



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS  
FUNDAÇÃO HOSPITALAR ALFREDO DA MATTA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS APLICADAS A DERMATOLOGIA  
MESTRADO PROFISSIONAL**



**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix spp.***

**EUZENIO MOREIRA DE BRITO**

**MANAUS  
2024**

**EUZENIO MOREIRA DE BRITO**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* E  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Sporothrix spp.***

Projeto de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia da Universidade do Estado do Amazonas em Convênio com a Fundação Hospitalar “Alfredo da Matta”, para obtenção do título de Mestre no curso de *Mestrado Profissional*.

Orientador (a): **Profº Dr. André Luiz Leturiondo**

Coorientador (a): **Profª Dra. Maria Zeli Moreira Frota**

**MANAUS  
2024**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

D278a	<p>de Brito, Euzenio Moreira Avaliação do perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> e caracterização fenotípica de isolados clínicos de <i>Sporothrix</i> spp. / Euzenio Moreira de Brito . Manaus : [s.n], 2024. 63 f.: color.; 21,0 cm.</p> <p>Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Dermatologia-PPGDE- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2024. Inclui Bibliografia. Inclui Anexo. Orientador: Leturiondo, André Luiz. Coorientador: Frota, Maria Zeli Moreira.</p> <p>1. Esporotricose humana. 2. Suscetibilidade <i>in vitro</i>. 3. Características fenotípicas. 4. Infecção por <i>Sporothrix</i>. I. Leturiondo, André Luiz (Orient.) II . Frota, Maria Zeli Moreira (Coorient.) III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU(1997)616.5(043.3)</p>
-------	--

Dedico à minha mãe (*in memoriam*), meu maior exemplo de fé, que partiu para Deus tão precocemente.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, pois sem ele nada é possível.

À minha mãe (*in memoriam*), que partiu nos momentos finais da execução desse trabalho, e através de sua fé e suas orações a Deus vislumbrava a concretização desse sonho.

Aos meus familiares e amigos, que apoiaram e deram forças nessa jornada.

À Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM) em parceria com a Universidade do Estado do Amazonas (UEA), pela oportunidade de realizar esse mestrado no PPGCAD, proporcionando maiores conhecimentos acadêmicos, científicos e interação multiprofissional.

À gerência do Laboratório de Análises Clínicas e à Coordenação do Programa de Iniciação Científica da FUHAM, pelo incentivo e espaço que foi cedido.

Ao Laboratório de Micologia da FUHAM em nome da Farmacêutica-Bioquímica Débora Fernandes e sua equipe composta pelos Técnicos de Laboratório Adriano, Eleade e Jorge, pelo grande apoio prestado.

Ao Laboratório de Biologia Molecular da FUHAM, em nome do Prof<sup>o</sup> Dr. André Leturiondo, meu orientador, por sua gentileza e comprometimento ao aceitar a orientação do mestrado, e ao mestrando Guilherme Caldas, pelo seu apoio com as análises moleculares.

Ao Laboratório de Micologia Clínica LABMICO (FCF/UFAM) em nome da Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Zeli Frota, minha coorientadora e grande inspiração desde a graduação, e à sua equipe composta pelas discentes Ariane Fonseca, Vitória Wilkens e Técnico de Laboratório Landerson Vieira, pelo apoio incondicional e parceria no desenvolvimento das análises de caracterização fenotípica e testes de suscetibilidade *in vitro*.

Ao Laboratório de Bacteriologia LABAC (FCF/UFAM) em nome da Prof<sup>a</sup> Dra. Karem Carim e da Técnica de Laboratório Adriana Carvalho, pelo apoio técnico prestado nas análises de caracterização fenotípica.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.*

Arthur Schopenhauer

## RESUMO

**Introdução.** A esporotricose é uma doença fúngica subcutânea subaguda ou crônica, que afeta tanto humanos quanto animais, causada por espécies de fungos termodimórficos pertencentes ao complexo *Sporothrix spp.* A deflagração da esporotricose felina e humana na cidade de Manaus ocorreu em 2020, e desde então, observa-se um aumento exponencial da doença, o que impôs um cenário epidemiológico preocupante da doença no Estado do Amazonas, acrescido da possibilidade circulação de cepas resistentes à terapêutica convencional. Diante deste novo cenário, e da escassez de dados no referido estado, o presente estudo buscou analisar características fenotípicas de isolados de *S. brasiliensis*, algumas das quais estão associadas a fatores de virulência de fungos patogênicos, bem como, analisar o perfil de susceptibilidade dos mesmos a três drogas antifúngicas.

**Materiais e métodos.** Foram realizadas análises fenotípicas de 34 isolados de *S. brasiliensis* obtidos em um centro de referência em Dermatologia no estado do Amazonas, a partir de estudos morfológicos, fisiológicos e de atividade enzimática, os quais podem estar associadas a fatores de virulência. Além disso, foi avaliada a suscetibilidade antifúngica das cepas frente aos fármacos Itraconazol, Posaconazol e Terbinafina, empregando-se os protocolos do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) M38-A2. Os dados obtidos foram tabulados e analisados por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais.

**Resultados.** As análises morfo-fisiológicas permitiram a diferenciação de seis fenótipos de colônias de *S. brasiliensis* em agar batata-dextrose, as quais apresentaram forte atividade enzimática na maioria dos testes, com exceção da fosfolipase que não apresentou qualquer atividade, e da urease, cuja atividade foi mais ou menos intensa entre esses fenótipos morfológicos. Os testes de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos azólicos revelaram CIM<sup>80-100</sup> entre 0,25µg/mL a 1 µg/mL para o posaconazol e 0,25 a 2 µg/mL para itraconazol. E para a terbinafina, as cepas foram suscetíveis nas concentrações entre 0,25 µg/mL a 1 µg/ml.

**Considerações finais.** Os resultados obtidos no presente estudo contribuirão para o conhecimento das características fenotípicas de isolados clínicos de *S. brasiliensis*, e do perfil

de suscetibilidade a três drogas antifúngicas, em um centro de referência em diagnóstico e tratamento de doenças dermatológicas no Amazonas. Tais resultados servirão de apoio para futuras investigações científicas e uma melhor abordagem clínica da esporotricose no estado.

**Palavras-chave:** esporotricose humana, suscetibilidade *in vitro*, características fenotípicas.

## ABSTRACT

**Background.** Sporotrichosis is a subcutaneous or chronic fungal disease, which affects both humans and animals, caused by species of thermodimorphic fungi belonging to the *Sporothrix spp.* complex. The outbreak of feline and human sporotrichosis in the city of Manaus occurred in 2020, and since then, an exponential increase in the disease has been observed, which has imposed a worrying epidemiological scenario for the disease in the state of Amazonas, increased by the possibility of circulation of strains resistant to the disease conventional therapy. Given this new scenario, and the scarcity of data in that state, the present study aim to analyze phenotypic characteristics of *S. brasiliensis* isolates, some of which are associated with virulence factors of pathogenic fungi, as well as analyze the susceptibility profile of the same as three antifungal drugs.

**Methods.** Phenotypic analyzes were carried out on 34 isolates of *S. brasiliensis* obtained in a reference center for Dermatology in the state of Amazonas, based on morphological, physiological and enzymatic activity studies, which may be associated with virulence factors. Furthermore, the antifungal susceptibility of the strains to the drugs Itraconazole, Posaconazole and Terbinafine was evaluated, using the protocols of the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) M38-A2. The data obtained were tabulated and analyzed using descriptive statistics, with absolute and percentage distributions.

**Results.** Morpho-physiological analyzes allowed the differentiation of six phenotypes of *S. brasiliensis* colonies on potato-dextrose agar, which showed strong enzymatic activity in most tests, with the exception of phospholipase, which did not show any activity, and urease, whose activity was more or less intense between these morphological phenotypes. *In vitro* susceptibility tests to azole antifungals revealed MIC<sup>80-100</sup> between 0.25 µg/mL to 1 µg/mL for posaconazole and 0.25 to 2 µg/mL for itraconazole. And for terbinafine, the strains were susceptible at concentrations between 0.25 µg/mL and 1 µg/ml.

**Conclusion.** The results obtained in the present study contributed to the knowledge of the phenotypic characteristics of clinical isolates of *S. brasiliensis*, and the susceptibility profile to three antifungal drugs, in a reference center for the diagnosis and treatment of dermatological diseases in Amazonas. Such results will support future scientific investigations and a better clinical approach to sporotrichosis in the state.

**Keywords:** human sporotrichosis, *in vitro* susceptibility, phenotypic characteristics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Escala de cores para definição da intensidade da produção de urease após sete dias de incubação. Da esquerda para direita: ( <i>C. albicans</i> ATCC 40260), baixa, moderada e alta .....	23
<b>Figura 2</b> - Fluxograma das atividades analíticas desenvolvidas a partir da coleta dos isolados clínicos.....	25
<b>Figura 3</b> - Macromorfologia (anverso e verso) das colônias correspondentes aos fenótipos definidos para os 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> ....	29
<b>Figura 4</b> - Micromorfologia de <i>Sporothrix spp.</i> visualizada em aumento de 400x. Lâmina de microcultivo de Riddel corada com azul de lactofenol .....	30
<b>Figura 5</b> - Distribuição das médias das taxas de crescimento, em relação aos diferentes fenótipos de <i>Sporothrix spp.</i> .....	30
<b>Figura 6</b> - Cepa de <i>Sporothrix spp.</i> com 21 dias de incubação em ágar batata-dextrose, nas temperaturas de 30°C (esquerda) e 37°C (direita) .....	32
<b>Figura 7</b> - Termotolerância nos 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> .....	33
<b>Figura 8</b> - Frequência da produção de catalase nos 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> .....	34
<b>Figura 9</b> - Demonstração do teste de produção de catalase para as cepas de <i>Sporothrix spp.</i> ...	34
<b>Figura 10</b> - Demonstração do teste de produção de urease para as cepas de <i>Sporothrix spp.</i> .....	35
<b>Figura 11</b> - Frequência da produção de urease nos 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> .....	35
<b>Figura 12</b> - Demonstração do teste de produção de fosfolipase para as cepas de <i>Sporothrix spp.</i> .....	37
<b>Figura 13</b> - Demonstração do teste de atividade hemolítica positiva com formação do halo translúcido ao redor da colônia de <i>Sporothrix spp.</i> .....	37
<b>Figura 14</b> - Atividade hemolítica nos 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> .....	38
<b>Figura 15</b> - Demonstração do teste de atividade de esterase positiva com formação do halo de precipitação ao redor da colônia de <i>Sporothrix spp.</i> .....	39
<b>Figura 16</b> - Atividade de esterase nos 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> .....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes que foram atendidos na FUHAM e dos quais foram obtidos os isolados clínicos de <i>Sporothrix spp.</i> .....	27
<b>Tabela 2</b> - Agrupamento das cepas de <i>Sporothrix spp.</i> de acordo com a caracterização fenotípica da macromorfologia e taxa de crescimento .....	29
<b>Tabela 3</b> - Intensidade de melanização entre os 34 isolados de <i>Sporothrix spp.</i> com 30 dias de incubação em ágar batata-dextrose a 30°C, considerando os diferentes fenótipos morfológicos .	31
<b>Tabela 4</b> - Diâmetro das colônias de <i>Sporothrix spp.</i> com 14 e 21 dias de desenvolvimento, nas temperaturas de 30°C e 37°C.....	33
<b>Tabela 5</b> - Correlação dos fenótipos com a produção de urease .....	36
<b>Tabela 6</b> - Teste de suscetibilidade antifúngica in vitro dos 34 isolados clínicos de <i>Sporothrix spp.</i> .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES DE MEDIDA

%	Porcentagem
%GI	percentual de inibição de crescimento
µg	microgramas
µL	Microlitros
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AM	Amazonas
<i>Apud</i>	Junto a
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
<i>et al.</i>	e colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FUHAM	Fundação Hospitalar Alfredo da Matta
h	Horas
H <sub>2</sub> O	Água
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
Mg	Miligramas
MIC	Concentração Inibitória Mínima
ml	Mililitros
Mm	milímetros
Mm	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
Nm	nanômetros
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
RJ	Rio de Janeiro
<i>s str.</i>	<i>sensu stricto</i>
SDA	Ágar Sabouraud dextrose
SNP	Single Nucleotide Polymorfism, Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFC	Unidade Formadora de Colônia

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 Aspectos epidemiológicos .....	3
2.2 Ecologia e etiologia .....	3
2.3 Aspectos clínicos.....	5
2.4 Esporotricose no Brasil.....	8
2.5 Esporotricose no Amazonas.....	9
2.6 Aspectos fenotípicos .....	10
2.7 Fatores de virulência do complexo <i>Sporothrix</i> .....	12
2.8 Tratamento .....	13
2.9 Suscetibilidade <i>in vitro</i> .....	15
3 OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo Geral .....	18
3.2 Objetivos Específicos .....	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 Delineamento do estudo.....	19
4.2 Universo do estudo.....	19
4.2.1 Local de estudo .....	19
4.2.2 Amostragem .....	19
4.2.3 Critérios de inclusão e exclusão.....	19
4.3 Aspectos éticos .....	20
4.4 Procedimentos analíticos .....	20
4.4.1 Repique e avaliação micológica das culturas de <i>Sporothrix spp.</i> .....	20
4.4.2 Caracterização fenotípica.....	21
4.4.3 Ensaio de atividade enzimática .....	22
4.4.4 Suscetibilidade antifúngica .....	24
4.4.5 Análise estatística.....	26
5 RESULTADOS .....	27
5.1 Caracterização fenotípica.....	28
5.1.1 Macromorfologia e Micromorfologia .....	28
5.1.2 Taxa de crescimento .....	30
5.1.3 Produção de melanina.....	31
5.1.4 Termotolerância.....	32
5.1.5 Atividade de Catalase.....	33
5.1.6 Atividade de Urease .....	34
5.1.7 Atividade de Fosfolipase .....	36
5.1.8 Atividade hemolítica .....	37
5.1.9 Atividade de esterase .....	38
5.2 Teste de suscetibilidade antifúngica <i>in vitro</i> .....	39
6 PRODUTO .....	42
7 DISCUSSÃO .....	43
CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO 1 - PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	61

ANEXO 2 – Procedimentos Operacionais Padrão (POP's) dos testes de caracterização fenotípica para o gênero *Sporothrix spp.*..... 63

## 1 INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma doença fúngica subcutânea, subaguda ou crônica, que afeta tanto humanos quanto animais, causada por espécies de fungos termodimórficos pertencentes ao gênero *Sporothrix spp.* [1].

É mais comum em países tropicais e subtropicais, entretanto apresenta distribuição global, sendo considerada uma micose ocupacional, associada a acidentes traumáticos ocasionados durante atividades laborais, principalmente em jardineiros, agricultores, extrativistas e floristas [2].

Com relação à transmissão, pode ser ocasionada por inoculação traumática na pele por material de solo e plantas contendo células fúngicas, ou a partir de uma mordida ou arranhão de gatos ou cães contaminados. As espécies de *Sporothrix spp.* que habitam solos são encontradas em associação com plantas e matéria orgânica em decomposição, sendo o mesmo um fungo filamentoso com produção de esporos e outros propágulos fúngicos infectantes. Depois de atingir os tecidos do hospedeiro, esporos ou fragmentos de micélio se convertem em formas de leveduras patogênicas [3].

Uma vez que a forma infectante do *Sporothrix spp.* atinge a pele, os sinais clínicos se manifestam, variando entre formas cutâneas, linfocutâneas e sistêmicas, sendo que estas últimas estão relacionadas à imunodeficiência do hospedeiro [4].

As espécies de *Sporothrix* apresentam variações em relação à virulência, preferência do hospedeiro e resistência a fármacos. *S. brasiliensis* mostra-se como a espécie mais virulenta, seguida por *S. schenckii* e *S. globosa*. Sendo assim, diferentes fatores devem ser considerados no tratamento da esporotricose, tais como a forma clínica da doença, o estado imunológico do hospedeiro e as espécies envolvidas [5].

Estudos mostram que nos últimos anos, no Brasil, tem havido um aumento de casos de falhas terapêuticas no tratamento da esporotricose, além de relatos de isolados de *Sporothrix brasiliensis* com baixa sensibilidade ao itraconazol, que é o tratamento de primeira escolha. Supõe-se, que a diminuição da eficácia do itraconazol, pode estar relacionada a mecanismos de resistência desenvolvido por essa espécie, tais como a superexpressão de bombas de efluxo, produção de melanina, superexpressão ou mutação da enzima alvo do fármaco [6].

Existe um amplo espectro de manifestações clínicas na esporotricose, no entanto, os fatores envolvidos na inter-relação patógeno-hospedeiro, bem como os fatores de virulência relacionados ainda não estão bem elucidados. Acredita-se que a produção de certas proteínas ou glicoproteínas, melanina e precursores do ergosterol, bem como a termotolerância fúngica, pode influenciar nas manifestações clínicas da esporotricose, uma vez que isso foi observado em outras micoses causadas por outros fungos patogênicos. O estudo da esporotricose e os fatores de virulência envolvidos é necessário para uma melhor compreensão da biologia, fisiologia e patogenicidade nas suas diferentes formas e espécies [3,7].

A esporotricose no Amazonas possui caráter precoce, uma vez que o surto da doença ocorreu no final do ano de 2020, e deu origem ao cenário que se vive nos dias atuais. Por isso, estudos na literatura que descrevem a ocorrência da doença no Estado, ainda são escassos. Porém, a esporotricose têm figurado entre as dermatoses de maior interesse clínico e chama a atenção da comunidade científica local. A Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM) é um dos principais centros de referência para o diagnóstico e tratamento dos pacientes afetados, e tem buscado atuar em diferentes pesquisas visando proporcionar um conhecimento científico fundamentado, a fim de nortear políticas públicas de enfrentamento e prevenção da doença.

Diante desse cenário atual da esporotricose no estado do Amazonas, o qual chama a atenção pelo aumento alarmante do número de casos, somado à escassez de estudos na literatura científica na região amazônica que caracterizem a doença do ponto de vista clínico-epidemiológico, o presente estudo objetivou avaliar o perfil de suscetibilidade *in vitro*, bem como, as características fenotípicas de isolados de *Sporothrix spp.* de pacientes atendidos na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta (FUHAM).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos epidemiológicos

A esporotricose é uma micose cosmopolita, ocasionada por espécies de *Sporothrix* as quais se distribuem ao redor do mundo de maneira não uniforme [3]. *S. globosa* é a espécie predominante na Ásia, *S. schenckii sensu strictu* na Austrália, África do Sul, oeste da América do Sul, Central e Norte, e *S. brasiliensis* é altamente prevalente no Brasil [8]. Afeta ambos os sexos e em qualquer idade, e a exposição ao fungo, de maneira ocupacional ou recreacional, é o principal fator para a transmissão da doença [3].

A doença tem se apresentado principalmente através de surtos e epidemias, destacando-se como principais áreas de endemicidade a América Latina, sobretudo o Brasil, México, Colômbia, Guatemala e Peru; a Ásia, especialmente China, Índia e Japão; e em menor número, EUA e Austrália [1].

Entre todas as espécies clinicamente relevantes de *Sporothrix*, *S. brasiliensis* apresenta o maior potencial de dispersão geográfica. Em áreas de endemias, esta espécie se sobressai devido principalmente à transmissão felina. Relatos na literatura já mostram casos de isolamento de *S. brasiliensis* em humanos e gatos em alguns países da América do Sul, assim como na Europa, onde a fonte provável foi importada do Brasil [9].

No território brasileiro, a transmissão zoonótica da esporotricose foi relatada primeiramente em estados das regiões sul e sudeste, tais como São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul [10,11,12]. Nos últimos anos, a região nordeste também relatou casos de surtos epizooticos, nos estados de Pernambuco, Alagoas e Rio Grande do Norte [13]. Estudos clínico-epidemiológicos mostraram o grande impacto que a transmissão felina da doença tem gerado e o conseqüente avanço de casos em humanos pelo país, relatados em praticamente todos os estados brasileiros, até o ano de 2020 [14].

### 2.2 Ecologia e etiologia

Foi através de estudos filogenéticos que ficou evidenciado que *Sporothrix schenckii*, na verdade, englobava um grande complexo que compreende outras espécies [15]. Antes desse acontecimento, acreditava-se que apenas a espécie outrora citada era a responsável

pelos casos de esporotricose no mundo. Diante disso, autores dividiram as espécies em clados, onde *S. brasiliensis*, *S. schenckii sensu stricto*, *S. globosa* e *S. luriei* pertencem ao de interesse clínico [14] e no ambiental estão inseridas *S. mexicana* e membros do complexo *S. pallida* (*S. chilensis*, *S. gemella*, *S. humicola*, *S. pallida*, *S. palmiculminata*, *S. protea-sedis*, e *S. stylites*), que com baixo potencial patogênico para humanos e animais [16,17].

Estudos sobre o ciclo natural da doença demonstram que o fungo está inserido em uma via clássica considerada sapronótica acometendo hospedeiros vertebrados de sangue quente. A transmissão horizontal animal, é considerada uma via alternativa de infecção, afetando principalmente gatos domésticos e cães. Na esporotricose transmitida por gatos, a doença é transmitida por meio de arranhões e mordidas, ou pelo contato direto com suas secreções para outros gatos (epizootias), ou diretamente para humanos (zoonoses) [18].

O comportamento diferenciado da patogenicidade de *Sporothrix* pode estar relacionado com a sua característica de termodimorfismo, que é uma adaptação morfológica em temperatura de 37°C, fator importante para a instalação do processo infeccioso, compartilhado com outros patógenos humanos filogeneticamente distantes, nas ordens *Onygenales* e *Eurotiales*. Espécies de *Sporothrix* pertencentes ao clado clínico são fungos termodimórficos “profissionais” que respondem de forma mais eficiente a estímulos térmicos [19,20,9].

Estudos mostraram que a esporotricose também relacionada com um efeito na genética populacional do fungo, levando à redução da variabilidade genética——quando um pequeno grupo de indivíduos não geneticamente representativo da população parental migra para uma nova área e estabelece uma nova população. Com o tempo, a nova subpopulação resultante terá genótipos com características fenotípicas alteradas que podem diferenciá-los da população parental. Portanto, esse efeito pode explicar, por exemplo, a baixa diversidade genética encontrada durante os surtos iniciais de esporotricose transmitida por gatos [21].

Alguns estudos baseados nas características filogenéticas também mostraram que a resistência antifúngica encontrada nas espécies de *Sporothrix spp.* pode estar relacionada com a sua diversidade genética, e que diante de uma pressão seletiva natural, melhora sua capacidade de adaptação ao ambiente. Com isso, fenótipos multirresistentes têm surgido, apresentando alta resistência antifúngica intrínseca associada com polimorfismo no número e

tamanho dos cromossomos que pode levar ao desenvolvimento de clones com genes de resistência [21,6].

Os gatos possuem facilidade de se adaptar a uma ampla variedade de ambientes, além do fato de serem considerados animais de fácil domínio doméstico. Diante disso, a introdução de gatos doentes através de humanos que migram com seus animais de estimação para outras localidades, justifica a presença de um genótipo da população parental, de uma determinada área, em outras geograficamente distantes, uma vez que a esporotricose não é uma doença de transmissão direta de pessoa para pessoa ou mesmo uma zoonose [9].

### **2.3 Aspectos clínicos**

Uma vez que a forma infectante do *Sporothrix spp.* penetra na pele, a doença se manifestará como quadros clínicos variando entre formas cutâneas, linfocutâneas e cutâneo-disseminada ou sistêmica, sendo que estas últimas estão relacionadas com alguma imunodeficiência do hospedeiro [4].

O período pré-patente da enfermidade é bastante variável, em virtude do dimorfismo apresentado pelo gênero. Após a penetração no tegumento, quando ocorre a invasão da forma filamentosa, é necessário que a mudança morfológica ocorra nas camadas mais profundas do tecido. Por outro lado, quando a forma unicelular é introduzida, como ocorre na transmissão zoonótica, esta etapa não é necessária [22].

A verificação dos sinais clínicos ocorre na dependência das condições imunológicas do hospedeiro, bem como dos fatores intrínsecos do agente. A carga microbiana depositada no momento da inoculação é outra questão interferente para a instalação da enfermidade [22]. O agente pode permanecer na derme e tecido subcutâneo, no local de inoculação, se propagar através das estruturas linfáticas resultando em linfangite e linfadenite, ou se disseminar sistemicamente pela via sanguínea [22,23].

Nos seres humanos, as lesões da forma cutânea da doença apresentam-se como um nódulo eritematoso, ulcerado ou verrucoso, que pode, subsequentemente, se disseminar pela via linfática, sendo um desenvolvimento comum em 75–90% dos casos. A infecção também pode ser disseminada hematogenicamente e envolve ossos, articulações, pele,

olhos, sistema nervoso central e trato geniturinário, ou ainda pode ser uma doença de instalação pulmonar [24,9].

A classificação atualizada das formas clínicas da esporotricose humana demonstra o grande espectro clínico atribuído à esta doença, que está relacionado com fatores como o modo de inoculação, imunidade do hospedeiro e fatores de virulência da espécie envolvida [25]. A recente classificação contribui para o melhor entendimento fisiopatológico, investigação diagnóstica e o tratamento do paciente, diante do que foi presenciado nesta doença nas últimas décadas [26].

A forma cutânea da doença classicamente compreende as formas linfocutânea, cutânea fixa e mais recentemente a inoculação múltipla. A forma linfocutânea sendo a mais comum, representa 46% a 92% dos casos, e inicia-se com o surgimento de pequena pápula eritematosa ou pústula, no local de inoculação do fungo. A lesão tende a aumentar de tamanho em poucas semanas, e tornar-se nodular, e em seguida, surgem no trajeto linfático regional, novas lesões pápulo-nodulares, eritematosas, cujo trajeto pode ser ascendente ou descendente, a depender da drenagem regional. A forma cutânea fixa é a segunda mais frequente, correspondendo em média a 25% dos casos, onde após o trauma de inoculação fúngica surge lesão nodular que não exhibe progressão linfática regional, e que tende a ulcerar com o passar do tempo. A inoculação múltipla, sendo a menos comum, apresenta-se com múltiplas lesões cutâneas, polimórficas, em sítios não contíguos, sem envolvimento sistêmico. Essa forma clínica ganhou evidência com a emergência de casos zoonóticos relacionados a felinos doentes, nos quais é possível a ocorrência de múltiplos traumas, em razão de arranhaduras e mordeduras [26].

A forma de acometimento de mucosa, também recentemente classificada, apresenta a região ocular como a mais comumente envolvida, devido à maior exposição. A proximidade entre humanos e felinos domésticos aumentou a frequência dessa apresentação clínica, especialmente em crianças. Ao espirrar, os aerossóis dos animais atingem a mucosa ocular ou, após tocarem o animal ou fômites, os indivíduos levam as mãos contaminadas aos olhos. O quadro clínico mais característico é conjuntivite granulomatosa, caracterizada por lesões vegetantes na conjuntiva palpebral ou bulbar, podendo haver enantema e descarga purulenta. O acometimento de outras mucosas é menos comum, sendo a mucosa nasal a segunda região mais acometida [26].

O acometimento osteoarticular é a manifestação clínica mais comum depois das formas cutânea e mucosa. Ocorre, usualmente, a partir do foco cutâneo contíguo, e é unifocal em muitos casos. Os fatores de risco mais importantes são lesão nas extremidades, sobretudo mãos e pés, pela proximidade anatômica íntima entre a pele e o sistema osteoarticular e pela fragilidade osteometabólica, especialmente nos idosos ou usuários crônicos de corticoides, além de lesão por mordedura, em virtude da maior profundidade do inóculo [26].

Na forma sistêmica, a mais rara, há acometimento de outros órgãos, com ou sem lesões cutâneas. Admite-se que, ocasionalmente, a porta de entrada possa ser pulmonar com disseminação hematogênica do patógeno, ou possa disseminar-se por via hematogênica, a partir de lesão cutânea ou osteoarticular. Embora não haja fatores de risco específicos, pacientes em situações de imunossupressão têm maior predisposição ao desenvolvimento de formas sistêmicas, podendo evoluir a óbito. Raramente, formas sistêmicas são observadas em indivíduos imunocompetentes, o que pode ser atribuído a cepas mais virulentas do fungo ou à imunodeficiência primária do hospedeiro [26].

A forma imunorreativa da esporotricose compreende, durante o curso da doença, reações de hipersensibilidade, que têm sido observadas com maior frequência na epidemia de esporotricose zoonótica – eritema nodoso, eritema multiforme e síndrome de Sweet são as mais comuns. As formas imunorreativas estão, normalmente, associadas a quadros mais brandos e localizados de esporotricose, o que provavelmente demonstra melhor controle imunológico da doença, embora a mesma seja, por vezes, incapacitante [26].

Ainda há o tipo de acometimento da esporotricose classificado como misto, onde poderá haver associação de mais de uma forma de apresentação clínica no mesmo paciente. Mostra-se importante não confundir pacientes com comprometimento misto da pele, mucosa e sistema osteoarticular com esporotricose sistêmica, cujo acometimento ocorre por disseminação hematogênica [26].

Os gatos são considerados mais suscetíveis à contaminação por *Sporothrix* e comumente desenvolvem as formas mais graves da doença, que podem evoluir até o óbito. Múltiplas lesões ulcerativas são geralmente observadas na região cefálica, principalmente no nariz e na região da pata, devido ao comportamento felino que envolve arranhões e mordidas

durante brigas. Diferentemente do que ocorre nas lesões em humanos, pode-se observar um elevado número de leveduras em felinos [27,28].

Além disso, *Sporothrix spp.* expressa importantes atributos de virulência como termotolerância, adesinas e produção de melanina, sendo *S. brasiliensis* considerada a espécie mais virulenta, tanto em animais quanto humanos, e associada com formas atípicas e mais graves da doença, incluindo disseminação da infecção na pele em hospedeiros imunocompetentes e doença sistêmica [7].

## 2.4 Esporotricose no Brasil

Na América Latina, a esporotricose emerge como a micose de maior frequência, com áreas de alta endemicidade no Brasil, Colômbia, Peru e Venezuela. No entanto, notamos diferenças significativas que refletem nas espécies transmitidas e na via de transmissão da doença. Por exemplo, a rota sapronótica da esporotricose é comum em toda a América Latina, onde *S. schenckii s.strictu* dissemina-se através do contato com propágulos fúngicos presentes no ambiente. Por outro lado, a via zoonótica da esporotricose é mais comum no território brasileiro, onde a esporotricose transmitida por gatos é o principal tipo de infecção para humanos, cães e outros gatos, sendo o *S. brasiliensis* o principal agente nesses casos [18,9].

Relatos de casos de esporotricose humana ocorrem em 25 dos 26 estados brasileiros. Porém, devido ao surgimento da esporotricose em gatos, há uma marcada variação quanto à sucessão de espécies envolvidas nas transmissões. Antes da década de 1990, prevaleceu a transmissão sapronótica clássica da esporotricose humana, semelhante em países latino-americanos. Após a década de 1990, com a entrada do gato doméstico na cadeia de transmissão da esporotricose, é possível detectar um aumento considerável de episódios epizoóticos em felinos e transmissão zoonótica para humanos. Este cenário tem a região metropolitana do Rio de Janeiro como seu epicentro, e entre as décadas de 1990 e 2000 observou-se uma propagação gradual da epidemia para outros estados das regiões Sul e Sudeste [21,29,9].

Do ponto de vista da saúde pública, a principal desvantagem do cenário da esporotricose no Brasil, é a escassez de um sistema nacional de notificação para notificar

casos da doença. Desde 2011, a notificação da esporotricose tem sido obrigatória no estado do Rio de Janeiro, mas não em outros estados brasileiros, com raras exceções específicas a nível regional e municipal [30,31,9].

Embora a ausência de dados oficiais torne difícil medir o problema, a esporotricose transmitida por gatos é responsável por uma carga significativa dessa doença no Brasil, ligada à vulnerabilidade social. A doença atinge principalmente mulheres (25 a 59 anos), especialmente em lugares socioeconomicamente desfavorecidos, com baixa renda *per capita* e fornecimento deficiente de água tratada às famílias. Com isso, sugere-se que este cenário tende a se repetir em outras áreas do país [32,9].

A epidemia em curso no estado do Rio de Janeiro tem afetado pelo menos 7.897 humanos, 5.113 gatos e 244 cães, tendo como principal agente etiológico a espécie *S. brasiliensis*. Estados do Sul do Brasil e mais recentemente, diferentes estados do Centro-Oeste, Nordeste e Norte do Brasil também relataram esporotricose transmitida por gatos por esta mesma espécie. A distribuição geográfica parece se estender para fora do país, uma vez que *S. brasiliensis* foi isolado de amostras de solo da Argentina e em uma família do Paraguai, sugerindo uma ocorrência mais ampla desse patógeno na América do Sul [33,34,35].

## 2.5 Esporotricose no Amazonas

No estado do Amazonas a esporotricose possui caráter emergente, uma vez que teve um aumento exponencial no número de casos durante os últimos três anos, principalmente no ano de 2023. A capital Manaus detém a maioria desses casos, e nota-se a presença de casos confirmados também em outros municípios da região do entorno de Manaus e Rio Negro. Acomete principalmente o sexo feminino na faixa etária de 20 a 59 anos, e a transmissão acontece principalmente devido ao contato com o animal doente, especialmente o gato [36].

Estudos locais recentemente publicados mostraram que entre 2020 a 2023, houve um registro de 950 casos humanos e 2.823 casos em animais. O aumento percentual dos casos de esporotricose humana foi de 304% entre os anos de 2021-2022, e 249% entre 2022-2023, e, em contrapartida, na esporotricose animal foi observada uma ascendência de 428% e

345% nos respectivos períodos. A identificação da espécie envolvida nos casos registrados na região confirmou a presença de *S. brasiliensis* como agente etiológico, assim como tem sido demonstrado em outros surtos pelo Brasil [37].

As condições socioambientais são relatadas como um dos principais fatores relacionados à expansão da esporotricose na região amazônica. Alguns autores chamam a atenção para certas condições socio-ambientais envolvendo o cenário de expansão não planejada de cidades marcado pelo desflorestamento, perda do hábitat natural, poluição e aumento da vulnerabilidade social [36]. Além disso, a presença do felino infectado em zonas urbanas e periurbanas, demonstra a carência de medidas de saúde pública para o controle de zoonoses que contribuam para a diminuição da disseminação da doença na região [37].

## 2.6 Aspectos fenotípicos

O primeiro isolamento de *Sporothrix schenckii* no Brasil remete à primeira década de 1900, onde pesquisadores visualizaram estruturas leveduriformes no material a fresco clarificado com KOH 10%. Entretanto, ao semear o mesmo material biológico no meio de cultura, perceberam o desenvolvimento de colônias na superfície com estruturas características de fungos filamentosos, evidenciando, assim, o termodimorfismo deste fungo [38].

Para a observação da fase leveduriforme do *Sporothrix* podem ser usados ágar sangue acrescido de glicose-cisteína ou ágar Brain Heart Infusion (BHI), a 35–37°C [39,9]. Uma de suas características é o crescimento lento nos meios de cultura e, por essa razão, autores sugerem que o fungo deve ser incubado por até trinta dias [40,9].

De acordo com a revisão detalhada do gênero *Sporothrix* realizada por De Hoog [41] *apud* Domsch *et al.* [42], as colônias fúngicas da fase filamentosa apresentam uma taxa de crescimento entre moderada a lenta e caracterizam-se macromorfologicamente por apresentar textura glabrosa (lisa), seca/farinácea ou lanosa, de coloração inicialmente esbranquiçada, mas muitas vezes tornando-se acinzentada ou preta, às vezes arroxeadas ou amareladas. Micromorfologicamente formam hifas delgadas, hialinas (ocasionalmente pálidas), de paredes lisas e finas; células conidiogênicas geralmente solitárias, dispersas,

eretas ou em conidióforos pouco ramificados, às vezes escassos verticilados e completamente hialinos, os quais não se diferenciam muito das hifas vegetativas.

A conidiogênese é do tipo poliblastica denticulada simpodial, em que as células conidiogênicas (conidióforos) contêm um aglomerado apical de dentículos conidiíferos curtos e estreitos, formados em sucessão simpodial ou bastante longos; às vezes os conidióforos continuam a se alongar mais acentuadamente e assim formam vários aglomerados de dentículos. Os conídios são ovóides a fusiformes com extremidade arredondada (piriformes), hialinos e uninucleados. Além disso, conídios semelhantes freqüentemente surgem lateralmente de hifas procumbentes indiferenciadas. Em algumas espécies conídios globosos pigmentados (melanizados) também são produzidos [42].

A caracterização fenotípica pode auxiliar na identificação presuntiva de algumas espécies pertencentes ao clado clínico. De acordo com alguns autores, o formato dos conídios, por exemplo, apresenta-se distintamente entre algumas espécies clínicas, sendo mais alongados, pigmentados e às vezes triangulares, na espécie *S. schenckii sensu stricto*, enquanto que na espécie *S. brasiliensis*, os conídios são mais globosos [43,44].

As características fisiológicas como taxa de crescimento, termotolerância e assimilação de açúcares também são ferramentas úteis na diferenciação das espécies de *Sporothrix*. Espécies do clado clínico apresentam crescimento lento e maior termotolerância, enquanto as do clado ambiental se distinguem por sua maior taxa de crescimento, porém baixa termotolerância [44].

Autores também evidenciaram maior taxa de crescimento por cepas ambientais quando comparadas a cepas de origem clínica. Colônias de *S. mexicana* e *S. pallida*, espécies ambientais ocasionalmente relacionadas a quadros clínicos, apresentam diâmetro de colônia superior a 50 mm, quando cultivadas a 30°C [44].

Com relação à assimilação de açúcares, variações foram descritas entre as espécies do clado clínico e ambiental, para diferentes fontes carbonadas, tais como sacarose, rafinose, ribitol, arabinose e amido [43,44]. Além disso, o acréscimo de glicose ao meio de cultura favorece a síntese de melanina pelo fungo, um importante fator de virulência para este agente [45].

Outra importante característica fisiológica observada nas espécies do complexo *Sporothrix*, é a capacidade de se desenvolver em diferentes condições de pH e osmofilia.

Verificou-se que a fase filamentosa cresce em condições de pH entre 3,0 a 12,0 e tolera concentrações de até 7% de NaCl. Enquanto isso, a fase leveduriforme suporta condições de pH entre 2,4 a 9,5 e apresenta maior tolerância a variações na pressão osmótica, sendo capaz de se desenvolver em meios contendo até 11% de NaCl [43,19].

Ademais, autores destacam que características macro e micromorfológicas, analisadas isoladamente, não são suficientes para a diferenciação das espécies inseridas no complexo *S. schenckii*, sendo, portanto, necessária a implementação de outros testes complementares, para identificação segura do agente [44].

## **2.7 Fatores de virulência do complexo *Sporothrix***

Sabe-se que patogenicidade é a capacidade do microrganismo de causar infecção e está diretamente ligada à habilidade do agente etiológico em resistir ao ambiente em que se encontra, bem como ao sistema imunológico do hospedeiro. Sendo assim, a patogenicidade pode ser determinada por um conjunto de fatores de virulência [46].

Estudos têm demonstrado a habilidade dos fungos em produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-los fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença [47].

Dentre os principais fatores de virulência associados ao complexo *Sporothrix*, destacam-se o termodimorfismo, a termotolerância, a produção de melanina e a produção de enzimas extracelulares, os quais estão relacionados principalmente com mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, e influenciam no processo infeccioso da esporotricose [48,46].

O termodimorfismo é uma importante característica do complexo *Sporothrix*, apresentada também por outros fungos patogênicos, e está correlacionada com a sua capacidade de alterar a morfogênese na temperatura de 37°C. No ambiente, esses fungos estão sob a forma filamentosa, e ao penetrar nos tecidos dos hospedeiros modificam sua forma para leveduras [49].

A termotolerância, uma característica comum às cepas do clado clínico, relaciona-se com a capacidade do fungo de tolerar e se desenvolver em temperaturas mais elevadas. Para que o processo infeccioso evolua, é importante que o fungo apresente tal resistência, pois caso contrário, se restringirá à pele, e não provocará efeitos extra cutâneos [50].

Diferenças na termotolerância, em estudos da literatura, foram associadas com o padrão clínico regional da esporotricose em países vizinhos ao Brasil. Observou-se que isolados oriundos de países como México, Guatemala e Colômbia apresentaram inibição do crescimento a 35 °C e 37 °C e que esse comportamento poderia estar relacionado com a ocorrência de formas mais brandas da enfermidade nestas regiões [51].

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica [48].

Outra característica relacionada na literatura a fatores de virulência no complexo *Sporothrix* e em outros fungos patogênicos, é a produção de melanina, a qual exerce papel fundamental na patogenicidade, como por exemplo na evasão do fungo à resposta imune do hospedeiro e resistência às drogas antifúngicas. De acordo com alguns autores, a piomelanina, eumelanina e DHN-melanina são os três tipos de melanina que podem ser produzidas por esse fungo, sendo o último tipo o mais abundante e facilmente produzido a partir da adição de glicose no meio de cultura [52].

## 2.8 Tratamento

A escolha do tratamento para a esporotricose depende da forma clínica da doença, do estado imunológico do hospedeiro e da espécie envolvida. As mais virulentas, *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* apresentam diferentes perfis de suscetibilidade aos antifúngicos, assim, a resposta à terapia pode ser variável [5].

Os agentes terapêuticos recomendados para o tratamento da esporotricose humana são itraconazol, a anfotericina B, terbinafina e solução saturada de iodeto de potássio. Anfotericina B, itraconazol, posaconazol e terbinafina apresentam maior atividade *in vitro*

contra *Sporothrix*, com MIC descrito na literatura menor que 1 µg/ml. Entre os triazóis de última geração, foi relatada atividade *in vivo* e *in vitro* de posaconazol em combinação com anfotericina B, enquanto o voriconazol não foi considerada uma escolha terapêutica para a esporotricose devido às suas altas MICs [5].

O itraconazol é o medicamento de escolha devido à sua eficácia, segurança e conveniência posológica para esporotricose linfocutânea e cutânea. No Brasil, também é utilizado no tratamento da forma felina da doença. É um medicamento fungistático da primeira geração dos triazólicos que inibe a síntese de ergosterol, o principal esterol da membrana celular do fungo. Dependendo da gravidade da doença e do estado imunológico do hospedeiro, a dose terapêutica pode variar de 100 a 400 mg/dia [53,54,26].

O iodeto de potássio (KI), há muito tempo foi utilizado no tratamento da esporotricose e o provável mecanismo de ação dessa droga está relacionado com a modulação da resposta imunológica no hospedeiro [55,26]. Seu uso bem-sucedido, em associação com o itraconazol em casos graves e refratários de esporotricose felina, foi relatado, sugerindo que essa associação seja uma estratégia possível para casos humanos selecionados [56,26]. No entanto, sua prescrição tem se tornado cada vez menos comum na prática dermatológica, devido ao pouco conhecimento sobre seu exato mecanismo de ação, o desinteresse da indústria farmacêutica, o advento de novos medicamentos e a toxicidade causada pelo uso de altas doses do medicamento [55].

Outro inibidor da síntese de ergosterol utilizado no tratamento da esporotricose é a terbinafina. Esta alilamina trata a forma cutânea em humanos quando o itraconazol ou KI não é tolerado ou não pode ser usado. Está disponível em comprimidos de 125 e 250 mg, facilitando a administração pediátrica. A dose recomendada é de 250 mg/dia, mas pode ser aumentada para 500 mg/dia em adultos [26].

Além do itraconazol, o outro triazólico que exibe alta atividade *in vitro* sobre *Sporothrix spp.* é o posaconazol, sendo classificado como um antifúngico de segunda geração desta classe. No Brasil, está disponível em formulação oral líquida, na concentração de 40 mg/mL, e tem custo elevado. Doses de 600– 800 mg/dia têm sido usadas em casos graves com imunossupressão, quando há intolerância ao itraconazol e após terapia endovenosa com anfotericina B [26].

Em casos graves da esporotricose, a anfotericina B (desoxicolato ou, preferencialmente, lipossomal) é recomendada até que haja a melhora clínica do paciente, sendo um medicamento antifúngico da classe dos polienos desenvolvido na década de 1950. Existem quatro mecanismos para o modo de ação antifúngica dessa droga: (i) formação de poros, (ii) adsorção à superfície (iii) “sequestro” de ergosterol e (iv) dano oxidativo. A dose cumulativa total recomendada para anfotericina B varia de 1 a 3g. Embora eficaz e atue com propriedades fungicidas, o tratamento com anfotericina B não é recomendado para esporotricose cutânea e linfocutânea devido à sua alta toxicidade e à inconveniência da administração intravenosa [55,26].

## 2.9 Suscetibilidade *in vitro*

Autores sugerem duas metodologias padronizadas, quando se trata de estudos sobre a suscetibilidade *in vitro* das espécies de *Sporothrix*. Tais metodologias seriam os protocolos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e do *The European Committee on Antifungal Susceptibility Testing* (EUCAST), que propõem o método de microdiluição em caldo utilizando inóculo obtido a partir de cultura do fungo na forma filamentosa [57,58].

De acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico da esporotricose humana, fluconazol, flucitosina e equinocandinas não inibem o crescimento de *Sporothrix spp. in vitro*, sendo, portanto, dispensável sua inclusão no TSA. Algumas cepas de *Sporothrix* podem ser inibidas pelo voriconazol. Itraconazol, terbinafina, posaconazol e anfotericina B apresentam perfis variados de suscetibilidade antifúngica, o que justifica sua inclusão em todos os testes *in vitro* de suscetibilidade a antifúngicos de espécies patogênicas humanas de *Sporothrix*, pela possibilidade de concentração inibitória mínima (CIM) elevada [26].

Os documentos de referência para os TSA, porém, não mencionam pontos de corte de concentração inibitória mínima (CIM) para as espécies de *Sporothrix spp.*, uma vez que a avaliação de tais protocolos precedeu aos estudos de taxonomia molecular e filogenética sobre esse fungo. Diante disso, estudos multicêntricos como de Espinel-Ingroff *et al.* (2017) [5] têm ajudado a reproduzir os testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro*, estabelecendo cut-offs epidemiológicos (ECV) para as espécies de maior importância clínica a partir de

achados laboratoriais. Com esses pontos de corte, é possível prever sobre isolados clínicos que podem apresentar reduzida suscetibilidade e podem adquirir mecanismos de resistência.

A partir dos estudos multicêntricos ficou estabelecido que os valores de corte para isolados clínicos de *S. brasiliensis* e *S. schenckii*, pela metodologia do CLSI, são, respectivamente, anfotericina B, 4 e 4 µg/mL; itraconazol, 2 e 2 µg/mL; posaconazol, 2 e 2 µg/mL e voriconazol, 64 e 32 µg/mL. Pontos de corte adicionais para *S. brasiliensis* são cetoconazol, 2 µg/mL e terbinafina, 0,12 µg/MI [26,5].

Nas últimas décadas, estudos moleculares forneceram evidências significativas de que gatos domésticos infectados são os principais disseminadores da esporotricose, bem como principal fonte de infecção pela espécie *Sporothrix brasiliensis* em humanos e outros animais. *S. brasiliensis* tem sido considerada a espécie mais sensível à maioria dos agentes antifúngicos *in vitro*, embora esta seja a mais virulenta [59,56].

Entretanto, nos últimos anos, houve um aumento nos relatos de falhas terapêuticas no tratamento da esporotricose e relatos de isolados com baixa sensibilidade ao itraconazol. A diminuição da eficácia do itraconazol contra *S. brasiliensis* observada em isolados clínicos do Brasil nos últimos anos pode estar relacionada a mecanismos de resistência desenvolvidos por essa espécie, como a superexpressão de bombas de efluxo, que corresponde ao principal mecanismo de resistência adquirido a azóis em fungos de relevância médica. No entanto, outros mecanismos de resistência podem estar relacionados com a diminuição da suscetibilidade ao itraconazol, como produção de melanina, superexpressão ou mutação da enzima alvo da droga [6].

Alguns estudos baseados nas características filogenéticas também mostraram que a resistência antifúngica encontrada nas espécies de *Sporothrix spp.* pode estar relacionada com a sua diversidade genética, que, mediante a uma pressão seletiva natural, melhora sua capacidade de adaptação ao ambiente. Com isso, fenótipos multirresistentes têm surgido, apresentando alta resistência antifúngica intrínseca associada com polimorfismo no número e tamanho dos cromossomos que pode levar ao desenvolvimento de clones com genes de resistência antifúngica [2].

Pesquisas anteriores estudaram a extensão da suscetibilidade aos antifúngicos no gênero *Sporothrix* e encontraram variabilidade nas interações inter e intraespecíficas. Sabe-se que a resistência pode ocorrer por meio de aneuploidia cromossômica ou SNPs como em

*Candida spp.* ou *Cryptococcus spp.* Porém, até os dias atuais, estudos envolvendo o genoma de *Sporothrix* a fim de verificar aneuploidia ou variação em genes conhecidos, e que estejam correlacionados com a resistência antifúngica, ainda são desconhecidos [33].

O gênero *Sporothrix* apresenta uma diversidade de respostas *in vitro* aos principais agentes antifúngicos utilizados no tratamento da esporotricose. Testes de suscetibilidade a antifúngicos durante programas de vigilância epidemiológica podem ajudar a descobrir cepas supostamente multirresistentes de *Sporothrix*, melhorando a capacidade de ajustar regimes terapêuticos e reduzir as recidivas [21].

Casos refratários ao tratamento não estão obrigatoriamente associados à CIM elevada nem ao desenvolvimento de resistência *in vitro* ao longo do tratamento com o antifúngico. Por outro lado, a esporotricose causada por cepas tipo não selvagem, ou seja, com elevados valores de CIM, tendem a necessitar de maior tempo de tratamento e maiores doses de antifúngico do que as recomendadas na literatura [26].

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a suscetibilidade antifúngica *in vitro* e analisar as características fenotípicas de isolados de *Sporothrix spp.* obtidos de pacientes atendidos em um centro de referência em diagnóstico e tratamento de doenças dermatológicas no estado do Amazonas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Sporothrix spp.* aos antifúngicos itraconazol, posaconazol e terbinafina;
- b) Caracterizar fenotipicamente os isolados clínicos de *Sporothrix spp.* em relação as características morfológicas, fisiológicas e de atividade enzimática, associadas a fatores de virulência.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do estudo

Estudo descritivo analítico e transversal da suscetibilidade *in vitro* e características fenotípicas de isolados de *Sporothrix spp.* em um centro de referência em dermatologia de Manaus, Amazonas.

### 4.2 Universo do estudo

#### 4.2.1 Local de estudo

O estudo foi executado nos Laboratórios de Micologia e de Biologia Molecular da Fundação Hospitalar Alfredo da Matta - FUHAM, em parceria com o Laboratório de Micologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas - LABMICO/FCF/UFAM. A duração do estudo foi de dois anos, entre agosto de 2022 a agosto de 2024.

#### 4.2.2 Amostragem

No presente estudo foram incluídos 34 isolados fúngicos de pacientes com esporotricose, atendidos durante um período de 12 meses, os quais encontravam-se preservados no Laboratório de Micologia da FUHAM.

#### 4.2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos nesse trabalho isolados fúngicos que apresentaram crescimento, pureza e viabilidade satisfatórios para a execução dos bioensaios. Os isolados de cultura que tiveram crescimento escasso, apresentaram contaminação por outros microrganismos ou que na macromorfologia e micromorfologia não exibiram características sugestivas de *Sporothrix spp.*, foram excluídos.

### 4.3 Aspectos éticos

Esse estudo fez parte de um projeto mais amplo em desenvolvimento na Fundação Hospitalar Alfredo da Matta – FUHAM, intitulado “Enfrentando a esporotricose no Amazonas: do diagnóstico molecular à resistência medicamentosa”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FUHAM sob o parecer consubstanciado CAAE 70506823.9.0000.0002, o qual trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo, realizado durante um período de 36 meses envolvendo pacientes adultos com suspeita de esporotricose atendidos na FUHAM (ANEXO 1). Os pacientes incluídos no projeto receberam previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE antes da coleta, a fim de demonstrarem ciência da participação no estudo, assim como o Termo de Autorização de Imagem para a permissão do registro fotográfico das lesões com o objetivo de estudar e identificar os padrões clínicos.

### 4.4 Procedimentos analíticos

Os procedimentos analíticos realizados no estudo estão demonstrados de forma sucinta na **figura 2**, e descritos de forma detalhada a seguir.

#### 4.4.1 Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

Os isolados de *Sporothrix spp.* foram subcultivados em Ágar Batata Dextrose contido em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, a fim de se obter o crescimento satisfatório. Posteriormente, os mesmos foram submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*. A confirmação da espécie foi realizada com o apoio do Laboratório de Biologia Molecular da FUHAM por meio da técnica de PCR em tempo real.

## 4.4.2 Caracterização fenotípica

### 4.4.2.1 Análises morfo-fisiológicas

#### 4.4.2.1.1 Taxa de crescimento e análises morfológicas

O estudo da macromorfologia foi realizado a partir do subcultivo dos isolados clínicos em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose, as quais foram submetidas à análise da curva de crescimento por meio da medida diária do diâmetro da colônia, além de definir as suas características morfológicas e taxa de crescimento. A micromorfologia foi analisada empregando-se a técnica de microcultivo de Riddel (1950) [60] *apud* Lacaz *et al.* (2002) [61], onde foram observadas as características das estruturas fúngicas de cada isolado clínico.

#### 4.4.2.1.2 Termotolerância

O estudo da termotolerância verificou a habilidade de crescimento nas temperaturas de 30°C e 37°C, em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose, durante 21 dias de incubação, seguindo a metodologia de Mesa-Arango *et al.* (2002) [51]. Considerando a importância de padronização das colônias a serem mensuradas, o fragmento semeado foi de aproximadamente 1 mm de diâmetro e a verificação do tamanho da colônia resultante foi mensurado com auxílio de régua. Em seguida, a % inibição do crescimento (%GI) foi calculada seguindo a seguinte fórmula:

$$\%GI = \frac{D30 - D37}{D30} \times 100$$

Onde D30 e D37 são as medidas do diâmetro das colônias nas referidas temperaturas.

#### 4.4.2.1.3 *Produção de melanina*

Para o estudo da produção de melanina foram usadas placas com meio Ágar Batata Dextrose, incubadas a 25°C, onde foi observada a produção de melanina diariamente. Com 30 dias de incubação, foi definido o grau de melanização que consiste em: (-) se as colônias forem brancas, (+) se as colônias forem marrom-claras, (++) se as colônias forem marrom-escuras e (+++) se as colônias forem pretas [7].

#### 4.4.3 Ensaio de atividade enzimática

##### 4.4.3.1 *Catalase semiquantitativa*

Tubos de ensaio contendo o meio BHI foram inoculados com 200  $\mu$ L de suspensão de células da fase filamentosa de cada isolado clínico, correspondente a escala 0,5 McFarland. Em seguida 1 mL de uma mistura 1: 1 recém-preparada de 10% de Tween 80 e 30% de peróxido de hidrogênio P. A. foi adicionada aos tubos. As cepas foram classificadas como baixo ou alto produtor de catalase se o tamanho da coluna de bolhas, após cinco minutos, foi menor ou maior que 45 mm [62,7].

##### 4.4.3.2 *Produção de urease*

Para verificar a produção de urease, um inóculo de  $1 \times 10^6$  células da fase filamentosa foi inoculado em tubos contendo Ágar Ureia de Christensen, e estes foram incubados a 25°C e acompanhados por sete dias. Ao final desse período, as cepas foram classificadas em atividade negativa, baixa, moderada ou alta (**Figura 1**), seguindo a escala de intensificação da cor rosa do meio, que indica a atividade positiva de urease [63,44].



Fonte: Autor.

**Figura 1** - Escala de cores para definição da intensidade da produção de urease após sete dias de incubação. Da esquerda para direita: (*C. albicans* ATCC 40260), baixa, moderada e alta

#### 4.4.3.3 Atividade de fosfolipase

Para verificar a atividade de fosfolipase, o estudo baseou-se no trabalho de Price *et al.* (1982) [64], que utilizou ágar gema de ovo (2% de glicose, 1% de peptona, 0,5% extrato de levedura, 4% NaCl, 0,074% CaCl<sub>2</sub>, 8% gema de ovo orgânica, 1,5% de ágar). No centro da superfície do meio, 5 µl de suspensão de inóculo  $1 \times 10^6$  foram inoculados, e as placas incubadas a 25°C por sete dias. Amostras positivas devem apresentar halo de precipitação branco ao redor das colônias, correspondente a formação de complexo entre os íons cálcio e os ácidos graxos liberados após a ação da fosfolipase fúngica sobre os fosfolipídios presentes na gema do ovo. Para a mensuração da atividade enzimática, foi calculado o *Pz* que é a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia somada à zona do halo de atividade enzimática.

$$Pz = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{zona de clareamento}}$$

Foi atribuído um score qualitativo aos valores encontrados para as cepas, classificando-as como atividade enzimática negativa ( $Pz = 1$ ), moderada ( $0,63 < Pz < 1$ ) e acentuada ( $Pz < 0,63$ ). Segundo essa classificação, quanto menor o *Pz*, mais intensa será a atividade enzimática.

#### 4.4.3.4 Atividade hemolítica

Para avaliar a atividade hemolítica, o estudo baseou-se no trabalho de Cruz *et al.* (2021) [46], com algumas modificações, onde placas de Petri contendo meio ágar BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro foram inoculadas no centro da superfície do meio com 5 µl de suspensão de inóculo  $1 \times 10^6$ . As placas foram incubadas a 25°C durante sete dias. Amostras positivas apresentaram um halo translúcido, correspondente à degradação das hemácias, ao redor das colônias fúngicas. Para determinar a atividade enzimática, foi calculado o *Pz*, de acordo com Price *et al.* (1982) [64], como foi descrito para a atividade de fosfolipase.

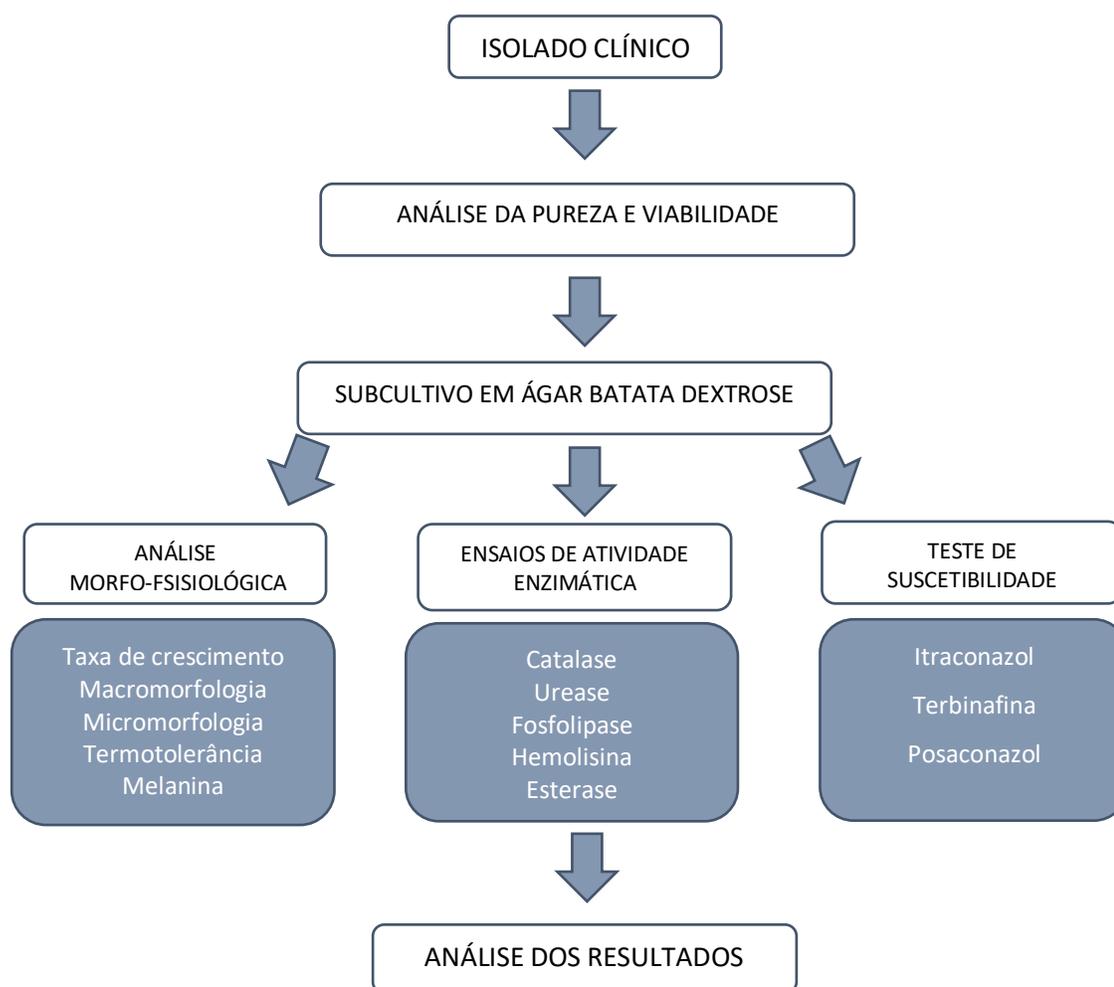
#### 4.4.3.5 Atividade de esterase

A fim de verificar a produção de esterases, foi utilizado o meio Ágar Tween, segundo metodologia proposta por Aktas *et al.* (2002) [65]. Placas de Petri foram inoculadas no centro da superfície do meio com 5 µl de suspensão de inóculo  $1 \times 10^6$ , e incubadas a 27°C por 7 dias. As cepas produtoras de esterases devem apresentar halo de precipitação ao redor da colônia, correspondente a formação de um complexo entre os íons cálcio e os ácidos graxos liberados após a ação da esterase fúngica sobre o polissorbatato. Para determinar a atividade enzimática, foi calculado o *Pz*, de acordo com Price *et al.* (1982) [64], como foi descrito para a atividade de fosfolipase.

#### 4.4.4 Suscetibilidade antifúngica

Para avaliar a atividade antifúngica *in vitro*, foi utilizada a técnica de “Microdiluição em Caldo para Fungos Filamentosos”, descrita no protocolo M38-A2 CLSI [57]. O inóculo foi obtido a partir do subcultivo em Ágar Batata Dextrose a 30 °C, por sete a dez dias. Foi preparada suspensão de esporos com 2 mL de solução salina estéril, a qual foi posteriormente ajustada afim de se obter densidade óptica (DO) entre 0,09–0,11 em 530 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro. Em seguida, uma alíquota da suspensão do inóculo

foi diluída em meio RPMI 1640 (1:50), com tampão MOPS, correspondente a duas vezes a concentração necessária para realização dos testes ( $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/ml). O teste foi realizado em duplicata, utilizando placas de 96 poços, as quais foram incubadas em estufa a 35°C e analisadas em 72h. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada considerando a menor concentração capaz de inibir entre 80-100% o crescimento fúngico quando comparados aos controles positivo e negativo.



Fonte: Autor

**Figura 2** - Fluxograma das atividades analíticas desenvolvidas a partir da coleta dos isolados clínicos

#### 4.4.5 Análise estatística

Foi elaborado um banco de dados no software Excel, onde foram inseridas informações clínicas dos pacientes e os resultados dos testes analíticos. A análise estatística foi efetuada por meio de estatística descritiva, com distribuições absolutas e percentuais.

## 5 RESULTADOS

Em uma breve análise dos dados clínico-epidemiológicos associados aos isolados fúngicos avaliados no presente estudo, verificou-se que a maioria foi obtida de pacientes procedentes do sexo feminino (n=26; 76,5%), com uma média de idade de aproximadamente 42 anos. O quadro clínico prevalente foi de esporotricose linfocutânea (n=29; 85,3%) acometendo principalmente os membros superiores e inferiores (n=13; n=12; 73,5%), e a maioria dos pacientes tiveram um tempo de tratamento até a cura em até 6 meses (n=16; 47,0%) (**Tabela 1**).

**Tabela 1** - Dados clínico-epidemiológicos dos pacientes que foram atendidos na FUHAM e dos quais foram obtidos os isolados clínicos de *Sporothrix. spp.*

VARIÁVEL	STATUS	n= 34
Sexo	Masculino	8 (23,5%)
	Feminino	26 (76,5%)
Idade	-	média 42,4
Forma clínica*	Cutânea-fixa	2 (5,9%)
	Cutânea - inoculação múltipla	2 (5,9%)
	Mucosa ocular	1 (2,9%)
	Linfocutânea	29 (85,3%)
Região anatômica acometida	Membros superiores	13 (38,2)
	Membros inferiores	12 (35,3)
	Membros sup. + inferiores	1 (2,9%)
	Membros sup. + face	1 (2,9%)
	Tronco	4 (11,8%)
	Face	3 (8,9%)
Tempo de tratamento até cura	até 6 meses	16 (47,0%)
	até 9 meses	4 (11,8%)

	Não respondeu ao tratamento	3 (8,9%)
	não retornou à consulta	3 (8,9%)
	não soube responder	8 (23,4%)

\*Classificação da forma clínica de acordo com Orofino-Costa *et al.*, 2022 <sup>26</sup>.

Todos os pacientes do estudo eram moradores de Manaus, a principal forma de transmissão da doença foi através do contato com felino (n=24; 70,6%), todos os pacientes fizeram o regime terapêutico com itraconazol e um paciente tinha histórico de HIV com terapia antirretroviral regular.

## 5.1 Caracterização fenotípica

### 5.1.1 Macromorfologia e Micromorfologia

A partir das análises macromorfológicas nas 34 cepas de *Sporothrix spp.*, foi possível definir seis grupos de isolados fúngicos que apresentaram características fenotípicas distintas, com 21 dias de desenvolvimento em Ágar Batata Dextrose. A descrição detalhada de cada fenótipo se encontra na **tabela 2** e a **figura 3** ilustra a macromorfologia dos fenótipos encontrados entre os 34 isolados fúngicos estudados. É importante salientar, que a cepa de n° **de registro 13**, foi excluída do estudo durante as análises de caracterização fenotípica, uma vez que a mesma apresentou pleomorfismo após a purificação do isolamento primário.

Com relação à micromorfologia dos fenótipos encontrados, não foram encontradas diferenças importantes nas características analisadas ao microscópio óptico, a partir do microcultivo de Riddel. Todos os isolados apresentaram estruturas típicas do gênero *Sporothrix*, como está ilustrado na **figura 4**, com hifas hialinas delgadas, conidióforos com esporulação do tipo simpodial (típico “margarida”) e conídios sésseis partindo de hifas primárias.

**Tabela 2 - Agrupamento das cepas de *Sporothrix spp.* de acordo com a caracterização fenotípica da macromorfologia e taxa de crescimento**

Fenótipo	Nº Reg.	Macromorfologia						Verso	
		Taxa de crescimento (21 dias)	Cor	Textura	Topografia	Centro	Borda	Cor	Topografia
1	(n=10) 01;09;11;15; 18;19; 21;22;25 e 30	Lenta (26 mm)	cinza claro a escuro (algumas mais esbranquiçadas no centro)	Lanosa; franjas aéreas	Colônia côncava; plana ou sulcos discretos	discreta elevação	regular; dupla: marrom/bege	bege a marrom (efeito degradê)	plana ou discretamente sulcada
2	(n=11) 02;03;04;05;23;28; 31;32;33;34;35	Lenta (19 mm)	esbranquiçada a marrom (centro e periferia mais escuros)	cotonosa/ seca e esfarelenta	rugosa	apiculado	marrom e bege/ regular	cinza escuro ou preta	rugosa
3	(n=05) 12;14;24;27 e 29	Lenta (26 mm)	branco-acastanhada	cotonosa	rugosa	elevada	cinza/marrom escura	acastanhado ou cinza escuro	rugosa
4	(n=3) 06;16 e 17	Rápida (34 mm)	branco-amarelada	glabrosa cremosa	plana ou pouco irregular	pouco elevado	-	branco-amarelado	plana
5	(n=3) 10; 20 e 26	Rápida (34 mm)	acastanhada com periferia branca	glabrosa membranosa	rugosa com centro e periferia plana	plano com franjas aéreas	franjas rasteiras	castanho claro periferia branca	rugosa
6	(n=2) 07 e 08	Rápida (38 mm)	cinza escuro a preta	cotonosa	Plana ou levemente sulcada	plano	borda grande preta	cinza escuro e periferia preta	plana/ discretamente rugosa



Fonte: Autor

**Figura 3 - Macromorfologia (anverso e verso) das colônias correspondentes aos fenótipos definidos para os 34 isolados de *Sporothrix spp.***

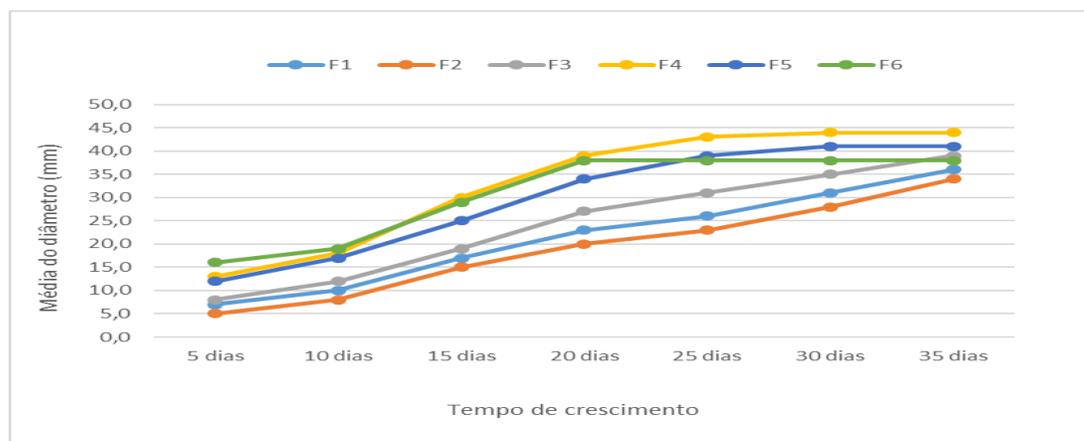


Fonte: Autor

**Figura 4** - Micromorfologia de *Sporothrix spp.* visualizada em aumento de 400x. Lâmina de microcultivo de Riddel corada com azul de lactofenol

### 5.1.2 Taxa de crescimento

A análise das curvas de crescimento dos isolados fúngicos está representada na **figura 5**, onde os mesmos foram agrupados de acordo com os tipos de colônias (fenótipos morfológicos).



**Figura 5** - Distribuição das médias das taxas de crescimento, em relação aos diferentes fenótipos de *Sporothrix spp.*

### 5.1.3 Produção de melanina

A partir da análise da produção de melanina foi possível encontrar um grau de melanização maior entre os fenótipos 6 e 2, que apresentaram colônias com coloração do anverso variando de marrom a cinza escuro ou preto e verso cinza escuro a preto, com score de intensidade de melanização entre duas cruzes (++) a três cruzes (+++) (**Tabela 3**).

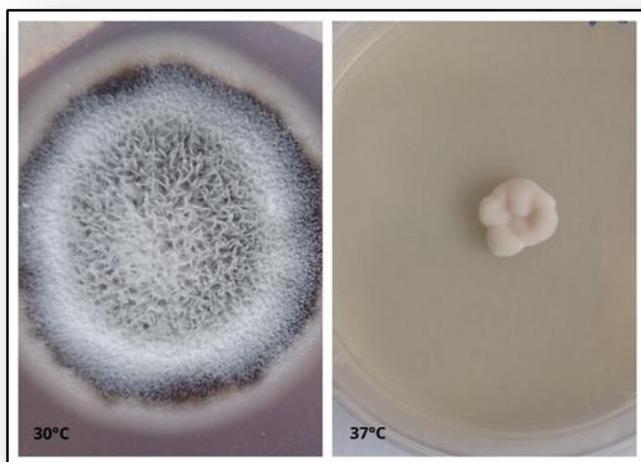
**Tabela 3** - Intensidade de melanização entre os 34 isolados de *Sporothrix spp.* com 30 dias de incubação em ágar batata-dextrose a 30°C, considerando os diferentes fenótipos morfológicos

		FENÓTIPOS										
		F1		F2		F3		F4		F5		F6
MELANINA	0		0	+	1	+	0		1	+	0	
	1	+	2	+	2	+	6	-	0	+	7	+++
	0		0	+	1	+	1		2		0	
	9	+	3	+	4	+	6	-	0	+	8	+++
	1		0	+	2	+	1		2			
	1	+	4	+	4	+	7	-	6	+		
	1		0	+	2	+						
	5	+	5	+	7	+						
	1		2	+	2	+						
	8	+	3	+	9	+						
	1		2	+								
	9	+	8	+								
	2		3	+								
1	+	1	+									
2		3	+									
2	+	2	+									
2		3	+									
5	+	3	+									
3		3	+									
0	+	4	+									
		3	+									
		5	+									
			+									

A cepa de nº de registro 13 foi excluída do estudo, como salientado anteriormente no tópico 5.1.1.

#### 5.1.4 Termotolerância

O estudo da termotolerância permitiu avaliar a capacidade de crescimento de *Sporothrix spp.* em temperaturas elevadas. A medida do diâmetro das colônias nas temperaturas de 30°C e 37°C mostra a capacidade de desenvolvimento do fungo sob diferentes condições que simulam de uma de suas principais características, que é o termodimorfismo, onde em temperatura ambiente se desenvolve sob a forma filamentosa e em temperatura corporal na forma de levedura (**Figura 6**).



Fonte: Autor.

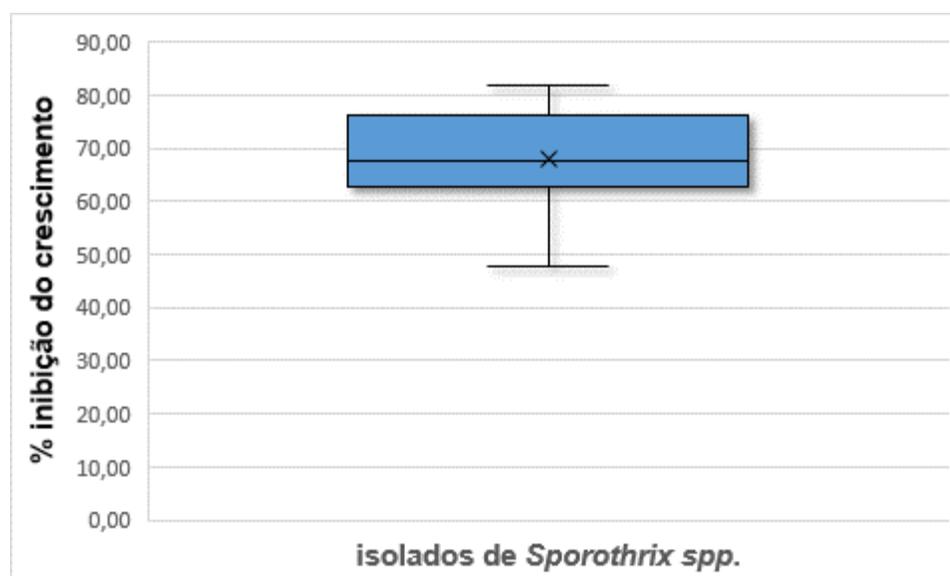
**Figura 6** - Cepa de *Sporothrix spp.* com 21 dias de incubação em ágar batata-dextrose, nas temperaturas de 30°C (esquerda) e 37°C (direita)

Os diâmetros das colônias foram medidos nas diferentes temperaturas e em diferentes dias, a fim de se analisar a capacidade do desenvolvimento fúngico em diferentes condições ambientais. Os resultados comprovam a capacidade de *Sporothrix spp.* em crescer em temperatura de 37°C, apresentando, no entanto, crescimento mais lento quando comparado com o crescimento em 30°C. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 4**.

**Tabela 4** - Diâmetro das colônias de *Sporothrix spp.* com 14 e 21 dias de desenvolvimento, nas temperaturas de 30°C e 37°C

Diâmetro das colônias (mm)			
14 dias		21 dias	
30°C	37°C	30°C	37°C
8 - 27 (média = 15,6)	4 - 8 (média = 6,5)	12 - 45 (média = 30,4)	5 - 11 (média = 7,7)

Os resultados de termotolerância foram avaliados a partir da porcentagem (%) do grau de inibição do crescimento na temperatura de 37°C e podem ser analisados na **figura 7**. De acordo com os resultados, a maioria dos isolados clínicos estudados apresentaram baixa termotolerância, a qual variou entre 47,6% a 81,8% de inibição do crescimento.

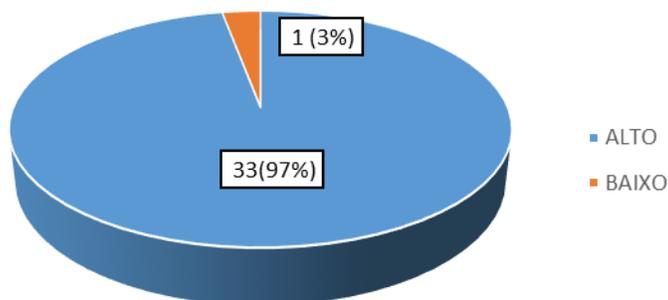


**Figura 7** - Termotolerância nos 34 isolados de *Sporothrix spp.*

#### 5.1.5 Atividade de Catalase

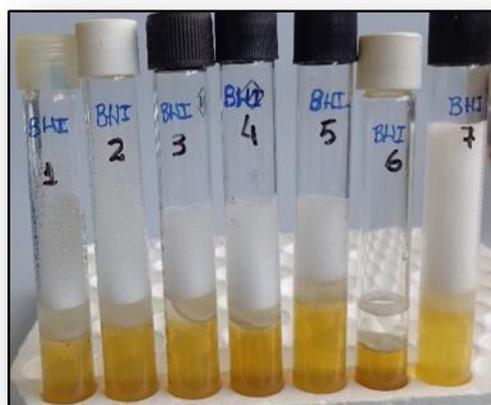
O estudo avaliou a capacidade dos isolados clínicos em produzir a enzima catalase, a qual possui importante papel na proteção ao fungo contra espécies reativas de oxigênio

(**Figura 9**). Conforme demonstrado na **figura 8**, os resultados mostraram que 33 (97%) isolados foram considerados como alto produtores, e apenas um isolado (3%) foi baixo produtor de catalase.



Fonte: Autor.

**Figura 8** - Frequência da produção de catalase nos 34 isolados de *Sporothrix spp.*



Fonte: Autor.

**Figura 9** - Demonstração do teste de produção de catalase para as cepas de *Sporothrix spp.*

#### 5.1.6 Atividade de Urease

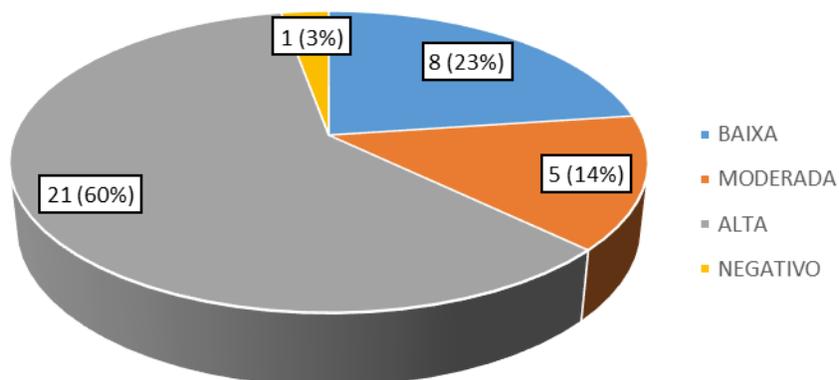
A capacidade de hidrolisar a ureia foi avaliada para os isolados clínicos no meio Ágar ureia de Christensen, em até sete dias. Conforme demonstrado na tabela 5 todos os isolados foram capazes de produzir essa enzima, à exceção de um único isolado. Diferenças na intensidade de cor produzida nos testes foram observadas apesar da padronização dos inóculos e das condições do teste. Assim, com base nos diferentes padrões de cor,

consideramos os isolados como fracos, moderados ou fortes produtores de urease (**Figura 11**) e os resultados dessa análise estão representados na **figura 10 e na tabela 5**. Dentre os 34 isolados clínicos, 21 (60%) apresentaram alta atividade, cinco (14%) moderada, oito (23%) baixa e um (3%) atividade negativa.



Fonte: Autor.

**Figura 10** - Demonstração do teste de produção de urease para as cepas de *Sporothrix spp.*



Fonte: Autor

**Figura 11** - Frequência da produção de urease nos 34 isolados de *Sporothrix spp.*

**Tabela 5 - Correlação dos fenótipos com a produção de urease**

FENÓTIPO	AMOSTRA	UREASE		
		BAIXA	MODERADA	FORTE
1	(n=10) 01	(60%)	(10%) X	(30%)
	09			X
	11	X		
	15	X		
	18	X		
	19	X		
	21			X
	22	X		
	25	X		
	30			X
2	(n=11) 02	(9%)	(36%) X	(54%)
	03		X	
	04			X
	05			X
	23			X
	28		X	
	31			X
	32			X
	33			X
	34		X	
	35	(-)		
3	(n=05) 12	(20%)	(40%) X	(40%)
	14		X	
	24			X
	27			X
	29	X		
4	(n=3) 06	(33,3%) X	(33,3%)	(33,3%)
	16			X
	17		X	
5	(n=3) 10			(100%) X
	20			X
	26			X
6	(n=2) 07			(100%) X
	08			X

### 5.1.7 Atividade de Fosfolipase

A atividade de fosfolipase foi avaliada com sete dias de incubação, e todos os 34 isolados clínicos foram considerados negativos para esta enzima (**Figura 12**).

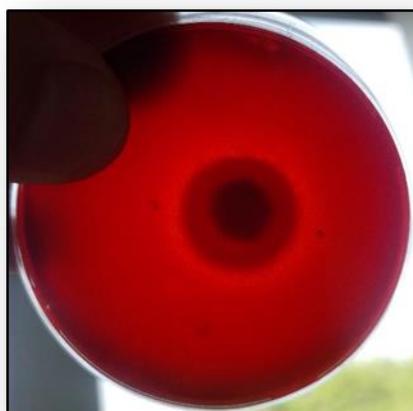


Fonte: Autor.

**Figura 12** - Demonstração do teste de produção de fosfolipase para as cepas de *Sporothrix spp.*

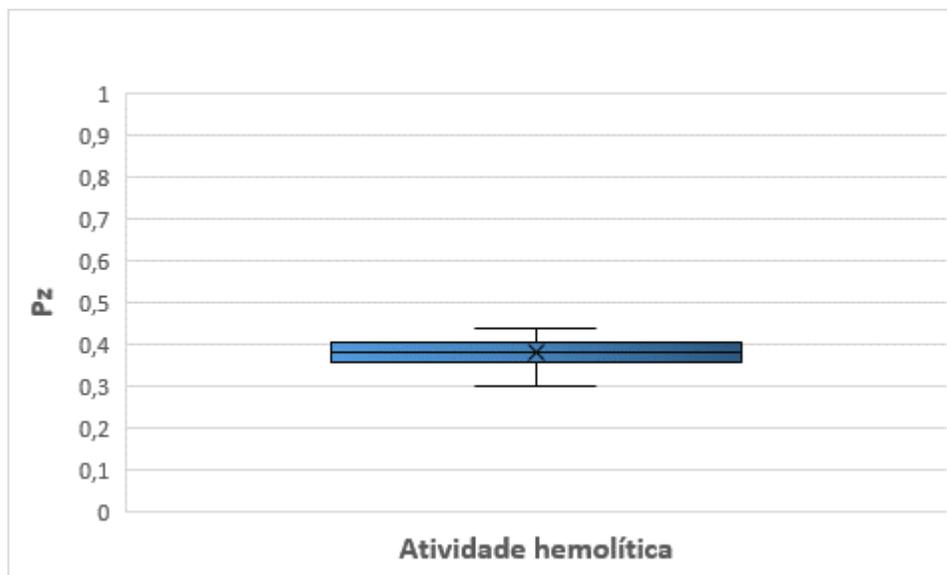
#### 5.1.8 Atividade hemolítica

A capacidade de produzir hemolisina foi avaliada para os 34 isolados clínicos (**Figura 13**), e os resultados estão demonstrados como valores de  $Pz$  (**Figura 14**). Os valores de  $Pz$  encontrados para a atividade hemolítica, variaram entre 0,30 a 0,44, mostrando que todos os isolados apresentaram atividade hemolítica acentuada ( $Pz < 0,63$ ).



Fonte: Autor.

**Figura 13** - Demonstração do teste de atividade hemolítica positiva com formação do halo translúcido ao redor da colônia de *Sporothrix spp.*



**Figura 14** - Atividade hemolítica nos 34 isolados de *Sporothrix spp.*

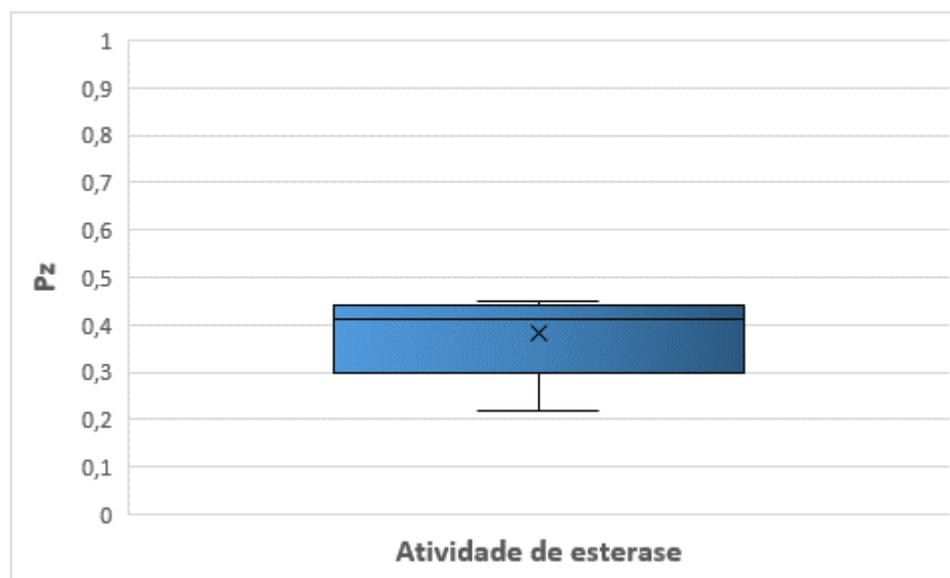
#### 5.1.9 Atividade de esterase

A produção de esterase foi avaliada nos 34 isolados clínicos (**Figura 15**), e os resultados estão demonstrados como valores de  $Pz$  na **figura 16**. Os valores de  $Pz$  encontrados para a atividade de esterase variaram entre 0,22 a 0,45, mostrando que todos os isolados apresentaram atividade de esterase acentuada ( $Pz < 0,63$ ).



Fonte: Autor.

**Figura 15** - Demonstração do teste de atividade de esterase positiva com formação do halo de precipitação ao redor da colônia de *Sporothrix spp.*



**Figura 16** - Atividade de esterase nos 34 isolados de *Sporothrix spp.*

## 5.2 Teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro*

Conforme demonstrado nas **tabelas 6 e 7**, os testes de suscetibilidade *in vitro* (**Figura 17**) frente aos antifúngicos azólicos revelaram CIM<sup>80-100</sup> entre 0,25µg/mL a 1 µg/mL para o

PCZ e de 0,25 µg/mL a 2 µg/mL para o ITZ. Para a TBN, o estudo encontrou um intervalo de CIM<sup>80-100</sup> entre 0,25 µg/mL a 1 µg/mL.

**Tabela 6** - Teste de suscetibilidade antifúngica in vitro dos 34 isolados clínicos de *Sporothrix spp.*

Nº REGISTRO AMOSTRA	Concentração Inibitória Mínima - CIM ( 80-100% inibição)		
	ITZ µg/mL	TRB µg/mL	PCZ µg/mL
1	2	0,25	1
2	1	0,5	1
3	0,25	0,25	0,25
4	0,5	0,25	0,5
5	1	0,5	0,5
6	0,5	1	0,25
7	1	0,5	0,5
8	0,5	1	0,25
9	0,5	0,5	0,5
10	1	1	0,25
11	0,5	0,25	0,25
12	0,25	0,5	0,5
14	0,25	1	1
15	0,25	1	1
16	0,5	0,5	0,5
17	0,5	0,25	0,25
18	0,25	1	1
19	0,5	0,25	0,25
20	0,25	0,5	1
21	0,5	0,5	1
22	0,5	0,25	1
23	0,5	0,25	0,25
24	0,5	1	0,25
25	1	1	1
26	0,5	0,25	0,5
27	0,5	0,5	0,25
28	0,5	0,5	1
29	0,5	1	0,5
30	0,25	0,5	0,25
31	0,5	0,5	0,5
32	0,5	1	0,5
33	0,5	0,25	1

34	0,5	0,25	1
35	0,5	0,5	0,25

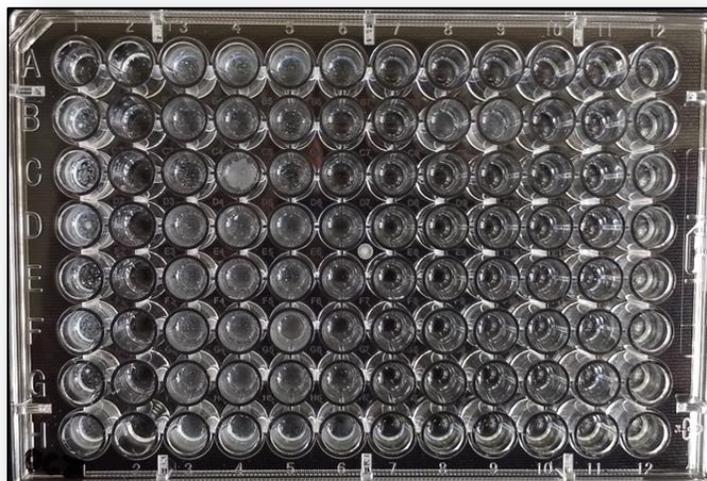
ITZ = Itraconazol; TRB = Terbinafina; PCZ = Posaconazol;

A cepa de n° de registro 13 foi excluída do estudo, como salientado anteriormente no tópico 5.1.1.

**Tabela 7** – Distribuição dos isolados clínicos de *Sporothrix spp.*, de acordo com a concentração inibitória mínima encontrada para cada antifúngico no teste de suscetibilidade *in vitro*.

Antifúngicos	0,0625 µg/mL	0,125 µg/mL	0,25 µg/mL	FR %	0,5 µg/mL	FR %	1 µg/mL	FR %	2 µg/mL	FR %	4 µg/mL	8 µg/mL	16 µg/mL	32 µg/mL
<b>ITZ</b>			7	20,6	21	61,8	5	14,7	1	2,9				
<b>TBN</b>			11	32,4	13	38,2	10	29,4						
<b>PCZ</b>			12	35,3	10	29,4	12	35,3						

FR% = Frequência Relativa; ITZ = Itraconazol; TRB = Terbinafina; PCZ = Posaconazol.



Fonte: Autor.

**Figura 17** – Teste de suscetibilidade aos antifúngicos (TSA) em placa de 96 poços. Colunas 1-2 com os controles positivo e negativo, respectivamente, e colunas 3-12 com as diluições dos antifúngicos nas concentrações de 0,003 a 32 µg/ml

## 6 PRODUTO

Como produto, foram elaborados protocolos operacionais padrão (POP's) para testes de caracterização fenotípica do gênero *Sporothrix spp.*, os quais servirão como ferramentas úteis para futuras investigações científicas e análises laboratoriais envolvendo esse importante patógeno fúngico, e que poderão ser implementadas no Laboratório de Micologia da FUHAM (ANEXO 2). Além disso, um artigo científico derivado dos resultados do presente trabalho está em fase de elaboração, para posterior submissão na revista indexada "*Emerging Infectious Diseases*".

## 7 DISCUSSÃO

A literatura revela que a expansão da esporotricose no Brasil ocasionada por *S. brasiliensis*, muito se deve à participação do gato na cadeia de transmissão da doença. O animal por ter hábitos domésticos é facilmente transportado para outras localidades, e uma vez que estão infectados com esporotricose, acabam transmitindo para humanos e outros animais em regiões até então consideradas não endêmicas para a doença [9].

Assim, a exportação da esporotricose por *S. brasiliensis* de áreas endêmicas do sudeste e sul do Brasil para regiões mais distantes e até mesmo mais isoladas, através do traslado de algum felino infectado, é a explicação mais provável para a chegada e consequente disseminação da doença em Manaus, cujos primeiros relatos surgiram exclusivamente da zona oeste da cidade. Atualmente a doença já foi notificada em todas as zonas da cidade e até mesmo em outras cidades do interior do estado [36].

O perfil epidemiológico encontrado no presente estudo apontou para uma maior prevalência da doença em mulheres (76,5%), em comparação com o gênero masculino, sendo a média de idade de aproximadamente 42 anos. O padrão clínico mais encontrado foi o linfocutâneo (85,3%) e os membros superiores (38,2%) foram a região anatômica mais acometida. Quanto ao tempo de tratamento até a cura clínica, a maior parte dos pacientes (47%) conseguiram a remissão das lesões em até seis meses e todos usaram o regime terapêutico com ITZ (**Tabela 1**).

Um perfil clínico-epidemiológico semelhante foi relatado por Almeida-Paes *et al.* (2014) [59] ao estudar casos de esporotricose associados a formas clínicas atípicas no estado do Rio de Janeiro. Nesse estudo, de um total de 50 pacientes, 34 (68%) pertenciam ao sexo feminino e a média de idade encontrada foi de 47 anos. De acordo como os autores, o local das lesões mais frequentemente encontrado foram os membros superiores (31,6%) e a forma clínica mais presente foi a linfocutânea (48%). Nesse mesmo estudo foi relatado que mais de 35 pacientes (82,9%) tiveram regressão das lesões com menos de seis meses de tratamento com itraconazol.

Todos os pacientes incluídos no presente estudo eram moradores da cidade de Manaus, e a principal forma de transmissão relatada foi o contato com o felino infectado (70,6%). O surto de esporotricose no Amazonas tem como epicentro, a cidade de Manaus,

conforme comprovado por meio dos dados oficiais da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas [36] e de um estudo recente [37], os quais demonstraram o grande aumento de casos na capital amazonense, entre os anos de 2020 a 2023, que tem o gato como principal propagador da doença.

A cidade de Manaus tem uma população superior a 2 milhões de habitantes, e apresenta um grande fluxo de comunicação com países vizinhos como Peru, Colômbia, Venezuela e alguns países do Caribe. Isso pode implicar para a consequente propagação da epidemia da esporotricose, por meio do traslado intercontinental, para estas regiões vizinhas, considerando a maneira como a doença se espalhou entre as metrópoles densamente povoadas no Brasil [37].

A diferenciação das espécies clínicas de *Sporothrix* por meio das características morfofisiológicas tem dividido opiniões entre autores da literatura, uma vez que tem gerado resultados discordantes em relação à análises mais sensíveis da biologia molecular. Por isso, estudos sugerem que tais análises sejam executadas em associação com técnicas moleculares para a identificação taxômica em nível de espécie [66].

Conforme mencionado, o presente estudo fez parte de um estudo mais amplo sobre a esporotricose em uma unidade de referência em dermatologia no Amazonas, no qual foram realizadas análises genotípicas dos isolados de *Sporothrix spp.*, empregando-se a técnica de PCR em tempo real, com o intuito de identificar a espécie circulante na região. Os resultados obtidos confirmaram a espécie *S. brasiliensis* como o único agente isolado dos casos de esporotricose envolvidos nesta pesquisa e foram recentemente submetidos para publicação pelo nosso grupo de pesquisa no trabalho de Mesquita *et al.* (2024) [37].

Isso confirma o predomínio dessa espécie no estado do Amazonas, seguindo o mesmo padrão etiológico observado nos demais surtos epidêmicos ocorridos no Brasil nas últimas décadas [14,22,30,60, 66]. Além disso, demonstra a propagação da doença para todo o território brasileiro e a necessidade de ações mais eficazes para o controle dos surtos epidêmicos associados ao *S. brasiliensis* nas diversas regiões do país.

Em relação à suscetibilidade *in vitro* dos isolados fúngicos frente aos três fármacos testados, maior atividade antifúngica foi evidenciada com o emprego do ITZ, o qual revelou  $CIM^{80-100} < 1 \mu\text{g/mL}$  para mais de 80% dos isolados. Por outro lado, os testes com PCZ e TBN, apesar de terem demonstrado alta atividade sobre a maioria dos isolados, a atividade

antifúngica dessas drogas foi considerada moderada para 29,4% e 35,3% dos isolados, respectivamente, com CIM<sup>80-100</sup> de 1 µg/mL.

Muito embora os pontos de corte para os testes de suscetibilidade não tenham sido estabelecidos para o complexo *S. schenckii*, o documento M38-A2 (CLSI, 2008) [57] considera uma MIC ≥ 4,0 µg/mL para o itraconazol como resistência ao antifúngico. Grande parte dos estudos realizados com cepas de *S. brasiliensis* no Brasil apontam para uma atividade moderada a alta dos derivados triazólicos incluindo ITZ e PCZ, entretanto, cepas com fraca suscetibilidade ou resistentes, com CIM >4 ou até mesmo >16 µg/mL são também eventualmente relatadas para essas drogas [67,68,5].

A TBN é considerada um medicamento de segunda escolha para o tratamento da esporotricose e alguns estudos demonstraram bons resultados *in vitro* com essa droga. Fichman *et al.* (2022) [67] ao testar 46 isolados clínicos de pacientes diagnosticados com esporotricose severa, verificaram que a TBN apresentou geralmente alta atividade antifúngica, com CIM variando entre 0,03 a 1 µg/mL, até mesmo superando os triazóis. Em outro estudo, realizado por Sanchotene *et al.* (2017) [68] a TBN foi a droga com melhor atividade *in vitro*, em comparação com ITZ e anfotericina B (AMB), em que alguns isolados apresentaram CIM >4 µg/mL para essas últimas drogas, e mais de 50% dos isolados de *S. brasiliensis* (n=35) apresentaram valores de CIM variando de 0,25 a 0,50 µg/mL para a TBN. No presente estudo, os isolados analisados apresentaram suscetibilidade à TBN até a CIM<sup>80-100</sup> de 1 µg/mL, em concordância com os valores encontrados pelos estudos anteriormente citados.

De acordo com alguns autores, a diversidade de respostas *in vitro* aos principais antifúngicos empregados na rotina reflete a alta diversidade genética exibida pelo gênero *Sporothrix*. Rodrigues *et al.* (2014) [21] defendem a realização de estudos com abordagem da diversidade genética entre espécies clínicas de *Sporothrix*, a qual permitiria o reconhecimento de cepas geneticamente desviantes em uma população e a possível correlação entre os haplótipos e a suscetibilidade aos antifúngicos. Segundo os autores pode-se esperar que uma população geneticamente homogênea tenha perfis de suscetibilidade semelhantes entre os indivíduos, mas o aumento da aptidão durante a expansão populacional pode resultar em uma diversidade de perfis de suscetibilidade.

Estudos de caracterização fenotípica demonstraram que algumas características fisiológicas como taxa de crescimento, termotolerância e assimilação de açúcares, podem ser

úteis na diferenciação de espécies morfológicamente semelhantes do clado clínico do complexo *Sporothrix*. Em relação à taxa de crescimento, estudos evidenciaram maior taxa de crescimento por cepas ambientais quando comparadas à cepas de origem clínica. Colônias de *S. mexicana* e *S. pallida*, espécies ambientais ocasionalmente relacionadas a quadros clínicos, apresentam diâmetro de colônia superior a 50 mm, quando cultivadas a 30°C [44].

Em nosso estudo foi possível observar uma taxa de crescimento lenta, em que a média do diâmetro das colônias filamentosas foi em torno de 30 mm após 21 dias em temperatura ambiente (**Tabela 4**), o que está de acordo com o que foi demonstrado em outros estudos com cepas de *Sporothrix* de origem clínica [44]. Ao se analisar a taxa de crescimento em relação aos diferentes padrões ou fenótipos morfológicos encontrados neste estudo é possível verificar que, apesar de todos os isolados serem considerados de crescimento lento, alguns padrões ou tipos de colônias tem crescimento mais rápido do que outras (**Figura 5**).

Fungos do complexo *Sporothrix* expressam alguns fatores de virulência que favorecem ou possibilitam a sua adaptação e o seu desenvolvimento no hospedeiro humano e animal, garantindo o sucesso da infecção, tais como: termodimorfismo e termotolerância; a produção de melanina; a presença de adesinas; enzimas extracelulares; ácido siálico, e alguns componentes presentes na sua parede celular [47,48].

Os fatores de virulência intrinsecamente relacionados às espécies de *Sporothrix* podem justificar em parte a epidemia que vivenciamos atualmente. Estudo comparativo sobre a patogenicidade de cinco espécies que compõem o complexo *Sporothrix*, em modelo murino, destacou a maior virulência de *S. brasiliensis*, sendo a única a apresentar taxas de mortalidade com baixa carga de inóculo infectante ( $2 \times 10^4$  conídios/animal). Além disso, comprovou-se que essa espécie provoca maior dano tecidual e apresenta a maior carga microbiana nas lesões, fato diretamente relacionado a sua maior transmissibilidade [69].

Nas espécies de *Sporothrix*, a produção de melanina é uma característica fenotípica marcante, e muito embora ainda não se tenha muita clareza sobre o papel que a mesma exerce na relação do complexo *Sporothrix* com o hospedeiro infectado, estudos apontam para a importância da mesma na virulência de diversos fungos patogênicos, podendo estar associada à uma maior proteção contra agentes oxidativos; inibição da resposta imune celular; interferência na ativação do sistema complemento, e redução da susceptibilidade aos antifúngicos [70,71]. A piomelanina, eumelanina e DHN-melanina são os três tipos de

melanina que podem ser produzidos por espécies *Sporothrix*, sendo o último tipo o mais abundante [52].

A variabilidade na produção *in vitro* da melanina varia de acordo com os suplementos e os substratos utilizados em meio de cultura. Autores demonstraram que o acréscimo de glicose resultou em aumento na produção deste pigmento para o gênero *Sporothrix* [45].

No presente estudo foi realizada análise qualitativa da produção de melanina a partir da observação das colônias fúngicas crescidas em meio Ágar Batata Dextrose contido em placa de Petri, após um período de 21 dias. Para essa análise foi utilizado o score descrito por Almeida-Paes *et al.* (2015) [7], considerando também a melanização no verso da colônia. Os resultados estão demonstrados na **Tabela 3** onde se observa que os diferentes fenótipos macromorfológicos exibiram intensidade de melanização diferenciadas, muito embora pequena variação dentro de um mesmo fenótipo tenha sido observada, especialmente no fenótipo 2. Os fenótipos 6 e 2 destacaram-se como maior intensidade de melanização, enquanto que o fenótipo 4 foi considerado negativo de acordo com os critérios de Almeida-Paes *et al.* (2015) [7].

Almeida-Paes *et al.* (2015) [7] estudou algumas características fenotípicas associadas com fatores de virulência no complexo *Sporothrix*, e, com relação à produção de melanina, o autor demonstrou que a espécie *S. brasiliensis* possui maior capacidade de produzir o pigmento escuro em diferentes meios de cultura, e em menor tempo, quando comparado ao *S. schenckii* s.s. Ao correlacionar os dados clínicos dos pacientes, os autores ainda mostraram que a frequência de cepas melanizadas oriundas de pacientes com regressão espontânea da esporotricose teve maior significância ( $P = 0,0015$ ) em relação as cepas melanizadas de pacientes que necessitaram do tratamento antifúngico. Todas as cepas que foram incapazes de produzir melanina de forma visível, foram isoladas de pacientes com a forma cutânea da esporotricose, o que mostra que as cepas que produziram colônias até o menor grau de melanização pertenciam a sítios mais profundos.

O termodimorfismo, outra importante característica, é a capacidade do fungo de modificar a morfologia de acordo com o substrato e temperatura em que se encontram, sendo comum a fungos patogênicos tais como *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Talaromyces marneffe* e os membros do complexo *Sporothrix schenckii*. Tais patógenos apresentam-se na forma filamentosa

quando dispersos no ambiente, modificando sua morfologia para a forma leveduriforme quando infecta o hospedeiro [49].

Trata-se de uma morfogênese do fungo relacionada à temperatura, sendo descrita como um importante fator de virulência, o qual permite ao fungo filamentosu suportar a temperatura corporal de aproximadamente 37°C e transformar-se para a forma de levedura. Caso não possua tal resistência, o fungo se restringe à pele, e não é capaz de ocasionar efeitos cutâneos [50]. Nos ensaios *in vitro*, a avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%GI) a 37°C é ferramenta útil para demonstrar a propriedade de termotolerância dos fungos termodimórficos. Assim, quanto menor o grau de inibição do crescimento, maior será a termotolerância [39].

Os resultados do estudo mostraram que os isolados foram capazes de crescer a 37°C, porém com taxa de crescimento lenta (**Tabela 4**), e a maioria apresentou baixa termotolerância (%GI < 50) (**Figura 7**), algo já relatado em outros trabalhos sobre essa característica no gênero *Sporothrix*, que apresenta variações entre os valores de %GI não somente para as cepas que circulam no Brasil [7,19,44,46], como também em cepas circulantes em países da América Latina onde predomina padrão clínico diferente [51].

Muitos estudos têm demonstrado a habilidade dos fungos em produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases e entre outras, que representam ferramentas para identificar microrganismos e promover entendimento da relação entre a produção de enzimas e a patogenicidade. Muitas dessas enzimas estão associadas com fatores de virulência necessários para o desenvolvimento da esporotricose [48].

Almeida-Paes *et al.* (2015) [7] ao analisar um total de 72 isolados verificaram que todos foram alto produtores dessa enzima, com formação de bolha de forma imediata; 13 isolados de *S. brasiliensis* foram capazes de degradar a azoalbumina; nenhum isolado foi capaz de liquefazer a gelatina e houve variação entre os isolados na produção de urease. Os autores ainda fizeram a correlação desses achados com os dados clínicos dos pacientes e mostraram que a maioria dos isolados clínicos com atividade de proteases positiva e também com menores valores de *Pz* foram oriundas de pacientes com a coinfeção HIV, e que a atividade de urease foi maior entre os pacientes com regressão espontânea da doença comparado ao grupo em uso do tratamento.

Cruz *et al.* (2021) [46] em estudo sobre a evolução da virulência relacionada com fenótipos de *S. brasiliensis* isolados de pacientes com esporotricose crônica e aids, também mostra resultados para a produção de enzimas hidrolíticas na espécie em questão. Entre os 16 isolados clínicos estudados, todos apresentaram alta termotolerância (%GI < 50), 14 foram positivos para protease aspártica, 11 para atividade hemolítica, 11 para esterase, 15 para urease e em nenhum deles foi possível detectar atividade de fosfolipase. Os autores também demonstraram que isolados clínicos da forma cutânea produziram mais esterase que aqueles de sítios profundos, e as cepas com as mais altas termotolerâncias no estudo também foram provenientes destes locais anatômicos.

Fernandes *et al.* (2009) [19] estudou as características fenotípicas de 151 isolados do complexo *Sporothrix* de diferentes regiões do Brasil. Nos testes de produção enzimática os autores encontram atividade de urease e Dnase para todos os isolados, atividade de gelatinase em apenas 3 isolados, atividade de proteinases para 5 isolados e atividade de caseinases para 4 isolados. Além disso, dentre os isolados estudados, 3 cepas pertenciam à região Norte (1 do estado do Amazonas e 2 do Pará), e uma delas apresentou boa performance no testes enzimáticos realizados.

No presente estudo, não foi possível detectar atividade enzimática de fosfolipase entre os isolados clínicos analisados, o que pode estar relacionado com a própria metodologia abordada para avaliar essa atividade enzimática, assim como ocorreu com outros autores [46].

Em relação à produção de urease das cepas analisadas no presente estudo, os resultados revelaram que todos os isolados foram capazes de produzir essa enzima, à exceção de um único isolado (**Tabela 5**). Apesar de ter sido feita uma análise apenas qualitativa, percebeu-se diferenças na intensidade de cor produzida nos testes, as quais variaram entre três tons visivelmente diferenciados, apesar da padronização dos inóculos e das condições do teste (**Figura 10**). Assim, com base nos diferentes padrões de cor, consideramos os isolados como fracos, moderados ou fortes produtores de uréase (**Figura 11**).

Ao analisar os padrões de cores na produção de urease em relação aos diferentes fenótipos macromorfológicos demonstrados na (**Tabela 5**) observamos uma possível correlação, o que corrobora com estudos anteriores que sugerem que a expressão de urease em meio de cultivo específico é isolado-dependente [72]. Destaca-se, no entanto, que de

acordo com as nossas análises a produção da enzima possivelmente variou de acordo com o fenótipo macromorfológico do isolado fúngico, o que merece uma análise futura empregando-se técnicas que permitam análise quantitativa para a confirmação desse achado.

Outros trabalhos também demonstraram a atividade de urease entre isolados de *Sporothrix* [7, 19, 46]. Alguns desses trabalhos mostram que a detecção de urease foi maior entre isolados clínicos provenientes de pacientes com regressão espontânea da esporotricose comparada aos isolados de pacientes em regime terapêutico [7]. No entanto, são necessários mais estudos para um maior entendimento do papel dessa enzima na infecção por fungos do complexo *Sporothrix spp.* O papel dessa enzima também foi destacado para outros fungos patogênicos, como *Coccidioides posadasii* e *Cryptococcus neoformans*, onde a mesma está envolvida na virulência destes fungos, promovendo maior dano tecidual, exacerbação da infecção e transmigração sistêmica [7].

Em relação aos demais ensaios de atividade enzimática, verificou-se que todos os isolados apresentaram-se positivos ( $Pz < 0,63$ ) para as atividades hemolítica e de esterase. Esses resultados estão de acordo com estudos anteriores, que já tinham evidenciado a produção dessas enzimas nas espécies do complexo *Sporothrix*. A maior atividade de esterase está relacionada à preferência pelo metabolismo de ácidos graxos de cadeia curta, e foi associada à ocorrência da forma clínica cutânea. Elevados níveis de urease associados com atividade hemolítica também mostraram significância na patogenicidade da esporotricose, relacionando-se com a ocorrência de elevadas CIM para alguns antifúngicos em *S. brasiliensis* [46].

Estudos também demonstraram que enzimas antioxidantes como catalases e superóxido dismutases protegem os fungos contra o ambiente de estresse oxidativo ocasionado pela ação de drogas antifúngicas. Foi evidenciado que isoformas da enzima catalase em *S. schenckii* s.s. são capazes de regular a homeostasia de espécies reativas de oxigênio (ROS) na interação fungo-hospedeiro [73]. Nossos resultados, assim como em outros trabalhos da literatura [7], mostraram alta atividade dessa enzima em cepas de *S. brasiliensis* (97%) (**Figuras 8 e 9**), e podem evidenciar a presença marcante dessa enzima nos isolados clínicos estudados.

Ressalta-se a importância da realização de estudos iniciais em locais do Brasil, que tiveram a preocupação em analisar as características fenotípicas associadas a fatores de

virulência no complexo *Sporothrix*, com o intuito de elucidar a patogenia das cepas circulantes. Muitos desses fatores mostraram-se mais expressivos para a espécie *S. brasiliensis*, a mesma responsável pelo surto da esporotricose em Manaus. Baseando-se nesses trabalhos, decidiu-se estudar tais fatores de virulência, uma vez que possuem relevância para a melhor compreensão da inter-relação patógeno-hospedeiro.

## CONCLUSÃO

A concordância dos dados obtidos no presente estudo com outros trabalhos realizados com isolados de esporotricose humana por *S. brasiliensis*, reforça que as metodologias empregadas se constituem em ferramentas úteis para melhor caracterização fenotípica e monitoramento da ocorrência da resistência aos antifúngicos, além de estarem validadas na literatura por outros autores que já estudam as características do complexo *Sporothrix* há mais de duas décadas.

Dada a importância da disseminação da espécie *S. brasiliensis* nos diversos surtos de esporotricose no país, nosso estudo contribuiu para o conhecimento das características fenotípicas e do perfil de suscetibilidade a três drogas antifúngicas, em isolados clínicos de pacientes oriundos de um centro de referência em diagnóstico e tratamento de doenças dermatológicas no Amazonas, onde há o predomínio da mesma espécie, como já foi demonstrado.

A esporotricose no estado do Amazonas possui caráter emergente com importante aumento no número de casos confirmados a cada ano que passa, e muitos estudos ainda serão desenvolvidos a fim de caracterizar as cepas circulantes. É importante que se aprimore cada vez mais as metodologias abordadas, baseando-se nos estudos realizados nos surtos de esporotricose em outras regiões do Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Chakrabarti, A., Bonifaz, A., Gutierrez-Galhardo, M. C., Mochizuki, T., & Li, S. Global epidemiology of sporotrichosis. *Sabouraudia*. 2014; 53(1): 3-14.
2. Rodrigues, A. M., Bagagli, E., de Camargo, Z. P., & de Moraes Gimenes Bosco, S. *Sporothrix schenckii* sensu stricto isolated from soil in an armadillo's burrow. *Mycopathologia*. 2014; 177, 199-206.
3. Barros, M. B. D. L., de Almeida Paes, R., & Schubach, A. O. *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical microbiology reviews*. 2011; 24(4), 633-654.
4. Orofino-Costa, R., Macedo, P. M. D., Rodrigues, A. M., & Bernardes-Engemann, A. R. Sporotrichosis: an update on epidemiology, etiopathogenesis, laboratory and clinical therapeutics. *Anais brasileiros de dermatologia*. 2017; 92, 606-620.
5. Espinel-Ingroff, A., Abreu, D. P. B., Almeida-Paes, R., Brilhante, R. S. N., Chakrabarti, A., Chowdhary, A., Turnidge, J. Multicenter, international study of MIC/MEC distributions for definition of epidemiological cutoff values for *Sporothrix* species identified by molecular methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017; 61(10), 10-1128.
6. Waller, S. B., Dalla Lana, D. F., Quatrin, P. M., Ferreira, M. R. A., Fuentesfria, A. M., & Mezzari, A. Antifungal resistance on *Sporothrix* species: an overview. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2021; 52, 73-80.
7. Almeida-Paes, R., De Oliveira, L. C., Oliveira, M. M. E., Gutierrez-Galhardo, M. C., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2015). Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *BioMed research international*. 2015; v2015.
8. De Carvalho, J. A., Beale, M. A., Hagen, F., Fisher, M. C., Kano, R., Bonifaz, A., Rodrigues, A. M. Trends in the molecular epidemiology and population genetics of emerging *Sporothrix* species. *Studies in mycology*. 2021; 100, 100129.
9. Rodrigues, A. M., Gonçalves, S. S., de Carvalho, J. A., Borba-Santos, L. P., Rozental, S., & Camargo, Z. P. D. Current progress on epidemiology, diagnosis, and treatment of sporotrichosis and their future trends. *Journal of Fungi*. 2022; 8(8), 776.
10. Marques, S. A., Franco, S. R. V. S., Camargo, R. M. P., Dias, L. D. F., Haddad-Júnior, V., Fabris, V. E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1993; 35:327-30.

11. Madrid, I. M., Mattei, A., Martins, A., Nobre, M., Meireles, M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. *Zoonoses Public Health*. 2010; 57:151-4.
12. De Lima Barros, M. B., Schubach, T. M., Galhardo, M. C., De Oliveira Schubach, A., Monteiro, P. C., Reis, R. S., et al. Sporotrichosis: an emergent zoonosis in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001; 96:777-9
13. De Oliveira Bento, A., De Sena Costa, A. S., Lima, S. L., Do Monte Alves, M., De Azevedo Melo, A. S.; Rodrigues, A. M. et al. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the northeast region. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021; 15: pp. e0009693
14. Rodrigues, A. M., Della Terra, P. P., Gremiao, I. D., Pereira, S. A., Orofino-Costa, R., De Camargo, Z. P. The threat of emerging and re-emerging pathogenic *Sporothrix* species. *Mycopathologia*. 2020; 185, 813–842.
15. Marimon, R., Gené, J., Cano, J., Trilles, L., Dos Santos Lazéra, M., Guarro, J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. *J. Clin. Microbiol*. 2006; 44: 3251–3256.
16. De Beer, Z. W., Duong, T. A., & Wingfield, M. J. The divorce of *Sporothrix* and *Ophiostoma*: solution to a problematic relationship. *Studies in mycology*. 2016; 83(1), 165-191
17. Rodrigues, A. M., Cruz Choappa, R., Fernandes, G. F., De Hoog, G. S., Camargo, Z. P. *Sporothrix chilensis* sp. nov. (Ascomycota: Ophiostomatales), a soil-borne agent of human sporotrichosis with mild-pathogenic potential to mammals. *Fungal Biol*. 2016; 120: 246–264.
18. Gremião, I. D. F., Miranda, L. H. M., Reis, E. G., Rodrigues, A. M., & Pereira, S. A. Zoonotic epidemic of sporotrichosis: cat to human transmission. *PLoS pathogens*. 2017; 13(1), 1006077.
19. Fernandes, G.F.; dos Santos, P.O.; Amaral, C.C.; Sasaki, A.A.; Godoy-Martinez, P.; Camargo, Z.P.d. Characteristics of 151 Brazilian *Sporothrix schenckii* isolates from 5 different geographic regions of Brazil: A forgotten and re-emergent pathogen. *Open Mycol. J*. 2009; 3: 48–58.
20. Sil, A., & Andrianopoulos, A. Thermally dimorphic human fungal pathogens - Polyphyletic pathogens with a convergent pathogenicity trait. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015; 5(8).
21. Rodrigues, A. M., de Hoog, G. S., de Cássia Pires, D., Brihante, R. S. N., da Costa Sidrim, J. J., Gadelha, M. F., ... & de Camargo, Z. P. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. *BMC infectious diseases*. 2014; 14: 1-9.

22. Larsson, C. E. Esporotricose. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2011; v. 48, n. 3, p. 250-259.
23. Schubach, T. M.; Menezes, R. C.; Wanke, B. Sporotrichosis. *Infectious diseases of the dog and cat*. 2012; 4ed: p. 645-650.
24. Do Monte Alves, M., Pipolo Milan, E., Da Silva-Rocha, W.P., Soares de Sena da Costa, A., Araujo Maciel, B., Cavalcante Vale, P.H., de Albuquerque, P.R., Lopes Lima, S., Salles de Azevedo Melo, A., Rodrigues, A. M. et al. Fatal pulmonary sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis* in Northeast Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2020; 14: e0008141.
25. Schechtman, R. C., Falcão, E. M. M., Carard, M., García, M. S. C., Mercado, D. S., & Hay, R. J. Esporotricose: hiperendêmica por transmissão zoonótica, com apresentações atípicas, reações de hipersensibilidade e maior gravidade. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2022; 97(1): 1-13.
26. Orofino-Costa R., Freitas D. F. S., Bernardes-Engemann, A. R., Rodrigues A. M., Talhari, C., Ferraz, C. et al. Esporotricose humana: recomendações da Sociedade Brasileira de Dermatologia para o manejo clínico, diagnóstico e terapêutico. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2022; 97(6), 757-777.
27. Montenegro, H., Rodrigues, A. M., Dias, M. A. G., Da Silva, E. A., Bernardi, F., De Camargo, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. *BMC veterinary research*. 2014; 10(1): 1-11.
28. Gremião, I. D., Menezes, R. C., Schubach, T. M., Figueiredo, A. B., Cavalcanti, M. C., & Pereira, S. A. Feline sporotrichosis: epidemiological and clinical aspects. *Sabouraudia*. 2015; 53(1), 15-21.
29. Rodrigues, A. M., De Hoog, G. S., De Camargo, Z. P. *Sporothrix* species causing outbreaks in animals and humans driven by animal–animal transmission. *PLoS pathogens*. 2016; 12(7): e1005638.
30. Schubach, A., Schubach, T. M. P., De Lima Barros, M. B., Wanke, B. Cat-transmitted sporotrichosis, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging infectious diseases*. 2005; 11(12): 1952.
31. Falcão, E. M. M., Pires, M. C. D. S., Andrade, H. B., Gonçalves, M. L. C., Almeida-Paes, R., do Valle, A. C. F., Freitas, D. F. S. 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*. 2020; 58(1): 141-143.

32. Alzuguir, C. L. C., Pereira, S. A., Magalhães, M. A. F. M., Almeida-Paes, R., Freitas, D. F. S., Oliveira, L. F. A., Pimentel, M. I. F. Geoepidemiology and socioeconomic aspects of human sporotrichosis in the municipality of Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, between 2007 and 2016. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2020; 114: 99–106.
33. Teixeira, M. M., Almeida-Paes, R., Bernardes-Engemann, A. R., Nicola, A. M., De Macedo, P. M., Valle, A. C. F., Zancopé-Oliveira, R. M. Single nucleotide polymorphisms and chromosomal copy number variation may impact the *Sporothrix brasiliensis* antifungal susceptibility and sporotrichosis clinical outcomes. *Fungal Genetics and Biology*, 2022; 163: 103743.
34. Boechat, J. S., Oliveira, M. M. E., Almeida-Paes, R., Gremiao, I. D. F., Machado, A. C. S., Oliveira, R. V. C., Figueiredo, A. B. F., Rabello, V. B. S., Silva, K. B. L.; Zancopé-Oliveira, R. M. *et al.* Feline sporotrichosis: Associations between clinical-epidemiological profiles and phenotypic-genotypic characteristics of the etiological agents in the Rio de Janeiro epizootic area. *Mem. Do Inst. Oswaldo Cruz.* 2018; 113: 185–196.
35. De Oliveira Bento, A., De Sena Costa, A. S., Lima, S. L., Do Monte Alves, M., De Azevedo Melo, A. S., Rodrigues, A. M., da Silva-Rocha, W. P., Milan, E. P., Chaves, G. M. The spread of cat-transmitted sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* in Brazil towards the Northeast region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15: e0009693.
36. Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas - Dra. Rosemary Costa Pinto (FVS-RCP). Boletim epidemiológico: Situação Epidemiológica da Esporotricose Humana no Estado do Amazonas, 2022 a 2023. Ano 2, Nº 15, outubro de 2023.
37. Mesquita, V. A., Talhari, S., Leturiondo, A. L., de Souza, G. C., De Brito, E. M., De Andrade, S. L., *et al.* Zoonotic Sporotrichosis outbreak: Emerging public health threat in the Amazon State, Brazil. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2024; 18(7): e0012328.
38. Lutz, A., Splendore, A. Sobre uma mycose observada em homens e ratos. *Revista Médica de São Paulo.* 1907; v. 21: p. 433-450.
39. Morris-Jones, R. Sporotrichosis. *Clin. Exp. Dermatol.* 2002; 27: 427–431.
40. Rodrigues, A. M.; Orofino-Costa, R.; de Camargo, Z. P. *Sporothrix spp.* In Pocket Guide to Mycological Diagnosis, Cordeiro Rde, A., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 2019; 1st ed : pp. 99–113.
41. Hoog, G. S. The genera *Blastobotrys*, *Sporothrix*, *Calcarisporium* and *Calcarisporiella*. gen. nov. 1974.

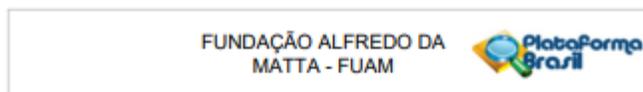
42. Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H. Compendium of soil fungi. Volume 1. 1980
43. Ghosh, A., P. K. Maity, B. M. Hemashettar, V. K. Sharma, and A. Chakrabarti. Physiological characters of *Sporothrix schenckii* isolates. *Mycoses*. 2002; 45: 449–454.
44. Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*. 2007; 45(10): 3198-3206.
45. Almeida-paes, R.; Frases, S.; Monteiro, P. C. F.; Gutierrez-Galhardo, M. C.; Zancopé-Oliveira, R. M.; Nosanchuk, J. D. Growth conditions influence melanization of Brazilian clinical *Sporothrix schenckii* isolates. *Microbes and Infection*. 2009; v. 11: n. 5, p. 554-62.
46. Cruz, I. L. R., Freitas, D. F. S., de Macedo, P. M., Gutierrez-Galhardo, M. C., do Valle, A. C. F., Almeida, M. D. A. *et al.* Evolution of virulence-related phenotypes of *Sporothrix brasiliensis* isolates from patients with chronic sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2021; 52: 5-18.
47. Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. *et al.* *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2015; 57(4): 289-294.
48. Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.
49. Klein, B. S., Tebbets, B. Dimorphism and virulence in fungi. *Current Opinion in Microbiology*. 2007; v. 10: n. 4, p. 314-319.
50. Bonifaz A., Toriello C., Araiza J., Ramírez-Soto M. C., Tirado-Sánchez, A. Sporotrichin Skin Test for the Diagnosis of Sporotrichosis. *J Fungi* (Basel). 2018.
51. Mesa-Arango, A. C., del Rocío Reyes-Montes, M., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúniga, G., & Toriello, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40(8): 3004-3011.
52. Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G. D. S., de Oliveira, M. M. E., Gerfen, G. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and environmental microbiology*. 2012; 78(24): 8623-8630.

53. Kauffman, C. A.; Bustamante, B.; Chapman, S. W.; Pappas, P. G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45: 1255–1265.
54. Francesconi, G., Francesconi do Valle, A. C., Passos, S. L., De Lima Barros, M. B., Almeida Paes, R., Curi, A.L., Liporage, J., Porto, C.F., Galhardo, M.C. Comparative study of 250 mg/day terbinafine and 100 mg/day itraconazole for the treatment of cutaneous sporotrichosis. *Mycopathologia.* 2011; 171: 349–354.
55. Costa, R. O., Macedo, P. M. D., Carvalhal, A., & Bernardes-Engemann, A. R. Use of potassium iodide in dermatology: updates on an old drug. *Anais brasileiros de dermatologia.* 2013; 88(3): 396-402.
56. Da Rocha, R. F. D. B., Schubach, T. M. P., Pereira, S. A., Dos Reis, É. G., Carvalho, B. W., Gremião, I. D. F. Refractory feline sporotrichosis treated with itraconazole combined with potassium iodide. 2018.
57. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi, approved standard, M38-A2, 2nd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
58. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST reading guide for broth microdilution. 2021.
59. 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. Sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: *Sporothrix brasiliensis* is associated with atypical clinical presentations. *PLoS neglected tropical diseases.* 2014; 8(9): e3094.
60. Riddell, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia.* 1950; v. 42: n. 2, p. 265-270.
61. Lacaz, C. S., Porto E., Martins, J. E. C., Heins-Vaccari, E. M., Melo, N. T. Tratado de micologia médica Lacaz. 2002.
62. Metchock, B. G., Nolte, F. S., Wallace Jr., R. J. “*Mycobacterium*” in Manual of Clinical Microbiology, P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, and R. H. Tenover, and R. H. Tenover. 1999; 7th edition: pp. 399–437.

63. Christensen, W. B. "Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella*," *Journal of Bacteriology*. 1946; vol. 52: no. 4, pp. 461–466.
64. Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. 1982; 20: 7–14.
65. Aktas E., Yigit N., Ayyildiz, A. Esterase activity in various *Candida species*. *J Int Med Res*. 2002; 30:322–324.
66. Camacho, E., León-Navarro, I., Rodríguez-Brito, S., Mendoza, M., & Niño-Vega, G. A. Molecular epidemiology of human sporotrichosis in Venezuela reveals high frequency of *Sporothrix globosa*. *BMC infectious diseases*. 2015; 15: 1-10.
67. Fichman V., Almeida-Silva F., Francis Saraiva Freitas D., Zancopé-Oliveira R. M., Gutierrez-Galhardo M. C., Almeida-Paes R. Severe sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*: antifungal susceptibility and clinical outcomes. *Journal of Fungi*. 2022; 9(1): 49.
68. Sanchotene, K. O., Brandolt, T. M., Klafke, G. B., Poester, V. R., & Xavier, M. O. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis*: comparison of yeast and mycelial phases. *Medical Mycology*. 2017; 55(8): 869-876.
69. Arrillaga-Moncrieff, I., Capilla, J., Mayayo, E., Marimon, R., Mariné, M., Gené, J., Guarro, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15(7): 651-655.
70. Mandal, P., Roy, T. S., Das, T. K., Banerjee, U., Xess, I., Nosanchuk, J. D. Differences in the cell wall architecture of melanin lacking and melanin producing *Cryptococcus neoformans* clinical isolates from India: an electron microscopic study. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007; 38: 662-666.
71. Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., Kozik, A. Fungi pathogenic to humans: molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochim Pol*. 2009; 56(2): 211-24.
72. Oliveira, L. C. Caracterização molecular e expressão fenotípica da enzima urease de *Sporothrix brasiliensis*. Tese de Mestrado. 2016.
73. Sierra-Campos, E., Valdez-Solana, M. A., Ruiz-Baca, E., Ventura-García, E. K., Avitia-Domínguez, C. I., Aguilera-Ortiz, M., & Téllez-Valencia, A. Anti-Sporotrichotic Activity, Lambert-

W Inhibition Kinetics and 3D Structural Characterization of *Sporothrix schenckii* Catalase as Target of Glucosinolates from *Moringa oleifera*. *Scientia Pharmaceutica*. 2022; 90(4): 70.

## ANEXO 1 - PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ENFRENTANDO A ESPOROTRICOSE NO AMAZONAS: DO DIAGNÓSTICO MOLECULAR À RESISTÊNCIA MEDICAMENTOSA

**Pesquisador:** André Luiz Leturindo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 70506823.9.0000.0002

**Instituição Proponente:** Fundação Alfredo da Matta

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.230.948

#### Apresentação do Projeto:

De acordo com o pesquisador "Trata-se de um estudo epidemiológico, observacional, descritivo, em um período de 36 meses. O estudo será realizado na FUHAM, no Laboratório de Biologia Molecular, com pacientes encaminhados por médicos/enfermeiros de Unidades de Saúde da rede municipal ou estadual, com suspeita de estarem com esporotricose e concordarem em participar do estudo assinando o TCLE.

Estima-se 80 pacientes por ano, no qual será utilizado a técnica de qPCR para diagnóstico e identificação da espécie do *Sporothrix* spp. Também será realizado o sequenciamento de gene específico que permite identificar resistência medicamentosa e antifugigrama para determinação de susceptibilidade medicamentosa, esta última etapa a ser realizada no laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas UFAM.

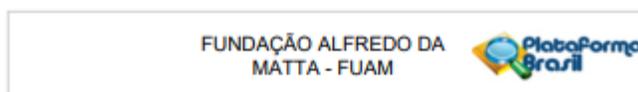
Será Coletada Fotos das lesões para identificação dos padrões clínicos e apresentações em eventos e congressos.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Geral:** Avaliar o papel das ferramentas moleculares no apoio ao diagnóstico clínico e no monitoramento da resistência medicamentosa da esporotricose;

**Endereço:** Rua Codajá, nº 24, Sala 14, 1º Andar  
**Bairro:** Cachoeirinha **CEP:** 69.065-130  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3032-5872 **Fax:** (92)3032-5802 **E-mail:** cep@fuam.am.gov.br

Página 01 de 02



Continuação do Parecer: 6.230.948

#### Objetivos Específicos:

1. Identificar por PCR em tempo real a frequência de *S. brasiliensis*, *S. schenckii* e *S. globosa* em pacientes com suspeita de esporotricose;
2. Verificar a susceptibilidade antifúngica in vitro nos isolados de *Sporothrix* spp a fim de rastrear tendências de resistência aos medicamentos antifúngicos usados no tratamento da esporotricose;
3. Pesquisar genes relacionados com a resistência aos antifúngicos em isolados fúngicos de *Sporothrix* spp., com ênfase aos genes envolvidos na mutação da citocromo P450 CYP51 e no polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) na posição 672 do gene *Tac1*.
4. Comparar os resultados do teste de susceptibilidade antifúngica com os resultados da análise de mutações por sequenciamento genético.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são inerentes a retirada da amostra biológica, ou seja, da biópsia ou da linfa. É possível que, durante a coleta do fragmento de pele da lesão, o paciente sinta algum desconforto relacionado ao procedimento, porém, esse desconforto será minimizado ou desaparece em alguns minutos após a coleta. Caso o desconforto persista, será prontamente atendido por uma equipe multiprofissional composta por médicos, enfermeiros e técnicos. Caso a retirada for de linfa, o raspado dérmico será praticamente indolor, com uma leve compressão na pele para drenar a linfa. Os seus dados pessoais serão manipulados somente pelos integrantes da pesquisa e serão mantidos em total sigilo.

#### Benefícios:

A participação do voluntário neste estudo trará benefícios potenciais diretos aos portadores de lesões suspeitas de esporotricose, com um diagnóstico laboratorial de melhor acurácia e rapidez na identificação do DNA de diferentes espécies de *sporothrix* e de prováveis suspeitos de apresentarem resistência aos tradicionais medicamentos utilizados no tratamento do fungo em questão. De posse dessas informações, o profissional clínico poderá tomar decisões mais

**Endereço:** Rua Codajá, nº 24, Sala 14, 1º Andar  
**Bairro:** Cachoeirinha **CEP:** 69.065-130  
**UF:** AM **Município:** MANAUS  
**Telefone:** (92)3032-5872 **Fax:** (92)3032-5802 **E-mail:** cep@fuam.am.gov.br

Página 02 de 02

Continuação do Parecer: 6.230.968

acertadas sobre a condição da doença ou o seu tratamento.

Pesquisador assume responsabilidade pelos dados e descreve o ato da coleta. Benefícios mostram-se superior aos riscos

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Projeto de Pesquisa bem descrito e detalhado, apresenta muita relevância, além de trazer como melhorias o diagnóstico com identificação de espécies e pesquisa de resistência e susceptibilidade medicamentosa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

PB: de acordo

Projeto completo: de acordo

Folha de rosto: de acordo

Anuência da instituição, laboratório, equipe: de acordo

TCLE: de acordo\*

Termo de autorização de imagem: de acordo

Curriculo lattes: de acordo\*

Cronograma: de acordo\*

TCUD: de acordo\*

\* respondido via carta resposta referente as pendencias do ultimo parecer. Todas as alterações estão em destaque e de acordo com o indicado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclui-se para aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado acompanha o parecer da relatoria pela aprovação do projeto. Indica que seja enviado relatórios parciais a cada seis meses e ao final do projeto seja apresentado relatório final.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB INFORMACOES_BASICAS_DD_P PROJETO_2137907.pdf	17/07/2023 13:50:19		Aceito

Endereço: Rua Codajá, nº 24, Sala 14, 1º Andar  
 Bairro: Cachoeirinha CEP: 69.065-130  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3632-5872 Fax: (92)3632-5882 E-mail: cep@fuam.am.gov.br

Página 02 de 04

Continuação do Parecer: 6.230.968

Outros	Carta_Resposta_CEP.pdf	17/07/2023 13:48:13	André Luiz Leturiondo	Aceito
Outros	Lattes_Andre.pdf	17/07/2023 12:58:40	André Luiz Leturiondo	Aceito
Outros	TCUD100723.pdf	17/07/2023 12:55:12	André Luiz Leturiondo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Esporotricose_Corrigido100723.pdf	17/07/2023 12:50:50	André Luiz Leturiondo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Destaque170723.pdf	17/07/2023 12:50:13	André Luiz Leturiondo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Corrigido170723.pdf	17/07/2023 12:49:42	André Luiz Leturiondo	Aceito
Declaração de concordância	Cartas_Anuencia_Ato_designacao.pdf	30/05/2023 14:05:43	André Luiz Leturiondo	Aceito
Outros	Termo_Autorizacao_Imagem.pdf	30/05/2023 13:08:51	André Luiz Leturiondo	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto_Esporotricose.pdf	29/05/2023 11:07:34	André Luiz Leturiondo	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 10 de Agosto de 2023

Assinado por:  
 Camila Gurgel dos Santos da Silva  
 (Coordenador(a))

Endereço: Rua Codajá, nº 24, Sala 14, 1º Andar  
 Bairro: Cachoeirinha CEP: 69.065-130  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3632-5872 Fax: (92)3632-5882 E-mail: cep@fuam.am.gov.br

Página 04 de 04

**ANEXO 2 – PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO (POP'S) DOS TESTES DE  
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PARA O GÊNERO *SPOROTHRIX SPP.***

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE TERMOTOLERÂNCIA PARA</b> <i>Sporothrix spp.</i>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da termotolerância no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Mesa-Arango, A. C., del Rocío Reyes-Montes, M., Pérez-Mejía, A., Navarro-Barranco, H., Souza, V., Zúniga, G., & Toriello, C. Phenotyping and genotyping of *Sporothrix schenckii* isolates according to geographic origin and clinical form of sporotrichosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(8): 3004-3011. 2002.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

A termotolerância é uma característica que relaciona-se com a capacidade do fungo de tolerar e se desenvolver em temperaturas mais elevadas. Para que o processo infeccioso evolua, é importante que o fungo apresente tal resistência, pois caso contrário, se restringirá à pele, e não provocará efeitos extra cutâneos.

A capacidade de termotolerância está relacionada ao termodimorfismo, onde o fungo modifica sua morfologia de acordo com o substrato e temperatura em que se encontra. Este apresenta-se na forma filamentosa quando cultivado em temperatura ambiente de 25°C, modificando sua morfologia para a forma leveduriforme quando em temperatura de 37°C.

Nos ensaios *in vitro*, a avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%GI) a 37°C é ferramenta útil para demonstrar a propriedade de termotolerância dos fungos termodimórficos. Assim, quanto menor o grau de inibição do crescimento, maior será a termotolerância.

#### 5. MATERIAIS

##### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Estufa 37°C
- Placas de Petri de 90x15 mm
- Tubos de ensaio
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Alça de platina em L
- Régua
- Microondas
- Balança analítica

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

## Reagentes

- Água destilada
- Ágar
- Ágar bacteriological
- Dextrose
- Batatas

## 6. PROCEDIMENTOS

### Meio Ágar Batata Dextrose

Fórmula:

Ágar bacteriological - 15 g

Dextrose - 20 g

Batata - 200 g

Água destilada - 1000 ml

Cortar a batata em pedaços menores e cozinhá-la em microondas utilizando metade do volume de água. Com a outra metade, dissolver o ágar bacteriological e a dextrose em microondas, ao ponto de tornar uma solução translúcida. Depois de liquefeita a batata, filtrá-la, com o auxílio de peneira e gaze. Juntar a solução de batata obtida com a solução de ágar e dextrose, e autoclavar a 121°C por 15 min.

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;
- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Termotolerância

- Inocular um fragmento da cultura, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro, no centro de placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose;
- Incubar as placas nas temperaturas de **30°C e 37°C**;
- Verificar do tamanho da colônia resultante, realizando a mensuração com auxílio de régua, com 14 dias e 21 dias de crescimento, respectivamente;
- Em seguida, calcular a % inibição do crescimento (%GI), para cada tempo e temperatura, seguindo a seguinte fórmula:

$$\%GI = \frac{D30 - D37}{D30} \times 100$$

Onde D30 e D37 são as medidas do diâmetro das colônias nas referidas temperaturas.

### Leitura dos resultados

As cepas devem ser classificadas de acordo com o percentual de inibição do crescimento a 37° apresentado, em **baixa termotolerância** (%GI < 50) ou **alta termotolerância** (%GI > 50).

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE PRODUÇÃO DE MELANINA PARA <i>Sporothrix spp.</i></b>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da produção de melanina no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Almeida-Paes, R., Frases, S., Araújo, G. D. S., de Oliveira, M. M. E., Gerfen, G. J., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. Biosynthesis and functions of a melanoid pigment produced by species of the *Sporothrix* complex in the presence of L-tyrosine. *Applied and environmental microbiology*, 78(24): 8623-8630. 2012.

Almeida-Paes, R., De Oliveira, L. C., Oliveira, M. M. E., Gutierrez-Galhardo, M. C., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2015). Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *BioMed research international*, v2015. 2015.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Dentre os principais fatores de virulência associados ao complexo *Sporothrix*, destacam-se o termodimorfismo, a termotolerância, a produção de melanina e a produção de enzimas extracelulares, os quais estão relacionados principalmente com mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro, e influenciam no processo infeccioso da esporotricose.

Nas espécies de *Sporothrix*, a produção de melanina é uma característica fenotípica marcante, e muito embora ainda não se tenha muita clareza sobre o papel que a mesma exerce na relação do complexo *Sporothrix* com o hospedeiro infectado, estudos apontam para a importância da mesma na virulência de diversos fungos patogênicos, podendo estar associada à uma maior proteção contra agentes oxidativos; inibição da resposta imune celular; interferência na ativação do sistema complemento, e redução da susceptibilidade aos antifúngicos. A piomelanina, eumelanina e DHN-melanina são os três tipos de melanina que podem ser produzidos por espécies *Sporothrix*, sendo o último tipo o mais abundante e facilmente produzido a partir da adição de glicose no meio de cultura.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

## 5. MATERIAIS

### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Placas de Petri de 90x15 mm
- Tubos de ensaio
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Alça de platina em L
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### Reagentes

- Água destilada
- Ágar
- Ágar bacteriological
- Dextrose
- Peptona bacteriológica
- Batatas

## 6. PROCEDIMENTOS

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;
- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Meio Ágar Batata Dextrose

Ágar bacteriological - 15 g

Dextrose - 20 g

Batata - 200 g

Água destilada - 1000 ml

Cortar a batata em pedaços menores e cozinhá-la em microondas utilizando metade do volume de água. Com a outra metade, dissolver o ágar bacteriological e a dextrose em microondas, ao ponto de tornar uma solução translúcida. Depois de liquefeita a batata, filtrá-la, com o auxílio de peneira e gaze. Juntar a solução de batata obtida com a solução de ágar e dextrose, e autoclavar a 121°C por 15 min.

### Produção de melanina

- Inocular um fragmento da cultura no centro de placas com meio Ágar Batata Dextrose;
- Incubar as placas a 25°C;
- Observar a produção de melanina diariamente, avaliando a frente e o verso da colônia;

### Leitura dos resultados

Com 30 dias de incubação, definir o grau de melanização que consiste em “cruzes”:

(-) se as colônias forem branco-amareladas;

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- (+) se forem cinza-claras;
- (++) se forem cinza-escuras a marrom;
- (+++) se forem predominantemente marrom e
- (++++) se forem pretas.

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE PRODUÇÃO DE FOSFOLIPASE PARA <i>Sporothrix spp.</i></b>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da produção de fosfolipase no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Cruz, I. L. R., Freitas, D. F. S., de Macedo, P. M., Gutierrez-Galhardo, M. C., do Valle, A. C. F., Almeida, M. D. A. *et al.* Evolution of virulence-related phenotypes of *Sporothrix brasiliensis* isolates from patients with chronic sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52: 5-18. 2021.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7–14. 1982.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Fungos apresentam a habilidade de produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-los fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença.

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica.

Uma vez que o fungo produz fosfolipase no Ágar gema de ovo, ocorre a formação de um complexo entre os íons cálcio e os ácidos graxos, liberados após a ação da enzima sobre os fosfolipídios presentes na gema do ovo. Com isso, há a formação de um halo de precipitação branco ao redor das colônias fúngicas, que indica a presença de atividade enzimática no meio de cultura.

#### 5. MATERIAIS

##### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Placas de Petri de 90x15 mm
- Tubos de ensaio
- Tubos de hemólise
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Alça de platina em L
- Régua
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### Reagentes

- Água destilada
- Ágar
- Peptona bacteriológica
- Emulsão de ovo orgânico
- Extrato de levedura
- NaCl
- CaCl<sub>2</sub>

## 6. PROCEDIMENTOS

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### **Meio Ágar gema de ovo (Fosfolipase)**

Glicose - 2%

Peptona - 1%

Extrato de levedura - 0,5%

NaCl - 4%

CaCl<sub>2</sub> - 0,074%

Gema de ovo orgânica - 8%

Ágar - 1,5%

Água destilada - 600 ml

Dissolver a glicose, peptona, extrato de levedura, NaCl e CaCl<sub>2</sub> em água, e liquefazer em microondas até se tornar uma solução translúcida. Levar à autoclave a 121°C por 15 minutos, e em seguida deixar o meio resfriar a temperatura ambiente. Preparar a emulsão de gema de ovo, através de centrifugação a 2500 rpm, por 10 minutos. Adicionar a emulsão de gema de ovo ao meio recém autoclavado, distribuir em placas de Petri de 90x15 mm, e armazenar em geladeira entre 2 a 8°C.

### **Atividade de fosfolipase**

- Preparar uma suspensão de células da fase filamentosa com  $1 \times 10^6$  células ou correspondente a escala 0,5 McFarland;
- Para verificar a atividade de fosfolipase utilizar o ágar gema de ovo;
- No centro da superfície do meio, inocular 5 µl da suspensão de inóculo;
- Incubar as placas incubadas a 25°C e acompanhar por 7 dias;

### **Leitura dos resultados**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

- As cepas produtoras de fosfolipase devem apresentar um **halo de precipitação branco** ao redor da colônia;
- Para determinar a atividade enzimática, deverá ser calculado o  $P_z$ , de acordo com Price *et al.*, 1982.

Para a mensuração da atividade enzimática, deve ser calculado o  $P_z$  que é a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia somada à zona do halo de atividade enzimática.

$$P_z = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{zona de clareamento}}$$

Deverá ser atribuído um score qualitativo aos valores encontrados para as cepas, classificando-as como atividade enzimática negativa ( $P_z = 1$ ), moderada ( $0,63 < P_z < 1$ ) e acentuada ( $P_z < 0,63$ ). Segundo essa classificação, quanto menor o  $P_z$ , mais intensa será a atividade enzimática.

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA PARA</b> <i>Sporothrix spp.</i>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da atividade hemolítica no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Cruz, I. L. R., Freitas, D. F. S., de Macedo, P. M., Gutierrez-Galhardo, M. C., do Valle, A. C. F., Almeida, M. D. A. *et al.* Evolution of virulence-related phenotypes of *Sporothrix brasiliensis* isolates from patients with chronic sporotrichosis and acquired immunodeficiency syndrome. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52: 5-18. 2021.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7–14. 1982.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7–14. 1982.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Fungos apresentam a habilidade de produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-los fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença.

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica.

A capacidade de lisar as hemácias, nos fungos, está relacionada principalmente à sua necessidade de obtenção de nutrientes, como o elemento Ferro por exemplo, importante para o seu metabolismo, nutrição e sobrevivência no ambiente de infecção. Além disso, pode estar correlacionada com fatores de virulência, que contribuem para o seu potencial de disseminação hematogênica.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

## 5. MATERIAIS

### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Placas de Petri de 90x15 mm
- Tubos de ensaio
- Tubos de hemólise
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Alça de platina em L
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### Reagentes

- Ágar Brain Heart Infusion (BHI)
- Sangue de carneiro 5%

## 6. PROCEDIMENTOS

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;
- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Meio Ágar sangue

Fórmula:

BHI – 31,2 g

Sangue de carneiro 5% – 42 mL

Água destilada – 600 mL

Dissolver o ágar BHI em água destilada e liquefazer em microondas até se tornar translúcida. Levar à autoclave a 121°C por 15 minutos, e em seguida deixar o meio resfriar a temperatura ambiente. Ao atingir a temperatura de pulso, adicionar o sangue de carneiro, distribuir o meio em placas de Petri de 90x15 mm, e armazenar em geladeira entre 2 à 8°C.

### Atividade hemolítica

- Preparar uma suspensão de células da fase filamentosa com  $1 \times 10^6$  células ou correspondente a escala 0,5 McFarland;
- Para avaliar a atividade hemolítica, deverão ser usadas placas de Petri contendo meio ágar BHI acrescido de 5% de sangue de carneiro;
- No centro da superfície do meio, inocular 5 µl da suspensão de inóculo;
- Incubar as placas incubadas a 25°C e acompanhar por 7 dias;

### Leitura dos resultados

- Amostras positivas apresentam um **halo translúcido** ao redor das colônias;
- Para determinar a atividade enzimática, deverá ser calculado o  $P_z$ , de acordo com Price *et al.*, 1982.

O  $P_z$  é a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia somada à zona do halo de atividade enzimática.

$$P_z = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{zona de clareamento}}$$

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

Deverá ser atribuído um score qualitativo aos valores encontrados para as cepas, classificando-as como atividade enzimática negativa ( $Pz = 1$ ), moderada ( $0,63 < Pz < 1$ ) e acentuada ( $Pz < 0,63$ ). Segundo essa classificação, quanto menor o  $Pz$ , mais intensa será a atividade enzimática.

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE PRODUÇÃO DE CATALASE SEMIQUANTITATIVA PARA <i>Sporothrix spp.</i></b>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da produção de catalase semiquantitativa no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Almeida-Paes, R., De Oliveira, L. C., Oliveira, M. M. E., Gutierrez-Galhardo, M. C., Nosanchuk, J. D., & Zancopé-Oliveira, R. M. (2015). Phenotypic characteristics associated with virulence of clinical isolates from the *Sporothrix* complex. *BioMed research international*, v2015. 2015.

Metchock, B. G., Nolte, F. S., Wallace Jr., R. J. “*Mycobacterium*” in Manual of Clinical Microbiology, P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Pfaller, F. C. Tenover, and R. H. Tenover, 7th edition: pp. 399–437. 1999.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

Sierra-Campos, E., Valdez-Solana, M. A., Ruiz-Baca, E., Ventura-García, E. K., Avitia-Domínguez, C. I., Aguilera-Ortiz, M., & Téllez-Valencia, A. Anti-Sporotrichotic Activity, Lambert-W Inhibition Kinetics and 3D Structural Characterization of *Sporothrix schenckii* Catalase as Target of Glucosinolates from *Moringa oleifera*. *Scientia Pharmaceutica*. 2022; 90(4): 70.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Fungos apresentam a habilidade de produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-las fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença.

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica.

Enzimas antioxidantes como catalases e superóxido dismutases protegem os fungos contra o ambiente de estresse oxidativo ocasionado pela ação de drogas antifúngicas, e são capazes de regular a homeostasia de espécies reativas de oxigênio (ROS) na interação

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

fungo-hospedeiro. O mecanismo de reação dessa enzima envolve a hidrólise das moléculas de espécies reativas de oxigênio.

## 5. MATERIAIS

### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Tubos de ensaio
- Tubos de hemólise
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### Reagentes

- Água destilada
- Ágar Brain Heart Infusion (BHI)
- Peróxido de hidrogênio P.A.
- Tween 80%

## 6. PROCEDIMENTOS

**Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.***

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;
- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Catalase semiquantitativa

- Preparar uma suspensão de células da fase filamentosa com  $1 \times 10^6$  células ou correspondente a escala 0,5 McFarland;
- Em seguida, tubos de ensaio contendo o meio BHI devem ser inoculados com 200  $\mu$ L de suspensão de células
- Após 21 dias de incubação, 1 mL de uma mistura 1: 1 recém-preparada de 10% de Tween 80 e 30% de peróxido de hidrogênio P. A. deve ser adicionada aos tubos.

### Leitura dos resultados

As cepas que produzem a enzima catalase formam uma coluna de bolhas, imediatamente, após a adição da mistura 1:1 de Tween 80 e peróxido de hidrogênio dentro do tubo de ensaio. Deve ser adotado o critério de classificação segundo o tamanho da coluna de bolhas formado. Após 5 minutos de teste, verificar se a coluna de bolhas é menor ou maior que 45 mm, o que sugere que a cepa apresenta **baixa** ou **alta** produção de catalase, respectivamente.

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE PRODUÇÃO DE ESTERASE PARA</b> <i>Sporothrix spp.</i>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da produção de esterase no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Aktas E., Yigit N., Ayyildiz, A. Esterase activity in various *Candida species*. *J Int Med Res*, 30:322–324. 2002.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Price, M. F., Wilkinson, I. D., Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7–14. 1982.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Fungos apresentam a habilidade de produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-los fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença.

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica.

A atividade da enzima esterase, em Ágar Tween, é evidenciada pela formação de um complexo entre os íons cálcio e ácidos graxos, liberados após a ação da enzima sobre os fosfolipídios presentes no polissorbato Twenn 80. Com isso, há a formação de um halo de precipitação branco ao redor das colônias fúngicas, que indica a presença de atividade enzimática no meio de cultura.

#### 5. MATERIAIS

##### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Placas de Petri de 90x15 mm
- Tubos de ensaio
- Tubos de hemólise
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Alça de platina em L
- Régua
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### **Reagentes**

- Água destilada
- Ágar
- Ágar bacteriological
- Dextrose
- Peptona bacteriológica
- Ágar Brain Heart Infusion (BHI)
- Peróxido de hidrogênio P.A.
- Ágar Ureia base
- Ureia
- Emulsão de ovo orgânico
- Extrato de levedura
- NaCl
- CaCl<sub>2</sub>
- Tween 80%

### **6. PROCEDIMENTOS**

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;
- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Meio Ágar Tween

Fórmula:

Peptona bacteriológica - 6g

NaCl - 3g

CaCl<sub>2</sub> - 0,06 g

Ágar - 9g

Tween 80 – 5mL

Água destilada - 600 mL

Dissolver o ágar, a peptona, NaCl e CaCl<sub>2</sub> em água destilada, e liquefazer em microondas até a solução se tornar translúcida. Levar à autoclave a 121°C por 15 minutos, e em seguida deixar o meio resfriar a temperatura ambiente. Logo após, adicionar o Tween 80, distribuir em placas de Petri de 90x15 mm e armazenar em geladeira.

### Atividade de esterase

- Preparar uma suspensão de células da fase filamentosa com  $1 \times 10^6$  células ou correspondente a escala 0,5 McFarland;
- Para verificar a atividade de esterases utilizar o meio Ágar Tween;
- No centro da superfície do meio, inocular 5 µl da suspensão de inóculo;
- Incubar as placas incubadas a 25°C e acompanhar por 7 dias;

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

### Leitura dos resultados

- As cepas produtoras de esterase devem apresentar um **halo de precipitação branco** ao redor da colônia;
- Para determinar a atividade enzimática, deverá ser calculado o  $P_z$ , de acordo com Price *et al.*, 1982.

Para a mensuração da atividade enzimática, deve ser calculado o  $P_z$  que é a razão entre o diâmetro da colônia e o diâmetro da colônia somada à zona do halo de atividade enzimática.

$$P_z = \frac{\text{diâmetro da colônia}}{\text{diâmetro da colônia} + \text{zona de clareamento}}$$

Deverá ser atribuído um score qualitativo aos valores encontrados para as cepas, classificando-as como atividade enzimática negativa ( $P_z = 1$ ), moderada ( $0,63 < P_z < 1$ ) e acentuada ( $P_z < 0,63$ ). Segundo essa classificação, quanto menor o  $P_z$ , mais intensa será a atividade enzimática.

### 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

	<b>PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO</b>	Nº 1
	<b>TÍTULO: TESTE DE PRODUÇÃO DE UREASE PARA</b> <i>Sporothrix spp.</i>	Data de elaboração: Novembro /2024  Data de revisão: Novembro/2024
<b>Sector:</b>	LABORATÓRIO DE MICOLOGIA	Versão: 1

### 1. FINALIDADE

Estabelecer os procedimentos operacionais para execução da análise da produção de urease no gênero *Sporothrix spp.*

### 2. ÂMBITO

Este POP se aplica a todos que atuam no Laboratório de Micologia, envolvidos em análises sobre as características fenotípicas do gênero *Sporothrix spp.*

### 3. REFERÊNCIAS

Christensen, W. B. "Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella," *Journal of Bacteriology*, vol. 52: no. 4, pp. 461–466. 1946.

Marimon, R., Cano, J., Gené, J., Sutton, D. A., Kawasaki, M., & Guarro, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*, 45(10): 3198-3206. 2007.

Ministério da Saúde. RDC nº 302 de 13 de outubro de 2005. Dispõe sobre Regulamento Técnico para funcionamento de Laboratórios Clínicos. 2005.

Ministério da Saúde. RDC nº 786 de 5 de maio de 2023. Dispõe sobre os requisitos técnico-sanitários para o funcionamento de Laboratórios Clínicos, de Laboratórios de

<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprovado por:</b>
Euzenio Moreira de Brito		

Anatomia Patológica e de outros Serviços que executam as atividades relacionadas aos Exames de Análises Clínicas (EAC) e dá outras providências. 2023.

Oliveira, D. C., Loreto, É. S. D., Mario, D. A. N., Lopes, P. G. M., Neves, L. V., Rocha, M. P. D. et al. *Sporothrix schenckii* complex: susceptibilities to combined antifungal agents and characterization of enzymatic profiles. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 57(4): 289-294. 2015.

Rossato, L. *Sporothrix brasiliensis*: aspectos imunológicos e virulência. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. 2017.

#### 4. FUNDAMENTAÇÃO

Fungos apresentam a habilidade de produzir enzimas extracelulares como proteases, lipases, queratinases, dentre outras, que representam ferramentas para caracterizá-los fenotipicamente e investigar a relação com a patogenicidade. Muitas destas enzimas são associadas com fatores de virulência que desempenham importante papel no processo de evolução da doença.

Em relação ao papel das enzimas secretadas pelos fungos, sabe-se que estas são importantes para o metabolismo destes microrganismos, fornecendo nutrientes através da degradação dos tecidos do hospedeiro. As proteases, lipases e fosfolipases agem sobre substratos proteicos e lipídicos dos tecidos, como colágeno tipo I e elastina, através de atividade proteolítica.

A urease pertence à família das hidrolases e a hidrólise do seu substrato, a uréia, produz amônia e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Em muitas espécies de fungos patogênicos, a urease apresenta uma importante atividade de alcalinização do meio. A alcalinização proveniente da amônia gerada é fundamental para a morfogênese do fungo, que ficaria muito dificultada em um meio ácido, como por exemplo, no interior da célula dos hospedeiros.

No Ágar Ureia de Christensen, uma vez que o fungo produz a enzima urease, ocorre a alcalinização do meio de cultura, que a partir de um indicador de pH, neste caso o vermelho de fenol, promove a mudança da coloração do meio de amarelo claro para rosa intenso.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

## 5. MATERIAIS

### Equipamentos, utensílios e vidrarias

- EPI's: luvas de procedimento, máscara, jaleco;
- Cabine biológica
- Bico de Bunsen
- Tubos de ensaio
- Tubos de hemólise
- Béquer
- Erlenmeyer
- Provetas
- Microondas
- Balança analítica
- Escala 0,5 MacFarland

### Reagentes

- Água destilada
- Ágar Ureia base
- Ureia

## 6. PROCEDIMENTOS

### Repique e avaliação micológica das culturas de *Sporothrix spp.*

- Os isolados de *Sporothrix spp.* devem ser subcultivados em Ágar Batata Dextrose em tubos de ensaio e mantidos por 15 dias, em temperatura ambiente, afim de se obter o crescimento satisfatório;

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		

- Posteriormente, os mesmos devem ser submetidos às análises macro e micromorfológicas para avaliação da pureza e viabilidade, bem como para a confirmação da identificação em nível de gênero, a fim de proceder os testes *in vitro*.

### Ágar Ureia de Christensen

Ureia - 1,04 g

Ágar ureia – 1,26 g

Água destilada – 50 ml

Dissolver a Ureia Base em água destilada e esterilizar por filtração. Separadamente, dissolver o ágar ureia no restante de água destilada, e esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos. Deixar resfriar a temperatura ambiente, e em seguida misturar as duas soluções. Mexer bem e dispensar em tubos de hemólise, fazendo esse procedimento atrás do bico de Bunsen. Deixar os tubos inclinado, e após solidificação, armazenar em geladeira.

### Produção de urease

- Preparar uma suspensão de células da fase filamentosa com  $1 \times 10^6$  células ou correspondente a escala 0,5 McFarland;
- Semear uma alçada da suspensão de células, com auxílio de alça de platina e “O”, em tubos contendo Ágar Ureia;
- Incubar os tubos a 25°C e acompanhá-los por 7 dias;

### Leitura dos resultados

Classificar as cepas como atividade negativa, baixa, moderada ou alta, seguindo a **escala de intensificação da cor rosa do meio**, que indica a atividade positiva de urease com 7 dias de incubação.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		



Da esquerda para direita:  
**negativa** (*C. albicans* ATCC 40260),  
**baixa, moderada e alta.**

## 7. OBSERVAÇÕES

Não há.

Elaborado por:	Revisado por:	Aprovado por:
Euzenio Moreira de Brito		