa, D., Alzueta, G. 1992. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole: Itraconazol-Behandlung der Haut-Sporotrichose beim Menschen. *Mycoses*. 35: 153-156.
- Córdoba, S. Isla, G., Szusz, W., Vivot, W., Hevia, A., Davel, G., Canteros, C.E. 2018. Molecular identification and susceptibility profile of *Sporothrix schenckii* sensu lato isolated in Argentina. *Mycoses*. 61: 441-448.
- Corzo-Léon, D.E., Armstrong-James, D., Denning, D.W. 2015. Burden of serious fungal infections in Mexico. *Mycoses*. 58: 34-44.
- Coskun, B., Saral, Y., Akpolat, N., Ataseven, A., Cicek, D. 2004. Sporotrichosis successfully treated with terbinafine and potassium iodide: case report and review of the literature. *Mycopathologia*. 158: 53-56.
- Couto, C. S., Raposo, N. R., Rozental, S., Borba-Santos, L. P., Bezerra, L. M., de Almeida, P. A., Brandão, M. A. 2015. Chemical composition and antifungal properties of essential oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) against *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 14: 1207-1212.
- Criseo, G., Romeo, O. 2010. Ribosomal DNA sequencing and phylogenetic analysis of environmental *Sporothrix schenckii* strains: comparison with clinical isolates. *Mycopathologia*, 169: 351-158.
- Criseo, G., Zungri, D., Romeo, O. 2008. Stable yeast-like form of *Sporothrix schenckii*: lack of dimorphic stage. *Journal of Clinical Microbiology*. 48: 3870-3871.
- Crothers, S.L., White, S.D., Ihrke, P.J., Affolter, V.K. 2009. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987–2007). *Veterinary Dermatology*. 20: 249-259.
- Cruz, L.C.H. 2013. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. *Veterinária e Zootecnia*. 20: 08-28.
- de Almeida, J. R. F., Kaihama, G. H., Jannuzzi, G. P., de Almeida, S. R. 2015. Therapeutic vaccine using a monoclonal antibody against a 70-kDa glycoprotein in mice infected with highly virulent *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. *Medical mycology*. 53: 42-50.

- de Araujo, M. L., Rodrigues, A. M., Fernandes, G. F., de Camargo, Z. P., de Hoog, G. S. 2015. Human sporotrichosis beyond the epidemic front reveals classical transmission types in Espírito Santo, Brazil. *Mycoses*. 58: 485-490.
- de Beer, W., Duong, T., Wingfield, M. 2016. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Studies in Mycology*. 83: 165-191.
- de Beer, W., Harrington, T., Vismer, H., Wingfield, B., Wingfield, M. 2002. Phylogeny of *Ophiostoma stenoceras-Sporothrix schenckii* complex. *Mycologia*. 95: 434-441.
- dos Santos Silva, F., dos Santos Cunha, S. C., de Souza Baptista, A. R., dos Santos Baptista, V., da Silva, K. V. G. C., Coêlho, T. F. Q., Ferreira, A. M. R. 2018. Miltefosine administration in cats with refractory sporotrichosis. *Acta Scientiae Veterinariae*. 46: 7.
- Devi, K.R., Devi, M.U., Singh, T.N., Devi, K.S., Sharma, S.S., Singh, L.R., Singh, H.L., Singh, N.B. 2006. Emergence of sporotrichosis in Manipur. *Indian Journal of Medical Microbiology* 24, 216-219. Disponível em: <<http://www.ijmm.org/article.asp?issn=0255-0857;year=2006;volume=24;issue=3;page=216;epage=219;aulast=devi>> Acesso em: 17/05/2019.
- Della-Terra, P.P., Rodrigues, A.M., Fernandes, G.F., Nishikaku, A.S., Burger, E., de Camargo, Z.P. 2017. Exploring virulence and immunogenicity in the emerging pathogen *Sporothrix brasiliensis*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 11: 1-23.
- Dias, N.M., Oliveira, M.M.E., Portela, M.A., Santos, C., Zancope-Oliveira, R.M.; Lima, N. 2011. Sporotrichosis caused by *Sporothrix mexicana*. *Emerging Infectious Diseases*. 17: 1975-1976.
- Dixon, D.M., Salkin, I.F., Duncan, R.A., Hurd, N.J., Haines, J.H., Kemna, M.E., Coles, B.F. 1991. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 29: 1106-1113.
- Drogari-Apiranthitou, M., Xirotagaros, G., Tsamakias, C., Theotokoglou, S., Tofas, P., Rigopoulos, D., Petrikkos, G. 2014. Lymphocutaneous sporotrichosis: First proven case in Greece and review of the literature. *Acta Microbiologica Hellenica*. 59: 63-70.
- Espinel-Ingroff, A., Abreu, D. P. B., Almeida-Paes, R., Brilhante, R. S. N., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Guarro, J., Hagen, S. Córdoba, G. M. Gonzalez, N. P. Govender, J. Guarro, E. M. Johnson, S. E. Kidd, S. A. Pereira, A. M. Rodrigues, S. Rozental, M. W. Szeszs, R. Ballesté Alaniz, A. Bonifaz, L. X. Bonfietti, L. P. Borba-Santos, J. Capilla, A. L. Colombo, M. Dolande, M. G. Isla, M. S. C. Melhem, A. C. Mesa-Arango, M. M. E. Oliveira, M. M. Panizo, Z. Pires de Camargo, R. M. Zancope-Oliveira, J. F. Meis, J. Turnidge. 2017. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61: 1-8.
- Estrada-Castañón, R., Chávez-López, G., Estrada-Chávez, G., Bonifaz, A. 2018. Report of 73 cases of cutaneous sporotrichosis in Mexico. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 93: 907-909.
- Falcão, E.M.M., Filho, J.B.L., Valle, A.C.F., Bastos, F.I., Gutierrez-Galhardo, M.C., Freitas, D.F.S. 2019b. Hospitalizações e óbitos relacionados à esporotricose no Brasil (1992-2015). *Caderno de Saúde Pública*. 35: 1-7.
- Falcão, E.M.M., Pires, M.C.S., Andrade, H.B., Gonçalves, M.C.L., Almeida-Paes, R., Valle, A.C.F., Bastos, F.I., Gutierrez-Galhardo, M.C., Freitas, D.F.S. 2019a. Zoonotic sporotrichosis with greater severity in Rio de Janeiro, Brazil: 118 hospitalizations and 11 deaths in the last 2 decades in a reference institution. *Medical Mycology*. 0:1-3.
- Fernandes, G.F., Santos, P.O., Rodrigues, A.M., Sasaki, A.A., Burguer, E., Camargo, Z.P. 2013. Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*. 4: 241-249.
- Fernández-Silva, F., Capilla, J., Mayayo, E., Guarro, J. 2012. Efficacy of posaconazole in murine experimental sporotrichosis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 56: 2273-2277.

- Fernández-Silva, F., Capilla, J., Mayayo, E. and Guarro, J. 2014. Modest efficacy of voriconazole against murine infections by *Sporothrix schenckii* and lack of efficacy against *Sporothrix brasiliensis*. *Mycoses*. 57: 121-124.
- Figueiredo, C.C., Deccache, P., Lopes-Bezerra, L.M., Morandi, V. 2007. TGF- β 1 induces transendothelial migration of the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii* by a paracelular route involving extracellular matrix proteins. *Microbiology*. 153: 2910- 2921.
- Figueiredo, C.C., Lima, O.C., Carvalho, L., Lopes-Bezerra, L.M., Morandi, V. 2004. The *in vitro* interaction of *Sporothrix schenckii* with human endothelial cells is modulated by cytokines and involves endothelial surface molecules. *Microbial pathogenesis*. 36: 177-188.
- Filgueira, K. D. 2009. Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró-RN. *Ciência Animal Brasileira*. 10: 673-677.
- Fleury, R.N., Tabora, P.R., Gupta, A.K., Fujita, M.S., Rosa, P.S., Weckwerth, A.C., Negrão, M.S., Bastazini, I. 2001. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo, Brazil. *International Journal of Dermatology*. 40: 318-322.
- Francesconi, G., Valle, A. C., Passos, S., Reis, R., & Galhardo, M. C. (2009). Terbinafine (250 mg/day): an effective and safe treatment of cutaneous sporotrichosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 23: 1273-1276.
- Freitas, D.F.S., Lima, I.A.R., Curi, C.L., Jordão, L., Zancopé-Oliveira, R.M., Valle, A.C.F., Gutierrez-Galhardo, M.C., Curi, A.L.L. 2013. Acute dacryocystitis: another clinical manifestation of sporotrichosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 109: 01-03.
- Freitas, D.F.S., Santos, S.S., Almeida-Paes, R., Oliveira, M.M.E., Valle, A.C.F., Gutierrez-Galhardo, M.C. et al. 2015. Increase in virulence of *Sporothrix brasiliensis* over five years in a patient with chronic disseminated sporotrichosis. *Virulence*. 6: 112-120.
- Freitas, D.F.S., Valle, A.C.F., Silva, M.B.T., Campos, D.P., Lyra, M.R., Souza, R.V., Veloso, V.G., Zancopé-Oliveira, R.M., Bastos, F.I., Gutierrez-Galhardo, M.C. 2014. Sporotrichosis: An emergent neglected opportunistic infection HIV-infected patients in Rio de Janeiro, Brazil. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 8: 1-8.
- Fórum Nacional de Entidades Metropolitanas (FNEM) (2018). Região Metropolitana do Recife. Disponível em <<http://fnembrasil.org/regiao-metropolitana-de-recife-pe/>>. Acesso em 15 de dezembro de 2020.
- Fukushiro, R. 1984. Epidemiology and Ecology of Sporotrichosis in Japan. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*. 257: 228-233.
- Gewehr, P., Jung, B., Aquino, V., Manfro, R., Spuldaro, F., Rosa, R., Goldani, L. 2013. Sporotrichosis in renal transplant patients. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 24: 47-49.
- Ghosh, A., Chakrabarti, A., Sharma, V.K., Singh, K., Singh, A. 1999. Sporotrichosis in Himachal Pradesh (North India). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 93: 41-45.
- Goa, K., Barradell, L. Fluconazole: An Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Use in Major Superficial and Systemic Mycoses in Immunocompromised Patients. 1995. *Drugs*. 50: 658-690.
- Govender, N.P., Maphanga, T.G., Zulu, T.G., Patel, J., Walaza, S., Jacobs, C., Ebonwu, J.I., Ntuli, S., Naicker, S.D., Thomas, J. 2015. An Outbreak of Lymphocutaneous Sporotrichosis among Mine-Workers in South Africa. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 9: 1-15.
- Grant, S. M., Clissold, S. P. 1989. Itraconazole. *Drugs*. 37: 310-344.
- Gremião, I.D.F., Menezes, R.C., Schubach, T.M.P., Figueiredo, A.B.F.; Cavalcanti, M.C.H.; Pereira, S.A. 2015. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Medical Mycolgy*. 53: 15-21.
- Gremião, I.D.F., Miranda, L.H.M., Reis, E.G., Rodrigues, A.M., Pereira, S.A. 2017. Zoonotic Epidemic of Sporotrichosis: Cat to Human Transmission. *PLoS Pathogens*. 13: 1-7.

- Gutierrez-Galhardo, M.C., Freitas, D.F.S., do Valle, A.C.F. Clinical Forms of Human Sporotrichosis and Host Immunocompetence. In: Carlos, I.Z. (1° ed) *Sporotrichosis: New Developments and Future Prospects*. São Paulo: Springer International Publishing, pp. 73-82.
- Gutierrez-Galhardo, M.C., Freitas, D.F.S., Valle, A.C.F., Almeida-Paes, R., Oliveira, M.M.E., Zancopé-Oliveira, R.M. 2015. Epidemiological aspects of sporotrichosis epidemic in Brazil. *Current Fungal Infections Reports*. 9: 238-245.
- Gutierrez-Galhardo, M.C., Valle, A.C.F., Fraga, B.L.B., Schubach, A.O., Hoagland, B.R.S., Monteiro, P.C.F., Barros, M.B.L. 2008. Disseminated sporotrichosis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Mycoses*. 53: 78-80.
- Hajjeh, R., McDonnell, S., Reef, S., Licitira, C., Hankins, M., Toth, B., Padhye, A., Kaufman, L., Pasarell, L., Cooper, C., Hutwagner, L., Hopkins, R., McNeil, M. 1997. Outbreak of sporotrichosis among tree nursery workers. *The Journal of Infectious Diseases*. 176: 499-504.
- Hay, R.J., Morris-Jones, R. 2008. Outbreaks of sporotrichosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 21: 119-121.
- Hektoen, L., Perkins, C. F. 1900. Refractory subcutaneous abscesses caused by *Sporothrix schenckii*. A new pathogenic fungus. *The Journal of Experimental Medicine*. 05: 77-91.
- Hiruma, M., Kawada, A., Noguchi, H., Ishibashi, A., Diaz, A.C. 1992. Hyperthermic treatment of sporotrichosis: Experimental use of infrared and far infrared rays. *Mycoses*. 35: 293-299.
- Hu, S., Chung, W.H., Hung, S.I., Ho, H.C., Wang, Z.W., Chen, C.H., Lu, C. Kuo, T.T., Hong, H.S. 2003. Detection of *Sporothrix schenckii* in clinical samples by a nested PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1414-1418.
- Hull, P. R., Vismar, H. P. 1992. Treatment of cutaneous sporotrichosis with terbinafine. *Journal of dermatological treatment*. 3: 35-38.
- Ikeda, M.A.K., de Almeida, J.R.F, Jannuzzi, G.P., Cronemberger-Andrade, A., Torrecilhas, A.C.T, Moretti, N.S., da Cunha, J.P.C., de Almeida, S.R., Ferreira, K.S. 2018. Extracellular vesicles from *Sporothrix brasiliensis* are an important virulence factor that induce an increase in fungal burden in experimental sporotrichosis. *Frontiers in Microbiology*. 9: 2286.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2017). Censo demográfico 2010. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pe/panorama>>. Acesso em 20 de novembro de 2020.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. *Pesquisa Nacional em Saúde*.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2019. *Pesquisa Nacional em Saúde*.
- Itoh, M., Okamoto, S., Kariya, H. 1986. Survey of 200 Cases of Sporotrichosis. *Dermatologica*. 172: 209-213.
- Kano, R., Okubo, M., Siew, H.H, Kamata, H., Hasegawa, A. 2015. Molecular typing of *Sporothrix schenckii* isolates from cats in Malaysia. *Mycoses*. 58: 220-224.
- Kauffman C. 2015. Sporotrichosis. In: Hospenthal D., Rinaldi M. (eds) *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections. Infectious Disease*. Michigan: Springer International Publishing, pp. 237-244.
- Kauffman, C., Bustamante, B., Chapman, S., Pappas, P. 2007. Practice guidelines for the management of patients with sporotrichosis: 2007 upgrade by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Disease*. 450: 1255-1265.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimation evolutionary rate of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 16: 111-120.
- Kovarik, C.L., Neyra, E., Bustamante, B. 2007. Evaluation of cats as the source of endemic sporotrichosis in Peru. *Medical Mycology*. 46: 53-56.
- Kusuhara, M., Hachisuka, H., Sasai, Y. 1988. Statistical survey of 150 cases with sporotrichosis. *Mycopathologia*. 102: 129-133.
- Kwangsukstith, C., Vanittanakom, N., Khanjanasthiti, P., Uthammachai C. 1990. Cutaneous sporotrichosis in Thailand: first reported case. *Mycoses*. 33: 513- 518.
- Lima, O.C., Figueiredo, C.C., Morandi, V., Lopes-Bezerra, L.M. 1999. Adhesion of the human pathogen *Sporothrix schenckii* to several extracellular matrix proteins. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 32: 651-657.
- Lavalle, P., Suchil, P., De Ovando, F., Reynoso, S. 1987. Itraconazole for deep mycoses: preliminary experience in Mexico. *Reviews of infectious diseases*. 9: 64-70.

- Lederer, H., Sullivan, E., Crum-Cianflone, N. 2016. Sporotrichosis as an usual case of osteomyelitis: a case report and review of the literature. *Medical Mycology Case Reports*, **11**, 31-35. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211753916300264>> Acesso em: 20 de maio de 2019.
- Li, S., Liu, H., Zheng, H., Chen, S., Fu, A., Wang, H., Song, Y., Yao, L., Liu, Y. 2011. Clinical analysis of 585 cases of cutaneous sporotrichosis. *Chinese Journal of Dermatology*. 44: 161-164.
- Liu, C.L. 1956. Sporotrichosis: report of a case. *Chinese Medical Journal*. 73: 330-336.
- Liu, T., Zhang, K., Zhou, X. 2013. Molecular identification of *Sporothrix* clinical isolates in China. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B (Biomedicine & Biotechnology)*. 15: 100-108.
- Londero, A.T., Ramos, C.D. 1989. Esporotricose no Rio Grande do Sul: Três décadas de observação. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 64: 307-310.
- Lopes-Bezerra, L.M.; Mora-Montes, H.M., Bonifaz, A. 2017. *Sporothrix* and Sporotrichosis. In: Mora-Montes, H.M.; Lopes-Bezerra, L.M. (eds.) *Current Progress in Medical Mycology*. São Paulo, Springer International, pp. 309-331.
- Lopes-Bezerra, L., Schubach, A., Costa, R. 2006. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78: 293-308.
- Lopes-Bezerra, L.M., Walker, L.A., Niño-Veja, G., Mora-Montes, H.M., Neves, G.W.P, Villalobos-Duno, H., Barreto, L., Garcia, K., Franco, B., Martínez-Alvarez, J.A., Munro, C.A., Gow, N.A.R. 2018. Cell walls of the dimorphic fungal pathogens *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis* exhibit bilaminate structures and sloughing of extensive and intact layers. *PLoS Neglected Tropical Diseases*.
- Lopes, J.O., Alves, S.H., Mari, C.R., Brum, L.M., Westphalen, J.B., Altermann, M.J., Prates, F.B. 1999. Epidemiologia da esporotricose na região central do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 32: 541-545.
- López-Romero, E. Reyes-Montes, M.R., Pérez-Torres, A., Ruiz-Baca, E., Villagómez-Castro, J.C., Mora-Montes, H.M., Flores-Carréon, A., Toriello, C. 2011. *Sporothrix schenckii* complex and sporotrichosis, an emerging health problem. *Future Microbiology*. 6: 85-102.
- Lutz, A., Splendore, A. 1907. Sobre uma micose observada em homens e ratos: contribuição para o conhecimento das assim chamadas esporotricoses. *Revista Médica de São Paulo. Jornal Prático de Medicina, Cirurgia e Higiene*. 10: 443-450.
- Macêdo-Sales, P.A., Souto, S.R.L., Destefani, C.A., Lucena, R.P., Machado, R.L.D., Pinto, M.R., Rodrigues, A.M., Lopes-Bezerra, L.M., Rocha, E.M.S., Baptista, A.R.S. Domestic feline contribution in the transmission of *Sporothrix* in Rio de Janeiro State, Brazil: a comparison between infected and non-infected populations. *BMC Veterinary Research*. 14: 19.
- Madrid, I.M., Mattei, A., Martins, A., Nobre, M., Meireles M. 2010. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. *Zoonoses and Public Health*. 57: 151-154.
- Magand, F., Perrot, J. L., Cambazard, F., Raberin, M. H.; Labeille, B. S. 2009. Autochthonous sporotrichosis in France. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 136: 273-275.
- Mahajan, V.K., Sharma, N.L., Sharma, R.C., Gupta, M.L., Garg, G., Kanga, A.K. 2005. Cutaneous sporotrichosis in Himachal Pradesh, India. *Mycoses*. 48: 25-31.
- Mahmoudi, S., Zaini, F., Kordbacheh, P., Safara, M., Heidari, M. 2016. *Sporothrix schenckii* complex in Iran: Molecular identification and antifungal susceptibility. *Medical Mycology*. 00: 1-7.
- Mahlberg, M., Patel, R., Rosenman, K., Cheung, W., Wang, N., Sanchez, M. 2009. Fixed cutaneous sporotrichosis. *Dermatology Online Journal*, **15**, 05. Disponível em <[www.http://escholarship.org/uc/item/30m45342](http://escholarship.org/uc/item/30m45342)> Acesso em: 20/05/2019.
- Mariat, F. 1971. Adaptation de *Ceratomyces* a la vie parasitaire chez l'animal — etude de l'aquisition d'un pouvoir pathogene comparable a celui de *Sporothrix schenckii*. *Sabouraudia*. 9: 191-205.
- Mariat, F. 1975. Observations sur l'ecologie de *Sporothrix schenckii* et de *Ceratomyces stenoceras* en corse et en alsace, provinces francaises indemnes de sporotrichose. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*. 13: 217-225.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Guarro, J. 2008a. *Sporothrix luriei*: a rare fungus from clinical origin. *Mycopathologia*. 46: 621-625.

- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Sutton, D., Kawasaki, M., Guarro, J. 2007. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology*. 45: 3198-3206.
- Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Lazéra, M.S. Guarro, J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 44: 351-356.
- Marimon, R., Serena, C., Gené, J., Cano, J., Guarro, J. 2008b. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52: 732-734.
- Marques, G.F., Martins, A.L.G.P., Sousa, J.M.P., Brandão, L.S.G., Wachholz, P.A., Masuda, P.Y. 2015. Characterization of sporotrichosis cases treated in a dermatologic teaching unit in the state of São Paulo - Brazil, 2003 – 2013. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 90: 273-275.
- Martínez-Alvarez, J.A., Pérez-García, L.A., Mellado-Mojica, E., López, M.G., Martínez-Duncker, I., Lopes-Bezerra, L.M., Mora-Montes, H. M. 2017. *Sporothrix schenckii sensu stricto* and *Sporothrix brasiliensis* are differentially recognized by human peripheral blood mononuclear cells. *Frontiers in Microbiology*. 8: 1-15.
- Mata-Essayag, S., Delgado, A., Colella, M.T., Landaeta-Nezer, M.E., Rosello, A., Salazar, C.P., Olaizola, C., Hartung, C., Magaldi, S., Velasquez, E. 2013. Epidemiology of sporotrichosis in Venezuela. *International Journal of Dermatology*. 52: 974-980.
- McCain, W.H., Buell, W.F. 1968. Primary pulmonary Sporotrichosis in Illinois. A case report. First epidemiological link to sphagnum moss. *Illinois Medical Journal*. 134: 255-258.
- Mehta, K.I.S., Sharma, N.L., Kanga, A.K., Mahajan, V.K., Ranjan, N. 2007. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the environmental sources of cutaneous sporotrichosis patients in Himachal Pradesh, India: results of a pilot study. *Mycoses*. 50: 496-501.
- Montenegro, H., Rodrigues, A. M., Dias, M. A. G., da Silva, E. A., Bernardi, F., & de Camargo, Z. P. 2014. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC Veterinary Research*. 10: 269.
- Moussa, T.A.A., Kadasa, N.M.S., Zahrani, H.S.A., Ahmed, S.A., Feng, P., Ende, A.H.G.G., Zhang, Y., Kano, R., Li, S., Li, S., Song, Y., Dong, B., Rossato, L., Dolatabadi, S., Hoog, S. 2017. Origin and distribution of *Sporothrix globosa* causing sapronoses in Asia. *Journal of Medical Microbiology*. 66:560–569.
- Nakamura, Y., Sato, H. Watanabe, S., Takahashi, H., Koide, K., Hasegawa, A. *Sporothrix schenckii* isolated from a cat in Japan. *Mycoses*. 39: 125-128.
- Nascimento, R. C., Espíndola, N. M., Castro, R. A., Teixeira, P. A., Loureiro y Penha, C. V., Lopes-Bezerra, L. M., Almeida, S. R. 2008. Passive immunization with monoclonal antibody against a 70-kDa putative adhesin of *Sporothrix schenckii* induces protection in murine sporotrichosis. *European journal of immunology*. 38: 3080-3089.
- Neyra, E., Pierre-Alain, F., Swinne, D., Fauche, F., Bustamante, B., Nolard, N. 2005. Epidemiology of human sporotrichosis investigated by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*. 43: 1348-1352.
- Noguchi, H., Hiruma, M., Kawada, A. 1999. Case Report. Sporotrichosis successfully treated with itraconazole in Japan. *Mycoses*. 42: 571-576.
- Nunes, G. D. L., dos Santos Carneiro, R., Filgueira, K. D., Filgueira, F. G. F., & Fernandes, T. H. T. 2013. Esporotricose felina no município de Itaporanga, estado da Paraíba, Brasil: relato de um caso. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 14.
- Nor, N., Baseri, M. 2015. Skin and subcutaneous infections in south-east Asia. *Current Opinion in Infectious Diseases* **28**, 133-138. Disponível em: <https://journals.lww.com/co-infectiousdiseases/fulltext/2015/04000/Skin_and_subcutaneous_infections_in_south_east.4.aspx> Acesso em: 17/05/2019.
- Oliveira, D., Lopes, P.M., Spader, T., Mahl, C., Tronco-Alves, G., Lara, V., Santurio, J., Alves, S.H. 2011. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 3047-3049.
- Oliveira, M.M.E.; Almeida-Paes, R.; Muniz, M.M.; Barros, M.B.L.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancope-Oliveira, R.M. 2010. Sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa* in Rio de Janeiro, Brazil: case report. *Mycopathologia*. 169: 359-363.

- Oliveira, M.M.E., Almeida-Paes, R., Gutierrez-Galhardo, M.C., Zancope-Oliveira, R.M. 2010. Molecular identification of the *Sporothrix schenckii* complex. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31: 2-6.
- Oliveira, M.M.E.; Almeida-Paes, R.; Muniz, M.M.; Barros, M.B.L.; Gutierrez-Galhardo, M.C.; Zancope-Oliveira, R.M. 2011. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. *Mycopathologia*. 172: 257- 267.
- Oliveira, M.M.E., Maifrede, S.B., Ribeiro, M.A., Zancope-Oliveira, R.M. 2013a. Molecular identification of *Sporothrix* species involved in the first familial outbreak of sporotrichosis in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 108: 936-938.
- Oliveira, M.M.E., Santos, C., Sampaio, P., Romeo, O., Pais, C., Lima, N., Zancopé-Oliveira, R. M. 2015. Development and optimization of a new MALDI-TOF protocol for identification of the *Sporothrix* species complex. *Research in Microbiology*. 166: 102-110.
- Orofino-Costa, R., Macedo, P.M., Carvalhal, A., Bernardes-Engemann, A.R. 2013. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 88: 401-407.
- Orofino-Costa, R., Rodrigues, A. M., Macedo, P.M., Bernardes-Engemann, A.R. 2017. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 92: 606-620.
- Pahdye, A.A., Kaufman, L., Durry, E., Banerjee, C. K., Jindal, S. K., Talwar, P., Chakrabarti, A. 1992. Fatal Pulmonary Sporotrichosis Caused by *Sporothrix schenckii* var. *luriei* in India. *Journal of Clinical Microbiology*. 30: 2492-2494.
- Panja, D., Dey, N.C., Ghosh, L.M. 1947. Sporotrichosis of the Skin in India (A New Species Described). *The Indian Medical Gazette*. 82: 200-202.
- Pappas, P., Telles, I., Deep, A., Nolasco, D., Holgado, W., Bustamante, B. 1999 Sporotrichosis in Peru: Description of an area of hiperendemicity. *Clinical Infectious Diseases*. 30 65-70.
- Pereira, S. A., Passos, S. R. L., Silva, J. N., Gremiao, I. D. F., Figueiredo, F. B., Teixeira, J. L., ... Schubach, T. M. P. 2010. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Veterinary Record*, 166: 290–294.
- Pijper, A., Pullinger, B. D. 1927. An outbreak of sporotrichosis among south African native miners. *Lancet*. 1: 914-915.
- Pinkus, H., Grekin, J.N. 1950. Sporotrichosis with asteroid tissue forms: report of a case. *Archives of dermatology*. 61: 813-819.
- Poester, V.R., Brandolt, T.M., Klafke, G.B., Xavier, M.O. 2018a. Population knowledge on sporotrichosis in an endemic area in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Pesquisa em Saúde*. 20: 25-30.
- Poester, V.R., Mattei, A.S., Madrid, I.M., Pereira, J.T.B., Klafke, G.B., Sanchonete, K.O., Brandolt, T.M., Xavier, M.O. 2018b. Sporotrichosis in Southern Brazil, towards an epidemic? *Zoonoses and Public Health*. 65-815-821.
- Poester, V.R., Mendes, J.F., Groll, A.V., Klafke, G.B., Brandolt, T.M., Xavier, M.O. 2018c. *Sporothrix* spp. evaluation in soil of a hyperendemic area for sporotrichosis in southern Brazil. *Ciência Animal Brasileira*. 19: 1-8.
- Prefeitura da Cidade do Recife (PCR) (2013). Caracterização do território. Disponível em: <<http://www2.recife.pe.gov.br/pagina/caracterizacao-do-territorio>>. Acesso em 5 de outubro de 2020.
- Queiroz-Telles, F., Nucci, M., Colombo, A.L., Tobón, A., Restrepo, A. 2011. Mycoses of implantation in the South America: an overview of epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Medical Mycology*. 49: 225-236.
- Quintal, D., 2000. Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. 4: 51-54.
- Ramírez-Soto, M.C., Aguilar-Ancori, E.G., Tirado-Sánchez, A., Bonfiaz, A. 2018. Ecological determinants of sporotrichosis etiological agents. *Journal of fungi*. 4: 2-11.
- Ramos, A.C.M.O., Oliveira, I.V.P.M., Reis-Lima, R.K., Paula, V.V., Filgueira, K.D. 2017. Zoonotic transmission of canine sporotrichosis in northeastern Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*. 11: 79-84.

- Ramos-e-Silva, M., Vasconcelos, C., Carneiro, S., Cestari, T. 2007. Sporotrichosis. *Clinics in Dermatology*. 25: 181-187.
- Rangel-Gamboa, L., Martínez-Hernandez, F., Maravilla, P., Arenas-Guzmán, R., Flisser, A. 2015. Update of phylogenetic and genetic diversity of *Sporothrix schenckii sensu lato*. *Medical Mycology*. 54.
- Rathiyamaler, M., Zamri-Saad, M. and Annas, S., 2017. Tropical Agricultural Science. *Pertanika Journal of Tropical Agriculture Science*. 40: 389-398.
- Reed, K.D., Moore, F.M., Geiger, G.E., Stemper, M.E. 1993. Zoonotic Transmission of Sporotrichosis: Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases*. 16: 384-387.
- Reiss, E., Obayashi, T., Orle, K., Yoshida, M., Zancopé-Oliveira, R.M. 2000. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Medical Mycology*. 38: 147-159.
- Restrepo, A., Robledo, J., Gómez, I., Tabares, A. M., Gutiérrez, R. 1986. Itraconazole therapy in lymphangitic and cutaneous sporotrichosis. *Archives of Dermatology*, 122: 413-417.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., Camargo, Z.P. 2015. Molecular Diagnosis of Pathogenic *Sporothrix* Species. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 9: 1-22.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., Camargo, Z.P. 2016b. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. *PLoS pathogens*. 12: 1-7.
- Rodrigues, A. M., Bagagli, E., de Camargo, Z. P., & de Moraes Gimenes Bosco, S. 2014a. *Sporothrix schenckii sensu stricto* Isolated from Soil in an Armadillo’s Burrow. *Mycopathologia*. 177: 199-206.
- Rodrigues, A.M., Choappa, R.C., Fernandes, G.F., De Hoog, G.S. and De Camargo, Z.P. 2016a. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal biology*. 120: 246-264.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., Pires, D.C., Brilhante, R.S.N., Sidrim, J.J.C., Gadelha, F.M., Colombo, A.L., Camargo, Z.P. 2014b. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis.
- Rodrigues, A.M., de Hoog, G.S., Zhang, Y., Camargo, Z.P. 2015b. Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerging Microbes & Infections*. 3: 1-10
- Rodrigues, A.M., Fernandes, G.F., Araújo, L.M., Terra, P.P.D., Santos, P.O., Pereira, S.A., Schubach, T.M.P., Burguer, E., Lopes-Bezerra, L.M., Camargo, Z.P. 2015a. Proteomics-Based Characterization of the Humoral Immune Response in Sporotrichosis: Toward Discovery of Potential Diagnostic and Vaccine Antigens. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 9.
- Rodrigues, A.M., Teixeira, M.M., de Hoog, S., Schubach, T.M.P., Pereira, S.A., Fernandes, G.F., Bezerra, L.M.L., Felipe, M.S., Camargo, Z.P. 2013. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 7: 1-13.
- Rojas, O.C., Bonifaz, A., Campos, C., Treviño-Rangel, R.J. González-Álvarez, R., González, G.M. 2018. Molecular identification, antifungal susceptibility, and geographic origin of clinical strains of *Sporothrix schenckii* complex in Mexico *Journal of Fungi*. 4: 1-9.
- Romeo, O., Scordino, F., Criseo, G. 2011. New insight into molecular phylogeny and epidemiology of *Sporothrix schenckii* species Complex based on calmodulin-encoding gene analysis of Italian isolates. *Mycopathologia*. 172:179-186.
- Romero-Cabello, R., Bonifaz, A., Romero-Feregrino, R., Sánchez, C.J., Linares, Y., Zavala, J. T., Romero, L.C., Romero-Feregrino, R., Vega, J.S. 2011. Disseminated sporotrichosis. *BMJ Case Reports*. 00: 1-4.
- Rossato, L. Moreno, L.F., Jamalian, A., Stielow, B., Almeida, S.R., de Hoog, S., Freeke, J., 2018. Proteins potentially involved in immune evasion strategies in *Sporothrix brasiliensis* elucidated by Ultra-High-Resolution Mass Spectrometry. *mSphere*. 3: 1-10.
- Rubio, G., Sánchez, G., Porras, L., Alvarado, Z. 2010. Esporotricosis: prevalencia, perfil clínico y epidemiológico en un centro de referencia en Colombia. *Revista Iberoamericana de Micología*. 27: 75-79.

- Saiter, G.B., Barros, C.C., Norberg, A.N., Sanches, F.G. 2017. Sporotrichosis in the Baixada Fluminense Region, Province of Rio de Janeiro, Brazil. *Science Journal of Public Health*. 5: 45-48.
- Sanchotene, K. O., Madrid, I. M., Klafke, G. B., Bergamashi, M., Terra, P. P. D., Rodrigues, A. M., Camargo, Z.P., Xavier, M. O. 2015. *Sporothrix brasiliensis* outbreaks and the rapid emergence of feline sporotrichosis. *Mycoses*. 58: 652- 658.
- Sandhu, G., Kline, B., Stockman, L., Roberts, G. 1995. Molecular probes for diagnostic of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 2913-2919.
- Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde do estado de Pernambuco. 2018. *Boletim esporotricose humana-Vigilância em Saúde*.
- Schenck, B.R. 1898. On refractory subcutaneous abscesses caused by a fungus possibly related to the *Sporotricha*. *Johns Hopkins Press*. 9: 286-290.
- Schubach, A., Barros, M.B.L., Schubach, T.M.P., Francesconi-do-Vale, A.C., Gutierrez-Galhardo, M.C.R., Sued, M., Salgueiro, M.M., Fialho-Monteiro, P.C., Reis, R.S., Marzochi, K.B.F., Wanke, B., Conceição-Silva, F. 2005. Primary conjunctival sporotrichosis: two cases from a zoonotic epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. *Cornea*. 24: 491-493.
- Sei, Y. 2012. 2006 Epidemiological survey of dermatomycoses in Japan. *Medical Mycology Journal*. 53: 185-192.
- Sgarbi, D.B., Silva, A.J.R., Carlos, I.Z., Silva, C.L., Angluster, J., Alviano, C.S. 1997. Isolation of ergosterol peroxide and its reversion to ergosterol in the pathogenic fungus *Sporothrix schenckii*. *Mycopathologia*. 9: 9-14.
- Shahram, M., Farideh, Z., Parivash, K., Mahin, S. High resistance of *Sporothrix schenckii* complex to three azolic antifungal drugs.
- Sharkey-Mathis, P. K., Kauffman, C. A., Graybill, J. R., Stevens, D. A., Hostetler, J., Cloud, G., Dismukes, W. E. 1993. Treatment of sporotrichosis with itraconazole. *The American Journal of Medicine*. 95: 279–285.
- Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. 2004. *Micologia médica à luz dos autores contemporâneos*. 1^o Edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Siew, H.H. 2017. The current status of feline sporotrichosis in Malaysia. *Medical Mycology Journal*. 58: 107-113.
- Silva, G.M., Howes, J.C.F, Leal, C.A.S, Mesquita, E.P., Pedrosa, C.M., Oliveira, Andréia, A.F.O., Silva L.B.G., Mota R.A. 2018. Surto de esporotricose felina na região metropolitana do Recife. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38:1767-1771.
- Silva, J.N., Miranda, L.H.M., Menezes, R.C., Gremião, I.D.F., Oliveira, R.V.C., Vieira, S.M.M., Conceição-Silva, F., Ferreira, L., Pereira, S.A. 2018. Comparison of the Sensitivity of Three Methods for the Early Diagnosis of Sporotrichosis in Cats. *Journal of Comparative Pathology*. 160: 72-78.
- Silva, M. 1952. Sporotrichosis in Colombia. *Archives of Dermatology*. 65: 355.
- Silva, M.B.T., Costa, M.M.M., Torres, C.C.S., Gutierrez-Galhardo, M.C., Valle, A.C.F., Magalhães, M.A.F., Sabroza, P.C., Oliveira, R.M. 2012. Esporotricose urbana: epidemia negligenciada no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. 28: 1867-1880.
- Silva-Vergara, M.L., Camargo, Z. P., Silva, P.F., Abdalla, M.R., Sgarbieri, N.R., Rodrigues, A.M., Santos, K.C., Barata, C.H., Ferreira-Paim, K. 2011. Case report: Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in an HIV- infected patient. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 86: 447-480.
- Singer, J.I., Muncie, J.E. 1952. Sporotrichosis; etiologic considerations and report of additional cases from New York. 52: 2147-2153.
- Song, Y.S., Li, S., Zhong, X. Y., Liu, Y. L., Huo, S. 2011. Report of 457 sporotrichosis cases from Jilin province, northeast China, a serious endemic region. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology*. 27: 313-318.
- Soto, M.C.R. 2015a. Sporotrichosis in the ocular adnexa: 21 cases in an endemic area in Peru and review of the literature. *American Journal of Ophthalmology*. 162: 173-179.

- Soto, M.C.R. 2015b. Sporotrichosis: The story of an endemic region in Peru over 28 years (1985 to 2012). *PLoS One*. 10: 1-12.
- Suzuki, R., Yikelamu, A., Tanaka, R., Igawa, K., Yokozeki, H., Yaguchi, T. 2016. Studies in Phylogeny, Development of Rapid Identification Methods, Antifungal Susceptibility, and Growth Rates of Clinical Strains of *Sporothrix schenckii* Complex in Japan. *Medical mycology journal*. 57: E47-E57.
- Tang, M.M., Tang, J.J., Gill, P., Chang, C.C. and Baba, R., 2012. Cutaneous sporotrichosis: a six-year review of 19 cases in a tertiary referral center in Malaysia. *International journal of dermatology*, 51: 702-708.
- Takase, T., Uyeno, K. 1990. Sporotrichosis with bilateral lesions. A case report. *Mycoses*. 33: 325-344.
- Tirado-Sánchez, A., Bonifaz, A. 2016. Sporotrichosis in children: an update. *Fungal infectious of skin and subcutaneous tissue*. 10: 107-116.
- Valeriano, C.A.T., Lima-Neto, R.G., Inácio, C.P., Rabello, V.B.dS., Oliveira, E.P., Zancopé-Oliveira, R.M., et al. 2020. Is *Sporothrix chilensis* circulating outside Chile? *PLoS Negl Trop Dis* 14(3): e0008151. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008151>.
- Verma, S., Verma, G.K., Singh, G., Kanga, A., Shanker, V., Singh, D., Gupta, P., Mokta, K., Sharma, V. 2012. Sporotrichosis in Sub-Himalayan India. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 6: 1-5.
- Vismer, H.F., Hull, P.R. 1997. Prevalence, epidemiology and geographical distribution of *Sporothrix schenckii* infections in Gauteng, South Africa. *Mycopathologia*. 137: 137-143.
- Waller, S. B., Dalla Lana, D. F., Quatrin, P. M., Ferreira, M. R. A., Fuentesfria, A. M., Mezzari, A. 2020. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*. doi:10.1007/s42770-020-00307-z.
- Waller, S.B., Madrid, I.M., Serra, E.F., Gomes, A.R., Cleff, M.B., Faria, R.O. 2015. *In vitro* susceptibility of the *Sporothrix brasiliensis* to aqueous extracts of the green tea (*Camellia sinensis* L. Kuntze). *Acta Veterinária Brasilica*. 09: 342-347.
- Waller, S.B., Madrid, I.M., Ferraz, V., Picoli, T., Cleff, M.B., Faria, R.O. Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B. 2016a. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. oil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 47: 896-901.
- Waller, S. B., Madrid, I. M., Faria, R. O. de, Cleff, M. B., Mello, J. R. B. de, Meireles, M. C. Araújo. 2016b. Anti-*Sporothrix* spp. activity of medicinal plants. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52: 221-237.
- Waller, S.B., Madrid, I.M., Silva, A.L., Castro, L.L.D., Cleff, M.B., Ferraz, V., Meireles, M.C.A., Zanette, R., Mello, J.R.B. 2016c. *In vitro* susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oils of Lamiaceae family. *Mycopathologia*. 181: 857-863.
- Woods, J.P, Kersulyte, D, Goldman, W.E., Berg, D.E. 1993. Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: 463-464.
- Wolff, D., Feldt, T. Reifenberger, J., Sebald, H., Bogdan, C. 2018. The brief case: Cutaneous sporotrichosis in an immunocompetent patient after travel to Peru. *Journal of Clinical Microbiology*. 56: 1-6.
- Xavier, M.O., Nobre, M.O., Junior, D.P.S., Antunes, T.A., Nascente, P.S., Sória, F.B.A., Meireles, M.C.A. 2004. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 34: 1961-1963.
- Yegneswaran, P.P., Sripathi, H., Bairy, I., Lonikar, V., Rao, R., Prabhu, S. 2009. Zoonotic sporotrichosis of lymphocutaneous type in a man acquired from a domesticated feline source: report of a first case in southern Karnataka, India. *Tropical medicine rounds*. 48: 1198-1200.
- Yu, X., Wan, Z., Zhang, Z., Li, F., Li, R., Liu, X. 2013. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates of clinical origin in Northeast China. *Mycopathologia*. 176: 67-74.
- Zamri-Saad, M., Salmiyah, T.S., Jasni, S., Cheng, B.Y. and Basri, K., 1990. Feline sporotrichosis: an increasingly important zoonotic disease in Malaysia. *Veterinary Record*, 127.

- Zancope-Oliveira, R. M., Almeida-Paes, R., Oliveira, M.M.E., Freitas, D.F.S., Gutierrez-Galhardo, M.C. New diagnostic applications in sporotrichosis. In: KHOPKAR, Uday. *Skin Biopsy: Perspectives*. 1^o Edição. Slavka Krautzeka: In tech, 2011. cap. 4. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/skin-biopsy-perspectives/new-diagnostic-applications-in-sporotrichosis>> Acesso em: 20/05/2019
- Zhang, J. D., & Lin, J. P. 2008. Clinical analysis of 316 cases of cutaneous sporotrichosis. *Chinese Journal of Mycology*. 3: 207-210.
- Zhang, M., Li, Fuqiu, L., Ruoyu, L., Gong, J., Zhao, F. 2019a. Fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*, *Sporothrix schenckii*, and *Sporothrix brasiliensis* based on multiplex realtime PCR. *Plos Neglected Tropical Diseases*. 13: 1-11.
- Zhang, M., Li, F., Gong, J., Yang, X., Zhang, J., Zhao, F. 2019b. Development and evaluation of a real-time polymerase chain reaction for fast diagnosis of sporotrichosis caused by *Sporothrix globosa*. *Medical mycology*. 0: 1-5.
- Zhang Y., Hagen F., Stielow B., Rodrigues A.M., Samerpitak K., Zhou X., Feng P., Yang L., Chen M., Deng S., Li S., Liao W., Li R., Li F., Meis J.F., Guarro J., Teixeira M., Al-Zahrani H.S., Pires de Camargo Z., Zhang L., de Hoog G.S. 2015. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. *Persoonia*. 35:1-20.
- Zhou, X., Rodrigues, A., Feng, P., de Hoog, G.S. 2014. Global ITS diversity in the *Sporothrix schenckii* complex. *Fungal Diversity*. 66: 153-165.

APÊNDICES

APÊNDICE A- 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 “Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica, proteômica e antifúngica dos isolados do Complexo *Sporothrix schenckii*”, que está sob a responsabilidade do (a) pesquisador (a) Carlos Alberto Tiburcio Valeriano, Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária – Recife/PE – 50.670.901, Recife-PE-Telefone (81) 2126 8000/ (83) 99143-6328; e-mail carlosneuron_7@hotmail.com, inclusive ligações a cobrar e conta com a colaboração do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto Telefone para contato: (81) 2126 8525/ (81) 9147 9644, e-mail goncalves_reginaldo@hotmail.com.

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:

A pesquisa proposta tem como objetivo detectar, isolar e identificar fungos agentes da esporotricose em amostras clínicas, coletadas a partir de lesões características desta doença para realização do diagnóstico micológico.

Profissionais da área realizarão as coletas, de forma correta e segura, utilizando material esterilizado e descartável, não oferecendo perigo aos pacientes. No entanto, o paciente, devido a qualquer motivo, poderá ficar à vontade para não fazer a coleta, ou a não participação da pesquisa.

O material colhido será levado ao Laboratório de Micologia Médica, no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a realização dos estudos.

O paciente que participar desta pesquisa se beneficiará diretamente com um diagnóstico de confiança, podendo iniciar um tratamento de forma mais rápida, o que irá ajudar na sua melhoria de vida.

As informações desta pesquisa serão confidenciais e apenas 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 sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa por meio de questionário e fotos da área da micose ficarão armazenados em arquivo no computador do laboratório, sob a responsabilidade do pesquisador e do orientador, no endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária, Recife – PE, CEP: 50.670-901, pelo período de, pelo menos, cinco anos.

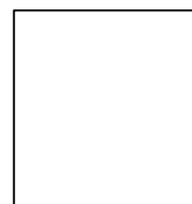
O (a) senhor (a) não pagará nada para participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidos pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação 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: cepeccs@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 “Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica, proteômica e antifúngica dos isolados do Complexo *Sporothrix schenckii*”, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo pesquisador 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).



Local e data _____

Assinatura do participante: _____

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

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

APÊNDICE B- TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (PARA MENORES DE 12 a 18 ANOS - Resolução 466/12)

Convidamos você, após autorização dos seus pais [ou dos responsáveis legais] para participar como voluntário (a) da pesquisa: Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica, proteômica e antifúngica dos isolados do complexo *Sporothrix schenckii*. Esta pesquisa é da responsabilidade do (a) pesquisador (a) Carlos Alberto Tiburcio Valeriano, Av. Prof. Moraes Rego, s/n Cidade Universitária – Recife/PE – 50.670.901, Recife-PE-Telefone (81) 2126 8000/ (83) 99143 6328; e-mail carlosneuron_7@hotmail.com, inclusive ligações a cobrar e conta com a colaboração do Prof. Dr. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto, Telefone para contato: (81) 2126 8525/ (81) 9147 9644, e-mail goncalves_reginaldo@hotmail.com.

Este Termo de Consentimento pode conter informações que você entenda. Caso haja alguma dúvida, pergunte à pessoa que está lhe entrevistando para que esteja bem esclarecido (a) sobre sua participação na pesquisa. Você não terá nenhum custo, nem receberá qualquer pagamento para participar. Você será esclarecido(a) sobre qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se. Após ler as informações a seguir, caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é para ser entregue aos seus pais para guardar e a outra é do pesquisador responsável. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema se desistir, é um direito seu. Para participar deste estudo, o responsável por você deverá autorizar e assinar um Termo de Consentimento, podendo retirar esse consentimento ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem nenhum prejuízo.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Descrição da pesquisa: A pesquisa tem como objetivo diagnosticar e descrever a epidemiologia dos casos de esporotricose em Pernambuco, caracterizar os isolados clínicos do complexo *Sporothrix schenckii* e propor novas alternativas terapêuticas.

Esclarecimento do período de participação do voluntário na pesquisa: A coleta de dados só se iniciará após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPE. Haverá a coleta de material biológico, onde serão colhidos secreção e fragmentos superficiais de lesões características da doença, utilizando-se bisturi para realização de uma leve raspagem para coletas de fragmentos em lesões que apresentem ressecadas, e swab para coleta de pus, ambos esterilizados, para ser realizado o diagnóstico micológico. As coletas serão realizadas conforme a solicitação médica.

RISCOS diretos para o voluntário: Risco de constrangimento no momento da coleta, entretanto serão utilizados para o desenvolvimento da referida pesquisa apenas amostras biológicas de secreção de pacientes que terão solicitação médica para diagnóstico microbiológico, independente de execução do projeto.

Possível perda de alguma das amostras, entretanto o pesquisador se compromete com a manipulação do material de forma adequada e segura. Possível quebra de sigilo ou extravio de algum dado do prontuário do paciente. Como forma de minimizar esses riscos, o pesquisador se compromete com a manipulação adequada do prontuário e a confidencialidade dos dados coletados conforme declaração anexada na plataforma Brasil.

BENEFÍCIOS diretos e indiretos para os voluntários.

A garantia de receber todos os esclarecimentos sobre “o instrumento de coleta de dados (aplicação de questionário, entrevista, formulário)” 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; b- A segurança plena de que não será identificado mantendo o caráter oficial da informação, assim

como, o paciente está assegurada que a pesquisa não acarretará nenhum prejuízo individual ou coletivo; c- A segurança de que não terá nenhum tipo de despesa material ou financeira durante o desenvolvimento da pesquisa, bem como, esta pesquisa não causará dano físico ou mesmo constrangimento moral e ético ao entrevistado; d- A garantia de que toda e qualquer responsabilidade nas diferentes fases da pesquisa é dos pesquisadores, bem como, fica assegurado, poderá haver divulgação dos resultados finais em órgãos de divulgação científica em que a mesma seja aceita; e- A garantia de que todo o material resultante será utilizado exclusivamente para a construção da pesquisa e ficará sob a guarda dos pesquisadores, podendo ser requisitado pelo entrevistado em qualquer momento. Acrescentamos que os sujeitos envolvidos na pesquisa serão diretamente beneficiados com o diagnóstico de seu possível processo infeccioso, direcionando um tratamento rápido e eficaz.

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 sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (idade, sexo, doença de base, uso de medicamentos, etc), ficarão armazenados em (pastas de arquivo no computador pessoal do pesquisador responsável), sob a responsabilidade do pesquisador (Carlos Alberto Tiburcio Valeriano), no endereço (acima informado), pelo período de no mínimo 5 anos. Nem você e nem seus pais [ou responsáveis legais] pagarão nada para você participar desta pesquisa. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação e de seus pais serão assumidas ou ressarcidas pelos pesquisadores. Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da sua participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

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).**

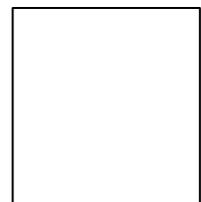
Assinatura do pesquisador (a)

ASSENTIMENTO DO MENOR DE IDADE EM PARTICIPAR COMO VOLUNTÁRIO

Eu, _____, portador (a) do documento de Identidade _____ (se já tiver documento), abaixo assinado, concordo em participar do estudo, “Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica, proteômica e antifúngica dos isolados do complexo *Sporothrix schenckii*” como voluntário (a). Fui informado (a) e esclarecido (a) pelo (a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, o que vai ser feito, assim como os possíveis riscos e benefícios que podem acontecer com a minha participação. Foi-me garantido que posso desistir de participar a qualquer momento, sem que eu ou meus pais precise pagar nada.

Local e data _____

Assinatura do (da) menor : _____

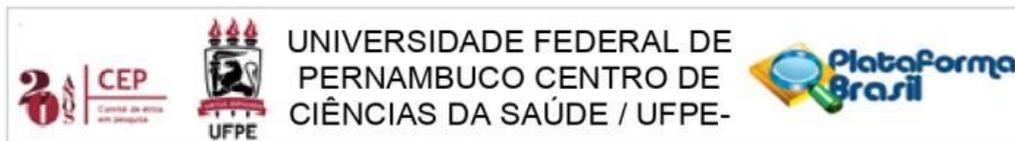


Presenciamos a solicitação de assentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do/a voluntário/a em participar. 02 testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

ANEXOS

ANEXO A- Parecer Consubstanciado



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESPOROTRICOSE EM PERNAMBUCO: DIAGNÓSTICO, DESCRIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA, PROTEÔMICA E ANTIFÚNGICA DOS ISOLADOS DO COMPLEXO *Sporothrix schenckii*

Pesquisador: CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70369117.5.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.199.596

Apresentação do Projeto:

Trata de um projeto intitulada "Esporotricose em Pernambuco: diagnóstico, descrição epidemiológica, caracterização genômica, proteômica e antifúngica dos isolados do complexo *Sporothrix schenckii*". A pesquisa será desenvolvida no programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos tendo como pesquisador responsável o doutorando Carlos Alberto Tiburcio Valeriano orientado pelo Prof. Reginaldo Gonçalves de Lima Neto.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Diagnosticar e descrever a epidemiologia dos casos de esporotricose em Pernambuco, caracterizar os isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* e propor novas alternativas terapêuticas.

Objetivo Secundário:

a) Diagnosticar os casos de esporotricose humana e felina a partir exsudação inflamatória e/ou escarificação epidérmica; b) Identificar os isolados fenotipicamente, genotipicamente e espectrometria por MALDI-TOF MS; c) Descrever os fatores de risco e a frequência das espécies identificadas, considerando o município de origem da cepa e a manifestação clínica da doença; d) Determinar a sensibilidade antifúngica (iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol, miltefosina, extratos hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* e compostos de tiofeno; e) Implementar o

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde

Bairro: Cidade Universitária

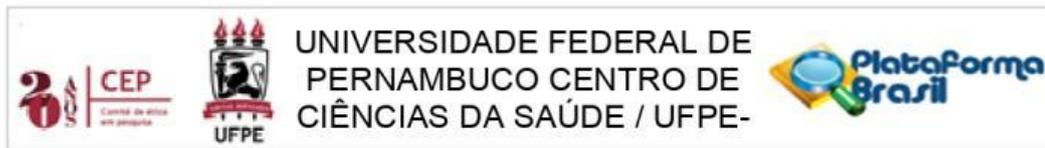
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



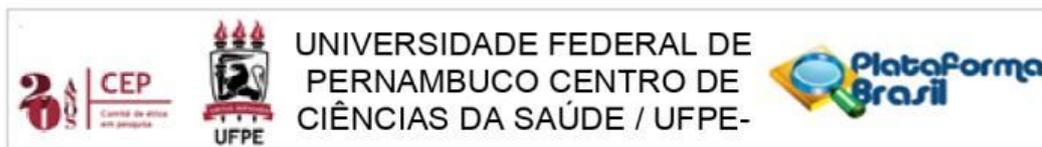
Continuação do Parecer: 2.199.596

O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_893144.pdf	28/06/2017 10:57:10		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEPais.doc	27/06/2017 13:30:21	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALEmenoresde18anos.doc	27/06/2017 13:27:38	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEmaioresde18.docx	27/06/2017 13:27:01	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEparaadultosnalfabetizadosjuridica menteincapazes.docx	27/06/2017 13:26:26	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	Vinculo.pdf	27/06/2017 13:25:19	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoesp.docx	27/06/2017 11:14:48	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	TermoConfid.pdf	27/06/2017 11:13:46	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	anuenciacetene.pdf	19/06/2017 07:27:37	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	dados.pdf	12/06/2017 11:12:42	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.199.596

Outros	Anuenciasame.pdf	12/06/2017 11:12:10	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	Anuenciamic.pdf	12/06/2017 11:11:39	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	Anuenciader.pdf	12/06/2017 11:10:49	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Folha de Rosto	FDRosto.pdf	12/06/2017 11:07:33	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	questionario.docx	28/05/2017 13:40:06	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	LattesRG.pdf	28/05/2017 12:37:36	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito
Outros	LattesCATV.docx	28/05/2017 12:36:25	CARLOS ALBERTO TIBURCIO VALERIANO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 03 de Agosto de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br